

Elaine Patrícia Maltez Souza Francesconi

Caracterização Farmacológica e Funcional dos Subtipos de
Adrenoceptores α_1 Envolvidos na Produção de Lactato em
Adipócitos Isolados de Tecido Adiposo Humano

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular – Área de Fisiologia

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Elaine Patrícia M.S.
Francesconi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora

Prof. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse



2008

UNIDADE IB-82988
CHAMADA _____
UNICAMP F844c
COMBO, BC/ 82923
ROC. 16.198-09
D A
REÇO 11.00
ATA 31-01-09
OD. TIT. 447391

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F844c Francesconi, Elaine Patricia Maltez Souza
Caracterização farmacológica e funcional dos subtipos de adrenoceptores α_1 envolvidos na produção de lactato em adipócitos isolados de tecido adiposo humano / Elaine Patricia Maltez Souza Francesconi. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Adipócitos. 2. Obesidade. 3. Lactato. 4. Adrenoceptores alfa. I. Grassi-Kassisse, Dora Maria 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/lib)

Título em inglês: Pharmacological characterization of α_1 adrenoceptors involved on lactate production in adipocytes isolated from human white adipose tissue.
Palavras-chave em inglês: Adipocytes; Obesity; Lactate; Alfa adrenoceptors.
Área de concentração: Fisiologia.
Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.
Banca examinadora: Dora Maria Grassi-Kassisse, Lucia Elvira Álvares, Carlos Alberto Silva, Lila Missae Oyama, Armindo Antonio Alves.
Data da defesa: 29/08/2008.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa.. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse (Orientador(a))


Assinatura

Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Silva


Assinatura

Profa. Dra. Lila Missae Oyama


Assinatura

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Assinatura

Profa. Dra. Elisângela Farias Silva

Assinatura

***Que Deus nos dê a sabedoria para
descobrir o correto, a vontade para elegê-lo e
a força para fazer que seja duradouro***

(autor desconhecido)

Agradecimentos

Primeiramente peço forças e um pouco de ajuda à memória para Deus, para não ser ingrata, senão injusta com todos aqueles que me auxiliaram.

Agradeço a Deus por todas as pessoas que Ele colocou no meu caminho, iluminando meu trajeto pela vida acadêmica ou pessoal com luz, conhecimento, alegria e muita amizade.

Agradeço a meu pai querido, Laerte, que não mais está conosco nesta existência, mas que me acompanha e me inspira sempre.

Agradeço à minha mãe, Teresinha, que é minha referência de pessoa absolutamente correta, íntegra, inteligente, dedicada e totalmente disponível nas mais temíveis horas e apertos pelos quais passei até hoje. Sem ela, com certeza este trabalho não poderia ser concluído. Amo você de todo o meu coração e por todas as minhas vidas de antes, hoje e sempre.

Agradeço ao meu marido Ricardo. Companheiro fiel que sempre esteve do meu lado, me auxiliando a cumprir as difíceis provas desta vida. Pai dos melhores filhos que os céus poderiam me enviar, Daniel, o primogênito e Vinicius. Se dedica tanto a nós que às vezes o chamo de “**Pãe**”, pois só uma mãe consegue abraçar de coração, como você abraça, a criação de nossos filhos. Te amo.

Agradeço a essas **criaturas** de Deus, que vieram trazer tanta alegria ao nosso lar.

Criatura 1- Daniel, o companheiro da mamãe. Sempre sorridente e trazendo lições que só ele sabe dar. Seu abraço é o conforto do meu coração, seu sorriso é a luz dos meus dias.

Criatura 2- Vinícius, é a própria alegria. Seu sorriso é brilhante como o sol que enche meu coração. É sapeca e brincalhão e junto com o seu irmão é uma alegria em dobro para mim. Amo muito vocês dois.

Agradeço ao desprendimento dos meus sogros, Nice e Nelson, que durante uma grande dificuldade que passamos, prontamente se oferecem para nos ajudar. Muito obrigada.

Não poderia esquecer da babá, Nice que trata os dois como se fossem filhos dela. Não há preço que pague a sua dedicação. Muito obrigada.

Agradeço à força e presença em momentos que precisava muito de alguém me ajudando como se fosse da família, sabe aquelas coisas que só alguém da família faz? Pois é, a Raquel tem o perfil de auxiliar sempre que alguém está em apuros, sem medir esforços pessoais. Muito obrigada.

Agradeço à minha vizinha Livia, que nestes últimos dias tem ajudado de todas as formas que pode. Muito obrigada por se envolver tanto com as minhas dificuldades.

Agradeço àqueles companheiros que encheram de sentido a nossa busca por descobertas interessantes ou a respeito das aortas, do estresse ou dos adipócitos. Não importa. O que importa é que tive a honra de trabalhar com vocês.

Minha grande amiga Ju. Grande de coração porque na verdade ela é pequenina. Grande amiga de todas as horas. Boas ou más, estava sempre apoiando, auxiliando, discutindo resultados, e seqüelas da vida. Bons tempos Ju. Sentirei saudade.

Lembro que quando o Heder chegou ao laboratório para fazer mestrado, logo ele me perguntou quem pagaria a conta de todos aqueles reagentes que ele estava usando e nem projeto tinha ainda. Eu respondi que ao final do projeto a Dora apresentaria a conta para ele pagar. Que cada um pagava as suas próprias contas. Heder...foi **impagável** a cara que você fez. Meu grande amigo Heder.

A Marcinha, a mineirinha mais querida do laboratório. Acho que ela tem bateria extra. Não pára nunca e isso me motivava a sempre querer saber mais também. Grande amiga. Sentirei saudade daquelas conversas longas (nem sempre, às vezes os experimentos não deixavam que fossem muito longas) que tínhamos nos almoços.

Danilin aquele sujeito que quando namora é porque ta apaixonado mesmo. Figura ilustre, grande amigo. Está cheio de juízo porque arrumou uma (corajosa) moça bacana. Acho que agora dá casamento. Companheiro quebrador de galhos. Grande Danilin.

Esse sujeito citado acima trouxe grandes companheiros com ele, pois embora eu já tivesse acabado a parte experimental do meu trabalho quando eles chegaram, também ajudaram muito com alguns detalhes que faltaram. Grandes sujeitos: Rodrigo, Tim e Guto.

Agradeço à Dani. Amiga de congressos e longas conversas na padaria. Me ajudou muito a entender as nuances metabólicas dos obesos. Muito obrigada.

Aos estagiários que por lá passaram: Aline, Aline, Aline (ué?), pois é, teve uma época que parecia que para entrar no laboratório precisava se chamar Aline. Marcelinho, um rapaz muito bacana, Danuza (não erreí não, é assim mesmo o nome dela, e não a chamem de Vanuza héim?), Carol (puxa vida ela tá usando um negócio horrível no cabelo, mas mesmo assim gosto muito dela, ela será minha orientanda em 2020, quando eu conseguir o emprego que eu quero e ela iniciar o mestrado, é claro!). Super Débora, moça espertíssima, que conseguirá tudo aquilo que deseja, pois é super do bem e merece tudo de bom que vida possa lhe oferecer. Ao Wonder, que infelizmente não ficou com o grupo por forças maiores, e que é uma pessoa especialíssima. Foi uma honra ter conhecido você.

Aos antigos colegas de laboratório: Alexandre (que sabe-se lá por onde anda), André, Silvia (lembra do mutirão do adipócito??? Vixe que trabalhadeira, mas aprendi bastante), Marília velha (um doce de côco de pessoa), Marília andinho (o mau humor não esconde a boa pessoa que é), Rodrigo, nosso colega que quer ser muito famoso, Edgar o grande amigo japonês da turminha. Sentirei saudade daquele auê que o laboratório virava quando estávamos todos.

Aos funcionários do departamento: dona Zefa, dona Lu, Ivo e Alexandra. Que sempre encheram nossos dias de alegria naqueles cafezinhos na cozinha.

Agradeço ao entusiasmo do Dr Pareja em produzir trabalhos científicos.

Agradeço também à prof. Helena, coordenadora da pós-graduação, que tentou de diversas formas me ajudar. E sempre que pôde, ajudou.

Aos amigos dos outros laboratórios, que como a Ju dizia que eu era curva de rio, eu sempre dava uma prosinha com eles: Emiliane, Alesinho, Amarylis, Vivi e Eliane. Sentirei saudade de vocês.

Não poderia esquecer de jeito nenhum a profa Regina, com toda a sua animação, sempre organizando *happy hours*, para que nós pudéssemos descontrair, embora só soubéssemos falar de trabalho. Mas não importa... a resiliência faz parte do processo... muito obrigada por essas horas especiais com o grupo.

Mas eu não teria chegado até aqui se não fossem meus amigos do passado.

Agradeço ao meu mentor espiritual e conselheiro para assuntos aleatórios, Sergio. Grande amigo. Grande mentor. Que até hoje, mesmo longe, lá na embrapa de Campo Grande, ele se lembra de mim e manda mensagens de força e superação.

Ao Tchê (Dimas), que mesmo sendo um tanto rústico, sabe demonstrar apreço a quem ele quer bem. Me sinto honrada por fazer parte deste seletto grupo.

Agradeço e fico muito feliz por ter a Lucia, nas duas fases da pós graduação, ao meu lado. Primeiro me ensinando tudo com muita paciência, durante o mestrado. E agora como banca da qualificação e da defesa me ajudando a melhorar o meu trabalho. Admiro muito você, por tudo que você fez e por tudo o que você é como pessoa.

E por último, mas não em ordem de importância, agradeço à Dora pela oportunidade de trabalhar com pessoas especiais em um projeto muito especial. Pelos momentos de treinamento que passei distraindo a Samyah no laboratório, foi fundamental para receber

meus pimpolhinhos (hehe). Pela paciência em ensinar e ir pra bancada quantas vezes fosse necessário. Pelo socorro quando eu tive dificuldades em me entender com algumas pessoas envolvidas no projeto. Muito obrigada.

Enfim só tenho a agradecer e espero não ter esquecido ninguém.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Sujeitos experimentais.....	31
3.2 Critérios de exclusão.....	32
3.3 Amostragem sanguínea.....	33
3.4 Isolamento de adipócitos.....	33
3.5 Contagem de células.....	34
3.6 Estudo farmacológico.....	35
3.7 Determinação de glicerol no meio de incubação.....	37
3.8 Determinação de lactato no meio de incubação.....	38
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSSÃO	110
7. CONCLUSÕES	134
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
9-ANEXO	136

RESUMO

O adipócito é a unidade funcional do tecido adiposo branco e o principal reservatório de energia, tendo um papel chave na investigação fisiológica dos mecanismos controladores da estocagem e mobilização de lipídeos e hoje sabe-se ser um importante sítio produtor de lactato. A obesidade e o diabetes tipo II estão associados, no homem, com um aumento na concentração de lactato sanguíneo e é mediado pelo adrenoceptor subtipo α_1 . Iniciamos este trabalho avaliando a relação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina e lactato em indivíduos normais e indivíduos obesos mórbidos antes e durante a realização do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. Apenas a insulinemia no jejum estava aumentada significativamente no grupo de homens obesos o que sugere fortemente que existe uma menor sensibilidade à insulina neste grupo experimental. O índice de HOMA neste estudo apontou para uma maior resistência insulínica no grupo de homens obesos, que foi significativamente maior principalmente ao final do *clamp*, sendo inclusive maior para homens obesos em relação a mulheres obesas. Verificamos uma inter-relação importante com a hiperinsulinemia, pois à medida que a insulina aumenta ao longo do *clamp*, a concentração de lactato decresce significativamente. As concentrações plasmáticas de lactato apresentaram-se bastante elevadas em indivíduos com IMC entre 40-55 Kg/m², diminuindo à medida que o IMC estava próximo de 70 kg/m². No tempo 180 de *clamp* do grupo obeso, a concentração de lactato caiu a ponto de alcançar numericamente os valores basais do seu respectivo grupo controle. Os adipócitos isolados de obesos mórbidos produziram mais glicerol em todas as concentrações utilizadas de noradrenalina em relação ao grupo de eutróficos, inclusive no basal. Quando foi adicionado o prazosin (1 μ M), houve um aumento na produção de glicerol. Em nossos ensaios observamos que o tecido adiposo

isolado de obesos apresenta uma produção basal de lactato significativamente elevada. Quando o estímulo utilizado foi a noradrenalina, a produção foi significativamente maior em adipócitos isolados de obesos quando comparados a eutróficos. A quantidade de lactato produzida pela noradrenalina em adipócitos isolados de obesos foi semelhante àquela produzida pela cirazolina, agonista seletivo de adrenoceptores α_1 . Nenhum antagonista utilizado, prazosin, WB4104 ou BMY7378, produziu qualquer efeito sobre a produção de lactato, seja em eutróficos ou obesos. Quando a produção de lactato em adipócitos isolados foi induzida pela insulina, não houve diferença significativa na quantidade de lactato produzida por adipócitos de obesos quando comparados com eutróficos, exceto na concentração de 500 μ U/ml. A estimulação máxima induzida pela insulina em eutróficos foi de 3 vezes e foi maior que aquela observada em adipócitos isolados de obesos que foi de 2,4 vezes. Estes resultados permitem inferir que não é a insulina o principal secretagogo de lactato responsável pela produção aumentada em adipócitos isolados de obesos. Por outro lado, quando co-incubamos noradrenalina com crescentes concentrações de insulina pudemos observar uma produção de lactato significativamente mais elevada, em todos os pontos, proveniente de adipócitos isolados de obesos. Podemos concluir que os adipócitos de indivíduos obesos produzem lactato diferencialmente em relação ao gênero, e este lactato pode estar sendo usado em outras vias metabólicas auxiliando no desencadeamento das patologias relacionadas à obesidade.

ABSTRACT

The adipocyte is the functional unit of fat white and the main reservoir of energy, taking a key role in research physiological mechanisms of control of storage and mobilization of lipids and today it is known to be an important site producer of lactate. Obesity and type II diabetes are associated, in humans, with an increase lactate concentration in the blood. We started this work lactate and is mediated by adrenoceptor subtype evaluating the relationship plasma concentrations of glucose, insulin and lactate in normal and morbid obese subjects before and during the clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Only in fasting insulin was increased significantly in the group of obese men which strongly suggests that there is less sensitivity to insulin in this group experimental. The HOMA index of this study pointed to a larger group of insulin resistance in obese men, which was significantly higher mainly the end of the clamp, and even higher for obese men regarding obesity women. We find an important inter-relationship with hyperinsulinemia, because that will measure the insulin increases over the clamp, the concentration of lactate decreases significantly. Plasma concentrations of lactate had to be quite high in individuals with BMI between 40-55 Kg/m², decreasing as a BMI of 70 kg/m² was next. At the time 180, clamp the obese group, the concentration of lactate fell about to reach numerically the baseline of their respective control group. The isolated adipocytes of obese morbid produced more glycerol concentrations used in all of norepinephrine in the group of eutrophic, including the basement. When the addition of prazosin (1 M) there was an increase in the production of glycerol. In our tests foundµ that the fat isolated from obese presents a production base of lactate significantly high. When the stimulation was used to norepinephrine, the production was significantly higher in

isolated adipocytes of obese compared to eutrophic. The amount of lactate produced by norepinephrine in isolated adipocytes of obese was similar to that produced by cirazolina, of selective α_1 adrenoceptor antagonist used, prazosin, WB4104 or BMY7378, α adrenoceptor agonist produced no effect on the production of lactate, in eutrophic or obese. When the production of lactate in isolated adipocytes was induced by insulin, there was no significant difference in the amount of lactate produced by adipocytes of $\mu\text{U} / \text{ml}$. The obese compared with eutrophic, except to the concentration of 500 maximum stimulation induced by insulin in eutrophic was 3 times and was higher than that observed in isolated adipocytes of obese which was 2.4 times. These results indicate that it is not the main insulin secretagogue of lactate responsible for increased production in isolated adipocytes of obese. On the other hand, when co-incubated with noradrenaline the concentrations of insulin have seen a lactate production significantly higher, at all points, from isolated adipocytes of obese. We can conclude that adipocytes of obese individuals produce lactate differentially in relation to gender, and this lactate may be being used in other metabolic pathways helping to trigger the diseases related to obesity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1

Idade (anos) e Índice de Massa Corporal ($\text{IMC} = \text{kg}/\text{m}^2$) dos indivíduos analisados.....46

Tabela 2

Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/l), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), lactato (μM) e área sob a curva (AUC), de voluntários homens e mulheres eutróficos e obesos mórbidos antes e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico.....55

Tabela 3

Médias de liberação de glicerol (μmol glicerol 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina, de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos.66

Tabela 4

Área sob a curva de adipócitos isolados de eutróficos e obesos, quando tratado com noradrenalina.....67

Tabela 5

Média de liberação de glicerol (μmol glicerol 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina de indivíduos obesos com ou sem a adição de $1 \mu\text{M}$ prazosin (PZS).....68

Tabela 6

Área sob a curva para a noradrenalina, de adipócitos isolados de obesos, na presença ou ausência de prazosin (antagonista α_1).....69

Tabela 7

Média de liberação de lactato (μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos, estimulada pela noradrenalina.....71

Tabela 8

Média de liberação de lactato (μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) de adipócitos isolados de mulheres e homens obesos, estimulada pela noradrenalina.....73

Tabela 9

Área sob a curva para a noradrenalina, de adipócitos isolados de mulheres e homens obesos.....73

Tabela 10

Média de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos, estimulada pela insulina76

Tabela 11

Média de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de mulheres e homens obesos, estimulada pela insulina.....77

Tabela 12

Média de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de eutróficos e obesos, estimulada por concentrações crescentes de insulina acrescidas de $1\mu\text{M}$ de noradrenalina.....80

Tabela 13

Média de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de mulheres e homens obesos, estimulada por concentrações crescentes de insulina acrescidas de $1\mu\text{M}$ de noradrenalina.....82

Tabela 14

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos, estimulada pela noradrenalina ou noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin.....85

Tabela 15

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de indivíduos obesos, estimulada pela noradrenalina ou noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin.....88

Tabela 16

Porcentagem de inibição na produção de lactato pelos adipócitos isolados de obesos mórbidos, proporcionada pela presença de prazosin nas incubações com noradrenalina.....89

Tabela 17

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) de adipócitos isolados de indivíduos obesos mulheres e homens, estimulada pela noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin.....91

Tabela 18

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$), estimulada pela noradrenalina na presença ou ausência de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de mulheres obesas.....94

Tabela 19

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de homens obesos.....96

Tabela 20

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou noradrenalina em adipócitos isolados de indivíduos obesos mórbidos.....98

Tabela 21

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina em adipócitos isolados de mulheres e homens obesos.....100

Tabela 22

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou cirazolina + 1nM de WB4101 ou cirazolina + 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de indivíduos obesos.....102

Tabela 23

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou cirazolina + 1nM de WB4101 ou cirazolina + 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de mulheres obesas.....104

Tabela 24

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou cirazolina + 1nM de WB4101 ou cirazolina + 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de homens obesos..... 106

Tabela 25

Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou isoprenalina em adipócitos isolados de indivíduos obesos..... 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

Concentrações plasmáticas de glicose (médias \pm EPM em mmol/L) e áreas sob a curva (AUC) para glicose (médias \pm EPM em mmol/L) em voluntários mulheres, eutróficas (símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (símbolo Δ com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*).....49

Figura 2

Concentrações plasmáticas de insulina (médias \pm EPM em μ U/ml) e AUC (médias \pm EPM em μ U/ml) de voluntários mulheres, eutróficas (símbolo \bullet com $n=3$) e obesas mórbidas (símbolo \circ com $n=11$) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo \blacktriangle com $n=3$) e obesos mórbidos (símbolo Δ com $n=6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*).50

Figura 3

Índices de HOMA (médias \pm EPM) calculados a partir da fórmula: $[\text{glicose}] \times [\text{insulina}] / 22,5$ e AUC (médias \pm EPM) em voluntários mulheres, eutróficas (símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (símbolo Δ com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*).....52

Figura 4

Concentrações plasmáticas de lactato (médias \pm EPM em μ M) e AUC (médias \pm EPM em μ M) em voluntárias mulheres, eutróficas (símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (símbolo Δ com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*).....54

Figura 5

Correlações entre IMC e lactato plasmático em voluntárias mulheres, eutróficas (símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (símbolo Δ com $n = 6$), antes (tempo 0/ basal)

do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....59

Figura 6

Correlações entre IMC e lactato plasmático em voluntários mulheres, eutróficas (símbolo • com n = 3) e obesas mórbidas (símbolo o com n = 11) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo ▲ com n = 3) e obesos mórbidos (símbolo Δ com n = 6), no tempo 90 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....60

Figura 7

Correlações entre IMC e lactato plasmático em voluntários mulheres, eutróficas (símbolo • com n = 3) e obesas mórbidas (símbolo o com n = 11) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo ▲ com n = 3) e obesos mórbidos (símbolo Δ com n = 6), no tempo 180 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....61

Figura 8

Correlação entre IMC e lactato plasmático do grupo obeso mórbido (homens e mulheres) no tempo 0 (basal/jejum), antes do início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....62

Figura 9

Correlações entre tempo de *clamp* e lactato plasmático em voluntários mulheres eutróficas (símbolo • com n = 3) e obesas mórbidas (símbolo o com n = 11) e em voluntários homens, eutróficos (símbolo ▲ com n = 3) e obesos mórbidos (símbolo Δ com n = 6), nos tempos antes do *clamp*: tempo 0/basal/jejum, 90 e 180 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....63

Figura 10

Médias das concentrações plasmáticas de lactato de indivíduos eutróficos (homens e mulheres – barra cheia, n= 6) no tempo 0 (jejum/basal) e indivíduos obesos mórbidos (homens e mulheres – barra quadriculada, n= 17) no tempo 180 minutos do início do *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico.....64

Figura 11

Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos mórbidos.....66

Figura 12

Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos com ou sem a adição de 1 μM de prazosin.....68

Figura 13

Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos sobre a produção de lactato70

Figura 14

Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos, mulheres e homens, sobre a produção de lactato.....72

Figura 15

Curva concentração-efeito à insulina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos, sobre a produção de lactato.....75

Figura 16

Curva concentração-efeito à insulina de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos, sobre a produção de lactato.....77

Figura 17

Curva concentração-efeito à insulina + 1 μ M de noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos sobre a produção de lactato.....79

Figura 18

Curva concentração-efeito à insulina + 1 μ M de noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos mórbidos, mulheres e homens, sobre a produção de lactato.....81

Figura 19

Curva concentração-efeito à noradrenalina + 1 μ M de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos sobre a produção de lactato.....84

Figura 20

Curva concentração-efeito à noradrenalina + 1 μ M de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato.....87

Figura 21

Curva concentração-efeito à noradrenalina + 1 μ M de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato.....90

Figura 22	
Curva concentração-efeito à noradrenalina + 1 μ M de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres obesas sobre a produção de lactato.....	93
Figura 23	
Curva concentração-efeito à noradrenalina + 1 μ M de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de homens obesos sobre a produção de lactato.....	95
Figura 24	
Curva concentração-efeito à cirazolina ou noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo obesos sobre a produção de lactato.....	97
Figura 25	
Curva concentração-efeito à cirazolina de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos sobre a produção de lactato.....	99
Figura 26	
Curva concentração-efeito à cirazolina, cirazolina + 1nM de WB4101 e cirazolina + BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo obesos sobre a produção de lactato.....	101
Figura 27	
Curva concentração-reposta à cirazolina, cirazolina + 1nM de WB4101 e cirazolina + BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres obesas sobre a produção de lactato.....	103
Figura 28	
Curva concentração-reposta à cirazolina, cirazolina + 1nM de WB4101 e cirazolina + BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo de homens obesos sobre a produção de lactato.....	105
Figura 29	
Curva concentração-reposta à cirazolina e isoprenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato.....	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 A epidemia da obesidade: uma perspectiva histórica

Tudo a nossa volta nos reporta à obesidade. Para muitos parece ser algo que vem tomando forma a apenas alguns anos, no entanto, a obesidade tem uma longa história.

Desde a pré-história e em muitas outras épocas a obesidade esteve presente entre os seres humanos.

Nossos ancestrais tinham grande dificuldade para conseguir alimentos e mais ainda para estocá-los, então era necessário que a natureza se encarregasse de desenvolver mecanismos fisiológicos eficientes de armazenar energia. Esses mecanismos consistiram de impulsionar o homem, pela fome, a ingerir uma grande quantidade de calorias, que seriam armazenadas como gordura no tecido adiposo, para períodos de escassez de alimentos.

Muito mais tarde, na época de Hipócrates (10.000 A.C.), as “deusas” eram admiradas por seus quadris, seios e coxas volumosos, mas em seus manuscritos, Hipócrates já alertava para o perigo do excesso de peso, afirmando que a morte súbita ocorria mais em gordos do que em magros.

Não se sabe ao certo o padrão de beleza na antiguidade, mas podemos inferir através das esculturas e pinturas gregas e romanas de Afrodite ou “Vênus”, pois sendo a deusa do amor, poderia ser também uma referência de beleza para aquela época. Ela era retratada como uma mulher com bonitos seios e coxas grossas, um padrão bem interessante de beleza da época.

A história da arte modifica o conceito de beleza feminina, como com os pintores Renoir (século VIII), Ticiano e Degas (século XVI) que retratavam mulheres com corpos volumosos, denotando beleza e saúde. Mas obras entre os séculos XIII e XX de Peter Paul

Rubens (1577-1640), já passaram a retratar corpos de damas magras, porém com formas delineadas, então o conceito de que excesso de gordura é sinônimo de beleza cai.

A preocupação com a obesidade não é recente como pudemos ver anteriormente, mas sua mensuração mais acurada só foi possível quando Adolph Quetelet em 1832, apresentou o Índice de Massa Corpórea (IMC) à sociedade acadêmica, que media a obesidade da pessoa ao dividir seu peso pelo quadrado de sua altura.

Além de medidas mais precisas da obesidade, tais como relação cintura-quadril, dobra cutânea, ultra-som, bioimpedância entre outras técnicas, os padrões nutricionais também sofrem modificações a cada século, acompanhando modificações sociais, econômicas e culturais (MENDONÇA & ANJOS, 2004), resultando em mudanças na dieta dos indivíduos.

O século XX foi marcado pelo uso de dietas ricas em açúcares, gorduras, produtos refinados e de baixo valor nutricional juntamente com o declínio progressivo de atividade física, o que tem colaborado para o aumento na prevalência de obesos no mundo (KUMANYIKA, S.K., 2001; BOUCHARD, C., 1991).

1.2 Prevalência de obesidade no Brasil e no mundo

A obesidade é a forma mais comum de má nutrição, contribuindo para o surgimento de diversas co-morbidades decorrentes do excesso de peso corporal, do padrão alimentar inadequado e da resistência insulínica (FRANCISCHI *et al.*, 2000; FLEGAL, *et al.*, 2002).

A Organização Mundial de saúde (OMS) classifica a obesidade baseando-se no Índice de Massa Corporal (IMC) e no risco de mortalidade associada. Assim, considera-se obesidade quando o IMC está acima de 30 kg/m². Quanto à gravidade a OMS define

obesidade grau I quando o IMC situa-se entre 30 e 34,9 kg/m², obesidade grau II quando IMC situa-se entre 35 e 39,9kg/m² e obesidade grau III quando o IMC ultrapassa 40kg/m².

A prevalência de sobrepeso e obesidade vem aumentando rapidamente no mundo, sendo considerada um importante problema de saúde pública para os países desenvolvidos e em desenvolvimento (POPKIN & DOAK, 1998; OMS, 2002).

Nos adultos, IMCs médios de 22-23 kg/m² são encontrados na África e na Ásia, enquanto que IMCs de 25-27 kg/m² são mais comuns em países da América do Norte, Europa, América Latina, África e Ilhas do Pacífico (OMS, 2002).

Atualmente há mais de um bilhão de adultos com excesso de peso e pelo menos 300 milhões deles apresentam obesidade clínica (OMS, 2002), variando de valores inferiores a 5% na China, Japão e alguns países Africanos. Mas mesmo em países com baixos índices de obesidade, esses valores podem sofrer grande flutuação de acordo com a cidade analisada.

A obesidade infantil acompanha a dimensão epidêmica da obesidade adulta, no mundo existem em torno de 18 milhões de crianças obesas. Nos EUA, o *Surgeon General*, a maior autoridade em saúde daquele país, afirma que desde 1980 triplicou-se o número de crianças e adolescentes obesos (OMS, 2002).

A obesidade é responsável por 2 a 6% do custo em atenção à saúde em vários países em desenvolvimento. Os verdadeiros custos são indubitavelmente mais altos, uma vez que nem toda patologia associada à obesidade é incluída nos cálculos (SICHERI *et al.*, 2007).

No Brasil, no momento em que o país se mobiliza para combater a fome, o IBGE (2002-2003) divulga que 40% da população brasileira está acima do peso. Conclusão que a princípio pode parecer algum erro de estatística, mas que confirma o padrão alimentar atual do brasileiro (e no mundo todo): dietas ricas em carboidratos e gorduras, que são

prontamente degustadas por indivíduos com pouco tempo e dinheiro para buscar opções menos calóricas (GARCIA, 1997; MONTEIRO *et al.*, 2004; ABESO, 2008).

No Brasil, diversas frentes de trabalho de instituições de pesquisa de renome no país, se unem num grande esforço de combate ao aumento na prevalência de obesidade, seja com foco no desenvolvimento de novos alimentos, na reeducação alimentar, no acompanhamento psicológico de grupos de obesos, ou ainda através da preparação dos pacientes com obesidade mórbida para cirurgia de redução de estômago.

Sendo a obesidade uma condição médica crônica de etiologia multifatorial, o seu tratamento envolve várias abordagens (nutricional, uso de medicamentos antiobesidade e prática de exercícios físicos, SEGAL & FANDIÑO, 2002). Entretanto, vários pacientes não respondem a essas manobras terapêuticas, necessitando de outras intervenções, como a cirurgia bariátrica, que tem se mostrado de grande auxílio na condução clínica de alguns casos de obesidade (FANDIÑO *et al.*, 2004).

1.3 Obesidade/síndrome metabólica

Como vimos anteriormente, a obesidade é provavelmente o distúrbio metabólico mais antigo, havendo relatos desse distúrbio em múmias egípcias e esculturas gregas (BLUMENKRANTZ, 1997) e está sendo considerada uma epidemia mundial, presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (POPKIN & DOAK, 1998). O aumento de sua incidência está distribuído em todas as raças e sexo, atingindo a população na faixa dos 25-44 anos (BLUMENKRANTZ, 1997).

A obesidade é um problema nutricional, com componentes ambientais, comportamentais, socioeconômicos e genéticos. Esta doença resultante do balanço

energético positivo pode ser definida em termos de aumento do peso corporal, ou aumento da gordura corporal total (FRANCISCHI *et al.*, 2000).

A associação da obesidade a outras patologias crônicas é denominada “síndrome metabólica”, embora existam desencontros na definição de síndrome metabólica, pois não há uma descrição internacional definitiva dessa síndrome.

Foi em 1988, em uma conferência que Reaven denominou de síndrome “X” a associação existente entre indivíduos com os mesmos fatores de risco. O denominador comum era representado pela resistência à insulina. Ele sugeriu cinco conseqüências, todas elas com um maior risco de doença cardiovascular: intolerância à glicose, hiperinsulinemia, aumento de triglicérides, diminuição do HDL colesterol e hipertensão arterial.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, a síndrome metabólica é um transtorno complexo, caracterizado por uma série de fatores de risco cardiovasculares, relacionados com resistência à insulina e obesidade abdominal.

As sociedades médicas sugerem alguns métodos para detecção dos indivíduos portadores de síndrome metabólica. O Consenso sobre síndrome metabólica (2004) sugeriu que indivíduos portadores de três ou mais dos seguintes critérios devam ser considerados como portadores de síndrome metabólica:

- Obesidade abdominal (visceral), medida ao nível médio do abdômen: cintura > 102 cm para homens e > 88 para mulheres;
- Hipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dl;
- HDL colesterol: < 40 mg/dl em homens e < 50 mg/dl em mulheres;
- Hipertensão arterial sistêmica: $\geq 130/85$ mmHg;
- Glicemia de jejum: ≥ 110 mg/dl (recentemente a Sociedade Americana de Diabetes sugeriu que os valores de normalidade para a glicemia de jejum fossem

reduzidos para, no máximo, 99 mg/dl, sendo possível que esse critério seja adotado também para síndrome metabólica).

Recentemente, o International Diabetes Federation (IDF, 2005), sugeriu como critérios:

Obesidade central cujos limites possa variar conforme a etnia. Assim para europeus sugeriu para medidas da circunferência da cintura os valores de 94 cm para homens e 80 cm para mulheres, para asiáticos 90 e 80 cm e para japoneses 85 e 90 cm.

E dois ou mais dos seguintes critérios:

- Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dl ou estar em tratamento específico;
- HDL colesterol: < 40 mg/dl em homens e < 50 mg/dl em mulheres ou estar em tratamento específico;
- Hipertensão arterial sistêmica: $\geq 130/85$ mmHg, ou tratamento de hipertensão diagnosticado previamente;
- Glicemia de jejum: ≥ 100 mg/dl, ou diabetes tipo 2 diagnosticado previamente.

1.3.1 Aspectos genéticos

A obesidade não é uma desordem singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas, que em última análise resultam no fenótipo da obesidade. Os princípios mendelianos e a influência do genótipo na etiologia desta desordem podem ser atenuados ou exacerbados por fatores não-genéticos, como o ambiente externo (SNYDER *et al.*, 2004) e interações psicossociais que atuam sobre mediadores fisiológicos de gasto e consumo de energia (MARTÍNEZ & FRÜBECK, 1996; JEBB, 1997; MARQUES-LOPES *et al.*, 2001 e 2004; CORBALAN *et al.*, 2002).

Neste sentido, os genes intervêm na manutenção do peso e gordura corporal estáveis ao longo do tempo através da sua participação no controle de vias eferentes (leptina, nutrientes, e de mecanismos centrais), e de vias aferentes (insulina, catecolaminas, sistema nervoso autônomo) (MARTÍNEZ & FRÜBECK, 1996). Assim, o balanço energético, do qual participam a energia ingerida e a energia gasta, parecem depender da herança genética (BOUCHARD *et al.*, 1988; RODRIGUES & BOGUZESWISKI, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 2000), podendo afetar ambas as partes da equação (apetite e gasto).

Acredita-se que a dieta ocidental e um estilo de vida sedentário contribuam para o desenvolvimento da obesidade em indivíduos geneticamente predispostos (SPIEGELMAN & FLIER, 2001). Embora os excessos alimentares e o sedentarismo estejam implicados no aumento global da prevalência da obesidade, há evidências de que a genética contribui substancialmente para a regulação do peso corporal. Estudos de correlação de Índice de Massa Corporal (IMC) em gêmeos monozigóticos, gêmeos dizigóticos, irmãos biológicos e adotivos sugerem que a herança da obesidade é de 50-90% (BARSH *et al.*, 2000).

A nível populacional, o componente genético da obesidade é expresso como herdabilidade, que pode ser expressa como gordura corporal total de um indivíduo ou segundo a distribuição da gordura corporal (BOUCHARD *et al.*, 1988). Há evidências a partir dessas análises genéticas, que a obesidade é uma desordem poligênica (BEALES & KOPELMAN, 1996).

O estudo da herança na obesidade é difícil por se tratar de uma desordem poligênica complexa (BEALES & KOPELMAN, 1996). Diversas mutações associadas à obesidade foram recentemente identificadas, embora não tenha sido possível definir relação entre o produto do gene mutado e o distúrbio do balanço energético (LEE *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial de saúde (WHO, 1990), a ocorrência de obesidade nos indivíduos reflete a interação entre aspectos dietéticos e ambientais com predisposição genética. Contudo, existem poucas evidências de que algumas populações são mais susceptíveis à obesidade por motivos genéticos, o que reforça serem os fatores alimentares – em especial a dieta e a atividade física – responsáveis pela prevalência da obesidade em diferentes grupos populacionais (WHO, 1990).

1.3.1 Aspectos nutricionais

Os danos à saúde decorrente do consumo insuficiente de alimentos (desnutrição), ou do consumo excessivo (obesidade) é há muito tempo conhecidos pelos seres humanos. A relação entre consumo de gorduras saturadas e o desenvolvimento de doença coronariana foi das primeiras a ser comprovada cientificamente (KEYS, 1970; KEYS *et al.*, 1984; STAMLER & SHEKELLE, 1988).

O risco de câncer colo-retal, mama e próstata parece aumentar com o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas, enquanto o consumo de leguminosas, frutas e legumes parece exercer um efeito protetor em relação ao desenvolvimento dessas doenças (WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION, 1997).

Estudos populacionais demonstraram uma forte associação entre o consumo habitual de sal e a pressão arterial nos indivíduos estudados (INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1988).

Dietas ricas em carboidratos complexos são consideradas úteis na prevenção de obesidade, de vários tipos de câncer, para o controle da hiperlipidemia e do *Diabetes mellitus* (WHO, 1990).

A maior parte dos estudos sobre a relação entre as características da dieta e obesidade evidencia uma associação positiva entre proporção de energia procedente de gorduras e risco de obesidade, ainda que as associações obtidas em estudos populacionais alcancem magnitude inferior à evidenciada em estudos experimentais (BRAY & POPKIN, 1999).

A obesidade, por sua vez, aumenta o risco de diversas doenças crônicas na idade adulta, destacando-se doenças cardiovasculares, *Diabetes mellitus* tipo II, problemas locomotores e certos tipos de cânceres (WHO, 1998).

O acúmulo de evidências que associam características da dieta ao estado de saúde dos indivíduos, levou a Organização Mundial de Saúde (WHO) a estabelecer limites máximos de consumo de gorduras, ácidos graxos saturados, açúcar, colesterol e sal ao mesmo tempo em que incentivou o consumo de carboidratos complexos, verduras, frutas e legumes, como consumo mínimo diário (WHO, 1998 e 1990).

Dietas inadequadas, com elevado teor de lipídios, energia e carboidratos simples podem ser consideradas fatores de risco para doenças crônicas e obesidade (NICKLAS *et al.*, 2001). Com o padrão atual de alimentação da população brasileira, incluindo adultos e crianças, é importante que se preconize a prevenção de doenças associadas à obesidade através da informação da importância da adesão à reeducação alimentar e a necessidade da mudança no estilo de vida, orientado por profissionais da área que utilizarão técnicas adequadas para a mudança no comportamento alimentar (KRAUSS *et al.*, 2000).

Programas que enfatizam mudanças no estilo de vida, como redução do consumo de energia e prática de atividade física, proporcionam uma redução de peso de 5 a 7%, o que melhora sensivelmente os parâmetros fisiológicos alterados pela obesidade, como

resistência à insulina, hipertensão e dislipidemias (ROSS *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002; FOSTER *et al.*, 2003).

1.3.1 Fármacos utilizados no controle da obesidade

A obesidade é um problema nutricional, com componentes ambientais, comportamentais, socioeconômicos e genéticos, como visto anteriormente. Esta doença resultante do balanço energético positivo pode ser definida em termos de aumento do peso corporal, ou aumento da gordura corporal total.

Os mecanismos que participam da regulação da ingestão de alimentos são: hormonal, metabólico e neural (RODRIGUES *et al.*, 2003; GELONEZE & PAREJA, 2006; VELLOSO, 2006).

O tratamento da obesidade constitui um grande desafio. Por um lado muito se sabe das alterações metabólicas que ocorrem com o obeso e das mudanças comportamentais (hábitos alimentares e atividade física), necessárias para o tratamento deste problema. Por outro lado, os pacientes têm muita dificuldade em aderir às modificações recomendadas.

O tratamento farmacológico da obesidade está indicado quando o paciente tem um IMC maior que 30, ou quando o indivíduo tem doenças associadas ao excesso de peso e IMC maior que 25 em situações em que o tratamento com a dieta, atividade física e mudanças comportamentais não foram suficientes (HALPERN & MANCINI, 2002).

Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da obesidade podem ser classificados de acordo com seu modo de ação: serotoninérgicos e catecolaminérgicos (sacietógeno) reduzem a ingestão de alimento por aumentarem a saciedade; catecolaminérgicos (anorexígenos), são os medicamentos clássicos de inibição do apetite que reduzem a fome do indivíduo; serotoninérgicos, indicados para comedores

compulsivos, e os inibidores da absorção de gorduras (HALPERN & MANCINI, 2002; HANG & DALE, 2004).

1.3.1 Cirurgia bariátrica

Sendo a obesidade uma condição médica crônica de etiologia multifatorial, o seu tratamento envolve múltiplas abordagens (nutricional, uso de medicamentos anti-obesidade e prática de exercícios físicos, SEGAL & FANDIÑO, 2002). Entretanto, vários pacientes não respondem a estas manobras terapêuticas, necessitando de outros recursos.

A cirurgia bariátrica tem se mostrado uma técnica de grande auxílio na condução clínica de alguns casos de obesidade. A indicação desta intervenção vem crescendo atualmente e baseia-se numa análise abrangente de múltiplos aspectos dos pacientes.

Aspectos clínicos e cirúrgicos da obesidade mórbida: são candidatos para o tratamento cirúrgico (cirurgia bariátrica) os pacientes com IMC > que 40 Kg/m² ou com IMC > que 35 kg/m² associado a comorbidades (hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes tipo 2, apnéia do sono, entre outras).

A seleção de pacientes requer um tempo mínimo de 5 anos de evolução da obesidade e história de falência do tratamento convencional realizado por profissionais qualificados (CONSENSO LATINO AMERICANO DE OBESIDADE, 1999).

O tratamento cirúrgico da obesidade, também conhecido como cirurgia bariátrica, está baseado fundamentalmente em 4 modalidades técnicas (PAREJA *et al.*, 2006):

- Técnica restritiva: visa diminuir a capacidade volumétrica do estômago, criando a sensação de saciedade com a ingestão de pequena quantidade de alimento.

- Técnica de Mason
- Banda gástrica

- Técnica disabsortiva: visa deixar um estômago maior e promover um grande desvio intestinal. O paciente continua comendo bastante mas tem uma menor absorção dos alimentos. A técnica mais conhecida desta modalidade é a de Scopinaro, que foi desenvolvida pelo médico italiano Scopinaro em 1979.
 - o Técnica de Scopinaro (ADAMI *et al.*, 1987)
- Técnica mista: ela une as duas anteriores, promove uma diminuição acentuada do estômago e um pequeno desvio intestinal, criando assim uma diminuição na ingestão aliada a uma moderada diminuição na absorção dos mesmos. É considerada hoje o padrão “ouro” das cirurgias de obesidade.
 - o Capella
 - o Fobi-Capella
- Marcapasso gástrico. É o implante de um estimulador elétrico na parede externa do estômago que transmite ao cérebro sensação de saciedade precoce.



Figura 1. Mecanismos de ação dos diferentes procedimentos bariátricos: (1) Gastroplastia vertical de Mason; (2) Balão intra-gástrico; (3) Banda gástrica ajustável; (4) Marcapasso gástrico; (5) Gastroplastia vertical com derivação gastro-jejunal (cirurgia de Fobi-Capella); (6) Derivação bilio-digestiva (cirurgia de Scopinaro).

A primeira cirurgia realizada para redução de peso foi o *by-pass* (desvio) do intestino, idealizado por Kremen e Liner em 1954 e retirava mais de 90% de componentes do intestino delgado (jejuno e íleo), ocasionando uma má absorção intestinal, levando o paciente a evacuar fezes com alto índice de gordura.

Estas cirurgias conseguiam a perda de peso sem a necessidade de mudança de hábitos alimentares, porém ocasionavam complicações graves como: insuficiência hepática, cirrose, deficiências metabólicas, entre outras.

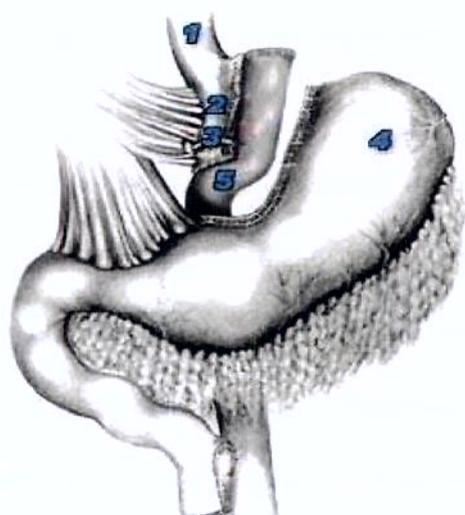
Essas complicações fizeram com que essas cirurgias não fossem mais realizadas e hoje fazem parte apenas da história da evolução das cirurgias bariátricas.

Em 1967, Mason introduziu uma técnica cirúrgica, que se tornou a mais empregada nos anos 80 e 90, a gastroplastia vertical com bandagem, que apresentava baixos índices de complicações imediatas ou tardias e com mortalidade cirúrgica quase nula. É uma cirurgia restritiva que consiste no fechamento de uma porção do estômago através de uma sutura, gerando um compartimento fechado. A utilização de um anel de contenção resulta em um esvaziamento mais lento desse “pequeno estômago”. Com esse procedimento os pacientes experimentaram uma redução em média de 30% do peso total nos primeiros anos.

No início dos anos 90, surge uma nova cirurgia que combinava os dois mecanismos da cirurgia da obesidade, associando a restrição alimentar através da redução de estômago, com uma leve má absorção reduzindo apenas 1m do intestino delgado (CAPELLA *et al.*, 1991).

Esta cirurgia foi desenvolvida pelo médico colombiano Rafael Capella. Este procedimento consiste na redução do estômago para se adaptar a um volume menor que 30 ml. A redução de volume da cavidade é obtida através da colocação de um anel de contenção na saída do compartimento formado e conexão com um alça intestinal. Neste

caso, a ingestão de carboidratos pode ocasionar a chamada síndrome de *dumping* (náuseas, vômitos, rubor, dor epigástrica, sintomas de hipoglicemia). Esta cirurgia proporciona redução média de peso de 35% em longo prazo. É uma técnica segura e com baixa mortalidade.



LEGENDA

1. Esôfago
2. Novo estômago
3. Anel de Silicone
4. Estômago excluído
5. Junção entre o novo estômago e o intestino delgado

Figura 2 Sistema gastro-intestinal após intervenção bariátrica by-pass Capella

1.4 O tecido adiposo

O conceito de que o excesso de tecido adiposo visceral está associado às complicações metabólicas e hemodinâmicas envolvidas em mecanismos que levam à doença cardiovascular aterogênica e hipertensão arterial, não é recente. Em 1947, Vague descrevia dois tipos de distribuição de gordura corporal, o andróide, ou masculino e o ginecóide exteriorizando características somáticas femininas.

Quase 10 anos depois, o mesmo autor propõe que os diferentes tipos de obesidade eram acompanhados de riscos distintos de complicações, a obesidade andróide associando-se com maior frequência a diabetes, gota e doença coronariana (VAGUE, 1956).

Nos anos subseqüentes, a idéia básica de Vague foi confirmada por inúmeros estudos prospectivos (LAPIDUS *et al.*, 1984; DUCIMETIERE *et al.*, 1986; DONAHIRE *et al.*, 1987) e várias linhas de pesquisa tem mostrado o envolvimento do tecido adiposo na fisiopatologia da hipertensão arterial e suas complicações (HALL *et al.*, 1993; WARD *et al.*, 1993; RUMANTIR *et al.*, 1999).

Atualmente as células adiposas não são tidas apenas como estruturas de sustentação e proteção, mas como um verdadeiro órgão dotado de intensa atividade endócrina e metabólica (MOHAMED-ALI *et al.*, 1998; GIMENO & KLAMAN, 2005).

1.4.1 Os diferentes tipos de tecido adiposo: Branco e Marrom

Nos mamíferos encontramos dois tipos distintos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco ou amarelo e o tecido adiposo pardo ou marrom, sendo que a unidade funcional de ambos é denominada adipócito (CINTI, 2005).

Estas células apresentam diferentes funções e diferente anatomia. O adipócito branco é unilocular, de maneira que é capaz de acumular ácidos graxos após uma refeição. O adipócito marrom é multilocular e apresenta uma grande quantidade de mitocôndrias em seu interior, o que lhe confere a coloração marrom.

O tecido adiposo marrom é encontrado em mamíferos recém nascidos de praticamente todas as espécies, sendo que em animais não hibernantes diminui com o crescimento. Em adultos a quantidade de tecido adiposo marrom é mínima, enquanto que em recém nascidos encontramos depósitos na região cervical posterior, axilar, supra-iliaca, peri-renal, região interscapular, abdominal anterior e retropubiana (HEALTON, 1972; MERKLIN, 1973).

No interior dos adipócitos marrons encontramos a proteína UCP-1, expressa exclusivamente nestas células e, responsável pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que promove a produção de calor neste tipo de célula (SAGGERSON *et al.*, 1988).

Apesar da existência destes dois tipos de tecido adiposo, no caso dos adultos a maior parte do tecido é do tipo branco (GARCIA *et al.*, 2002). Por conta disto, a maioria da literatura encontrada descreve pesquisas com o tecido adiposo branco, que neste trabalho também foi o tecido estudado.

O tecido adiposo branco é regulado tanto por fatores humorais, mas também pelo sistema nervoso. Fibras nervosas provenientes do sistema nervoso simpático realizam a inervação deste órgão, estimulando a lipólise, que é a mobilização dos lipídeos armazenados no tecido adiposo resultando na liberação de glicerol e ácidos graxos livres. Além disto, estudos recentes também mostram que o sistema nervoso parassimpático também realiza a inervação do tecido adiposo branco em ratos, embora com ação pouco conhecida (FLIERS, 2003).

Outros estudos mostram ainda, a atuação do sistema nervoso autônomo modulando funções no tecido adiposo, tanto nos aspectos celulares, mas também nos mecanismos moleculares (YOUNGSTROM & BARTNESS, 1995; KREIER, 2002; BARTNESS, 2002). Isto é observado para a lipólise/lipogênese, captação de glicose estimulada pela insulina, na expressão de substâncias pelo adipócito e na regulação do número células adiposas (ROMIJN & FLIERS, 2005).

1.4.2 O tecido adiposo como órgão endócrino

A capacidade de estocagem e liberação de energia dos seres vivos, principalmente em situações que necessitam seja de um maior estoque, ou de uma maior liberação de energia, se tornou vital para sobrevivência e reprodução das espécies ao longo da evolução. Para garantir que esse mecanismo de armazenamento e utilização das reservas funcione adequadamente, a comunicação entre os sistemas fisiológicos do organismo é de suma importância (KLEIN *et al.*, 2006).

Um dos tecidos que apresenta essa função de controle da estocagem de energia é o tecido adiposo. Até algumas décadas atrás, esta era considerada a sua única função. Entretanto, a evolução nos procedimentos laboratorial permitiu estudos cada vez mais aprofundados, de maneira que o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino (GIMENO & KLAMAN, 2005).

Diante destas recentes descobertas, atualmente, inúmeros trabalhos trazem funções atribuídas ao tecido adiposo, que envolvem a participação em processos fisiológicos e patológicos, incluindo os processos inflamatórios e imunes (WARNE, 2003; BAUGUIL, 2005; FANTUZZI, 2005; POND, 2005).

A descoberta da leptina, por exemplo, deixou claro que o tecido adiposo participa ativamente do controle do dispêndio energético e do apetite, através dos seus efeitos sobre o sistema nervoso simpático e função cardiovascular (RUMANTIR *et al.*, 1999).

A década de 90, porém, foi muito além da leptina quanto à caracterização de moléculas reguladoras da homeostase circulatória e energética expressas e secretadas pelos adipócitos. Mostrou que o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-I) estava

aumentado no sobrepeso e obesidade graças à maior expressão de seu RNAm no tecido adiposo (LOSKUTOFF & SAMAD, 1998).

Registrou que o angiotensinogênio tinha seus níveis séricos elevados na obesidade devido à sua maior síntese pelos adipócitos, o que geraria mais angiotensina II e elevação da pressão arterial, seja pelos efeitos diretos do peptídeo sobre o rim, ou pela ativação simpática (COOPER *et al.* 1997).

Também se constatou que a angiotensina dos adipócitos participava da regulação da neurotransmissão simpática envolvida no controle do metabolismo lipídico, regulando o volume dessas células, controlando as enzimas do metabolismo de ácidos graxos e agindo como agente modulador do peso corporal (CRANDALL *et al.*, 1994).

Além disso, o adipócito tem papel importante na interconversão dos hormônios esteróides (PRINS, 2002; ANDREW *et al.*, 2005).

O tecido adiposo secreta citocinas que desempenham importante papel na homeostasia energética, sensibilidade à insulina, resposta imunológica e doença vascular (PRINS, 2002; FANTUZZI, 2005; GREGOIRE, 2001; XU *et al.*, 2003). Podem por isso ser agrupadas de acordo com a principal função, em adipocinas com função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina (PRINS, 2002).

1.4.3 A produção de adipocinas pelo tecido adiposo

A participação do tecido adiposo nos processos fisiológicos, patológicos, inflamatórios e imunes é realizada tanto através da interação de hormônios, citocinas, enzimas, e outros fatores produzidos pelos diferentes sistemas do organismo, mas também através da produção de diferentes elementos, realizada pelo próprio tecido adiposo (WAJCHENBERG, 2000).

O tecido adiposo secreta adipocinas (citocinas produzidas pelos adipócitos) que desempenham importante papel na homeostasia energética, sensibilidade á insulina, resposta imunológica e doença vascular (PRINS, 2002; FANTUZZI, 2005; GREGOIRE, 2001; XU *et al.*, 2003), como por exemplo, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), adipisina, visfatina, leptina, dentre outras (FANTUZZI, 2005).

A idéia que os adipócitos são responsáveis pela produção de hormônios não é nova. Kennedy (1953) propôs que um sinal hormonal produzido pelas reservas de energia estocadas sinalizaria no cérebro para controlar a ingestão de alimento e o gasto energético.

A participação dessas adipocinas nos processos fisiológicos é feita de diferentes maneiras, uma vez que elas podem ter atuação local ou distante do tecido adiposo, através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos (RONTI *et al.*, 2006). Podem por isso ser agrupadas de acordo com a principal função, em adipocinas com função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina (PRINS, 2002).

A interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a adipisina, são adipocinas com função imunológica, embora algumas dessas moléculas tenham ação autócrina ou parácrina, algumas contribuem significativamente para a inflamação sistêmica (BALDO *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL & SPIEGELMAN, 1993; CIANFLONE *et al.*, 1994; RAJALA & SCHERER, 2003).

A interleucina-6 é uma citocina imuno-moduladora com ação pró-inflamatória e endócrina. O tecido adiposo (preferencialmente a gordura visceral) é a principal fonte de IL-6 circulante nos estados não-inflamatórios (PRINS 2002, FANTUZZI, 2005). Assim como o TNF- α , lhe é atribuído um papel na regulação do metabolismo de lipídios e glicose.

Inibe a lipoproteína lipase, induz a lipólise e aumenta a captação de glicose. Sua concentração está elevada na obesidade (tanto os séricos como no tecido adiposo) e diminuem com a perda de peso. Também é um marcador de resistência à insulina (PRINS, 2002; RAJALA & SCHERER, 2003).

O TNF- α recebeu uma atenção especial na última década, devido sua importância na regulação da quantidade de tecido adiposo do organismo. Acreditava-se que este fator era sintetizado e secretado apenas pelo tecido adiposo, tendo uma função parácrina e/ou autócrina no controle de diversas funções dos adipócitos (KERN *et al.*, 1995). Entretanto, pesquisas recentes demonstram que em humanos este fator também é produzido pelas células musculares lisas (RONTI *et al.*, 2006).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida pelo tecido muscular, adiposo e linfóide. Diminui a resposta à insulina através da diminuição da expressão na superfície celular dos transportadores de glicose (GLUT 4), fosforilação do IRS-1 e fosforilação específica do receptor da insulina (PRINS, 2002; CHARRIERE *et al.*, 2003; FANTUZZI, 2005).

Alterações na quantidade de tecido adiposo podem estar relacionadas com mudanças no volume ou no número de adipócitos (WARNE, 2003). As alterações no processo de diferenciação dos pré-adipócitos através da adipogênese, apoptose e replicação dos pré-adipócitos são responsáveis por variações na quantidade destas células (PRINS 2002, XU *et al.*, 2003).

Já os processos de lipólise, lipogênese, e captação de ácidos graxos livres, contribuem para alterar o volume dos adipócitos. Tanto as alterações no número de células quanto no volume celular, são reguladas por diversos fatores, como por exemplo, insulina,

glicocorticóides, citocinas e catecolaminas, e sabe-se que o TNF- α tem um importante papel regulatório em vários destes processos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1997; PRINS, 2002; XU *et al.*, 2003).

A adipisina (moléculas de complemento) foi a primeira proteína identificada produzida pelo adipócito (adpisina ou fator D). Esta proteína intervém na síntese e armazenamento de triglicérides (TG). A sua deficiência (em ratos) está relacionada à diminuição da gordura corporal e aumento da sensibilidade à insulina (PRINS, 2002; HAVEL, 2004). Encontram-se concentrações reduzidas de adipisina na caquexia, jejum e lipodistrofia e aumenta com a ingestão alimentar (PRINS, 2002).

Os estudos destas adipocinas vêm sendo cada vez mais aprofundados para se compreender a participação do tecido adiposo nos processos fisiopatológicos que podem acometer os indivíduos.

São produzidos pelo tecido adiposo todos os componentes do eixo renina-angiotensina. Os adipócitos expressão receptores da angiotensina II. A sua ativação promove a diferenciação do pré-adipócito e a lipogênese, o que sugere um papel do eixo na regulação do metabolismo e do peso corporal, e a produção de angiotensinogênio pelo tecido adiposo é regulada pelo *status* nutricional (GREGOIRE, 2001; PRINS, 2002; RAJALA & SCHERER, 2003).

SZAPARI e colaboradores (2006) demonstraram ação direta da aldosterona na redução da termogênese, aumento da resistência à insulina, aumento da produção de leptina e da citocina MCP-1 (citocina pró-inflamatória).

O aumento da secreção de angiotensina II na obesidade contribui substancialmente para a angiogênese, hipertensão arterial e aterogênese (RAJALA & SCHERER, 2003).

O PAI-I é uma proteína anti-fibrinolítica produzida principalmente pelo fígado, mas também pelo tecido adiposo que é a sua principal fonte na obesidade (PRINS, 2002; TRAYHURN & WOOD, 2005).

A sua produção é estimulada pela insulina e corticóides e sua expressão é regulada pelos PPARs (fatores de transcrição ligante-dependentes) que desempenham importante papel na adipogênese, no metabolismo da glicose e dos lipídios (PRINS, 2002).

A concentração de PAI-I correlaciona-se com a gordura visceral (obesidade central). É um promotor da aterogênese, através do aumento na deposição de plaquetas e fibrina na placa ateromatosa em formação (RAJALA & SCHERER, 2003).

As moléculas com função metabólica são aquelas que desempenham, ou que se supõe que desempenham um papel na homeostasia energética. O tecido adiposo está envolvido, sobretudo com o metabolismo de lipídios e glicídios (GREGOIGE *et al.*, 1998).

Com a ingesta verifica-se o aumento da captação de nutrientes da circulação para os tecidos, particularmente para os tecidos insulino-sensíveis. Nos períodos de jejum o movimento das moléculas energéticas faz-se no sentido oposto (PRINS, 2002). Na obesidade esse fluxo bi-direcional está alterado, devido à disfunção endócrina do tecido adiposo e à diminuição na eficácia dos mecanismos endócrinos no tecido adiposo, fígado e músculos (GREGOIRE, 2001; PRINS, 2002).

Neste grupo estão incluídos os ácidos graxos livres (AGL, XU *et al.*, 2003; PRINS, 2002; DREVON, 2005; STUMVOLL *et al.*, 2005), a adiponectina (GREGOIRE, 2001; PRINS, 2002; XU *et al.*, 2003; RAJALA & SCHERER, 2003; DREVON, 2005), a resistina (GREGOIRE, 2001; FANTUZZI, 2005; MITCHELL *et al.*, 2005), o AGRP (*agouti*, PRINS, 2002; SMITH *et al.*, 2003), a apelina (TATEMOTO *et al.*, 1998; BOUCHER *et al.*, 2005), a visfatina (FANTUZZI, 2005), a adiponectina (BERG *et al.*, 2002).

O paradigma da função endócrina no tecido adiposo é a leptina, fundamental na regulação dos depósitos energéticos e fertilidade (JEQUIER, 2002; PRINS, 2002; HAVEL, 2004; TRAYHURN & WOOD, 2005). Além da produção de leptina o adipócito tem papel importante na interconversão dos hormônios esteróides (PRINS, 2002; ANDREW *et al.*, 2005).

Este conceito da produção hormonal pelo tecido adiposo foi se reforçando ao longo das últimas quatro décadas, sendo confirmado com a descoberta do gene que codifica a leptina e seu receptor (FRIEDMAN & HALAAS, 1998).

Até pouco tempo atrás, a leptina era considerada um hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo. Entretanto, atualmente, já existem registros da produção desse hormônio, em pequenas concentrações, por tecidos como o estômago, intestino, músculo esquelético, placenta, epitélio mamário e cérebro. A leptina está envolvida em diversos processos do metabolismo energético, neuroendócrino, imune e do sistema cardiovascular (AHIMA, 2005).

Dois novos hormônios que recentemente foram descobertos, e que também são produzidos pelo tecido adiposo, são a apelina e a visfatina. A apelina foi identificada em 1998 por Tatemoto *et al.*, que identificou esse hormônio em células do ovário de hamster (TATEMOTO *et al.*, 1998). Apenas recentemente a apelina foi identificada em adipócitos isolados de ratos e no tecido adiposo subcutâneo de humanos (BOUCHER *et al.*, 2005).

Os estudos envolvendo a apelina ainda são poucos, entretanto, sabe-se que a sua produção está diretamente relacionada com insulina e que indivíduos obesos apresentam uma produção maior deste hormônio que indivíduos eutróficos. Em 25 pacientes obesos mórbidos, a concentração de apelina plasmática encontrada foi cinco vezes maior que nos pacientes eutróficos usados como controle (HEINONEN *et al.*, 2005).

Apesar dos poucos estudos existentes, os pesquisadores acreditam que uma das possíveis funções da apelina está relacionada com a regulação da ingesta alimentar (BELTOWSKI, 2006).

Com relação à visfatina, os estudos são mais recentes ainda. Fukuhara *et al.* (2005), identificou genes que são expressos especificamente no tecido adiposo visceral, e que produziam um fator de crescimento que depois foi chamado de visfatina. Os mesmos autores também observaram que a administração de visfatina reduz a glicose plasmática, mas não exerce efeito nas concentrações de insulina. Estes resultados sugerem que a visfatina promove um efeito hipoglicêmico direto, sem estimular a secreção de insulina (FUKUHARA *et al.*, 2005).

A participação da visfatina em outras funções também já foi descrita, como por exemplo, estimular a diferenciação dos pré-adipócitos para adipócitos maduros, induzir o acúmulo de triglicerídeos, e acelerar a síntese de triglicerídeos a partir da glicose (BELTOWSKI, 2006).

A adiponectina é produzida exclusivamente nos adipócitos e circula em altas concentrações plasmáticas (BERG *et al.*, 2002). Em indivíduos eutróficos as concentrações de adiponectina estão elevadas comparadas a de indivíduos obesos, sendo que esta menor concentração nestes indivíduos é associada com resistência à insulina, dislipidemia, aterosclerose, e intolerância a glicose (STATNICK *et al.*, 2000; MAEDA *et al.*, 2002; KUBOTA *et al.*, 2002).

Os estudos destas adipocinas vêm sendo cada vez mais aprofundados para se compreender a participação do tecido adiposo nos processos fisiopatológicos que podem acometer os indivíduos.

A compreensão do funcionamento do tecido adiposo em indivíduos obesos, bem como a relação existente entre as diferentes adipocinas produzidas pelos adipócitos, e patologias associadas à obesidade, proporcionam melhores estratégias na terapia destes distúrbios metabólicos.

1.5 Papel dos adrenoceptores no tecido adiposo

Um dos aspectos estudados no tecido adiposo coletado para realização deste trabalho foi a função lipolítica. Esta função é mediada por agentes lipolíticos que são secretados sempre que há necessidade de substratos energéticos pelo organismo (ROMSOS & LEVEILLE, 1974; GARCIA, 2002).

As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, são exemplos de agentes lipolíticos atuantes em nosso organismo, e já é de conhecimento da comunidade científica que a ação destas catecolaminas é feita através de adrenoceptores (JENSEN *et al.*, 1996; CAREY, 1998).

Os adrenoceptores foram classificados em α e β por Ahlquist (1948) e depois subdivididos nos subtipos 1 e 2 (LANDS *et al.*, 1967a; 1967b). Posteriormente, foi demonstrada a existência de um terceiro subtipo de receptor β , o β_3 , em adipócitos de humanos, ratos e camundongos (KOBILKA *et al.*, 1987; MACHIDA *et al.*, 1990; NAHMIAS *et al.*, 1991).

A distribuição dos subtipos de adrenoceptores varia de acordo com a espécie, o sexo, a idade do animal, dependendo também da região em que o tecido adiposo está localizado (LAFONTAN & BERLAN, 1995).

O mecanismo de ação dos adrenoreceptores varia para cada subtipo. Todos os subtipos β atuam estimulando a adenilil ciclase, uma enzima que promove a quebra do ATP (adenosina trifosfato) aumentando a concentração de AMPc (adenosina monofosfato cíclico).

A interação entre o receptor e a adenilil ciclase é realizada através de uma proteína G estimulatória (G_s) (GILMAN, 1987). Quando essa proteína é estimulada, ocorre o aumento da síntese intracelular de AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA promove a fosforilação da lipase-hormônio-sensível (HSL) e das perilipinas (HOLM *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2000), iniciando o processo de hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (CLIFFORD *et al.*, 2000).

Os receptores α_2 promovem a inibição da adenil ciclase, uma vez que interagem com uma proteína G inibitória (G_i), de maneira que após a ativação α_2 -adrenérgica, ocorre uma diminuição da ativação da PKA (GALITZKY *et al.*, 1993, LANGIN *et al.*, 1996). Embora a maior parte das ações do receptor β_2 esteja relacionada a uma proteína G_s , algumas vezes, estes receptores também podem estar acoplados a uma proteína G inibitória (G_i) (ABRAMSON *et al.*, 1988; XIAO *et al.*, 1995).

A resposta lipolítica é mediada pela participação de quatro subtipos de adrenoreceptores: β_1 , β_2 , β_3 e α_2 (LAFONTAN *et al.*, 1979; RICHELSEN, 1986; MAURIEGE *et al.*, 1987; WAHRENBERG *et al.*, 1989), de maneira que os receptores β estimulam a lipólise, enquanto que o receptor α_2 tem ação contrária atuando no processo de lipogênese. A participação dos receptores α_1 na resposta lipolítica até hoje não é confirmada, entretanto, sabe-se que eles têm participação direta na captação de glicose, e na

síntese e secreção de lactato (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998).

1.6 Produção de lactato pelo tecido adiposo

Uma das vias que fornecem energia para o funcionamento do organismo é denominada glicólise, um processo anaeróbio, que tem como produto final o lactato. Diversos tecidos como os músculos, cérebro e glóbulos vermelhos são responsáveis pela produção de lactato, que em seguida é lançado na corrente sanguínea, e vai para o fígado onde é convertido em glicose, através de uma série de reações que constituem o Ciclo de Cori.

O grupo de DiGirolamo e colaboradores (1989) foi o primeiro a apresentar o tecido adiposo como um importante sítio para a produção de lactato. O lactato é o principal produto da via glicolítica anaeróbica, e também um importante precursor neoglicogênico (DIGIROLAMO *et al.*, 1989).

Vários fatores estão relacionados com a regulação da produção de lactato pelos adipócitos, como por exemplo, o tamanho da célula e a concentração de glicose (DIGIROLAMO *et al.*, 1992). As células adiposas de pequeno tamanho em ratos convertem apenas de 5 a 15% da glicose captada em lactato, enquanto que as células de grande tamanho convertem de 40 a 50% da glicose captada em lactato (CRANDALL *et al.*, 1983; THACKER *et al.*, 1987; NEWBY *et al.*, 1990).

O aumento da concentração de glicose no meio de incubação leva a um aumento da glicose total metabolizada pelos adipócitos em lactato e piruvato (CRANDALL *et al.*, 1983; ATAL *et al.*, 1991). A presença de substâncias como insulina e adrenalina estimulam

esta captação de glicose pelos adipócitos e, conseqüentemente, aumentam a conversão da glicose em lactato (DIGIROLAMO *et al.*, 1992).

A relação entre a concentração de lactato e patologias como a obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, vem sendo cada vez mais estudada na tentativa de entender a participação do lactato nestas condições (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996). Por esta razão, analisamos neste estudo, a quantidade de lactato produzida pelos adipócitos isolados dos indivíduos obesos que participaram da pesquisa.

1.7 Isolamento de adipócitos

A técnica de isolamento de adipócitos foi descrita pela primeira vez por Rodbell (1964), que utilizou como modelo experimental ratos da linhagem Sprague-Dawley. Neste estudo foram verificados os efeitos de hormônios no metabolismo da glicose e na lipólise. Desde então, o advento dessa técnica permitiu que se realizasse um estudo mais detalhado do tecido adiposo, uma vez que se consegue trabalhar com o adipócito isolado.

Ao longo dos anos a técnica original de Rodbell sofreu algumas modificações como o processo de contagem das células adiposas e preparação de uma suspensão celular (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996, modificado). Entretanto, até hoje, os trabalhos que envolvem o estudo com adipócitos isolados, não descrevem com detalhes todas as etapas a serem realizadas para proporcionar um trabalho adequado com estas células.

Desta maneira, a técnica de isolamento de adipócitos vem sendo uma ferramenta extremamente importante para estudar a interação de fármacos e medicamentos com o tecido adiposo, assim como dos mecanismos de funcionamento desse tecido.

Diante destas considerações, este trabalho voltou-se ao estudo da produção de lactato pelo tecido adiposo de indivíduos obesos utilizando-se da técnica de *clamp*

euglicêmico-hiperinsulinêmico para avaliar resistência à insulina nesses indivíduos e posteriormente realizamos análises funcionais do tecido adiposo retirado no dia da cirurgia bariátrica, para ampliarmos o conhecimento do comportamento dessas células quanto à produção de glicerol e lactato frente a estímulos de diferentes agonistas e antagonistas, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos de produção de glicerol e lactato em adipócitos isolados de indivíduos obesos, o que é imprescindível para entender condições patofisiológicas como obesidade e diabetes tipo II.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar a produção de lactato em indivíduos eutróficos e obesos mórbidos.

Objetivos específicos

Quantificar a lactatemia em indivíduos eutróficos e obesos mórbidos em situação de jejum e durante a realização do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico.

Avaliar possíveis correlações com a glicemia, índice de HOMA e insulinemia e índice de massa corpórea dos voluntários.

Implantar e padronizar a técnica de isolamento de adipócitos de tecido adiposo de indivíduos obesos.

Quantificar a produção de glicerol e lactato de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos.

Identificar, através de ensaios farmacológicos, os receptores α_1 -adrenérgicos e seus subtipos envolvidos na produção de lactato pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos mórbidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos Experimentais

Os voluntários deste estudo foram homens e mulheres na faixa dos 20-50 anos, que apresentaram peso normal ($IMC < 25$, aqueles que participaram do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico) e obesos mórbidos ($IMC \geq 35$).

As análises *in vivo* foram realizadas com voluntários que foram submetidos ao ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico realizado na Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas – UNICAMP, sob supervisão das Profs Dras Elza Muscelli e Sarah Montealegre.

Os ensaios *in vitro* foram realizados com adipócitos isolados do tecido adiposo visceral (epiplon) de homens e mulheres obesos mórbidos. Estes voluntários foram submetidos à cirurgia bariátrica, realizada pela equipe do Dr. José Carlos Pareja no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp. Estes voluntários passaram por uma avaliação médica e exames de sangue de rotina realizados antes da cirurgia feitos pelo HC-Unicamp, conforme estabelecido pelas normas do Hospital das Clínicas, sendo aqueles que estivessem aptos a realizar a cirurgia possíveis doadores de tecido adiposo, desde que concordasse assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo1 - Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp sob o número 097/2003).

Os resultados de adipócitos isolados de voluntários eutróficos são resultados obtidos em nosso laboratório, no mesmo período, e foram utilizados para análise comparativa, eutrófico vs obesos (CREGE, 2006).

3.2 Critérios de exclusão

Nos primeiros anos de coleta de amostras não houve critério de exclusão para os paciente doadores de tecido adiposo, pois o grupo de cirurgiões operava por uma mesma técnica de redução de estômago (bypass-capella) aqueles indivíduos selecionados para o estudo metabólico. Sendo processados todos os tecidos adiposos que nos foram fornecidos, com o controle total de todos os dados relacionados aos sujeitos experimentais.

No último ano de coleta, o grupo de cirurgiões iniciou outra técnica de cirurgia, a de Scopinaro ou derivação bÍleo-pancreática (SCOPINARO *et al.*, 1979), o que nos fez excluir este grupo de indivíduos tendo em vista que os voluntários submetidos a esta técnica cirúrgica possuíam diabetes clinicamente comprovada, portanto não foram coletadas amostras destes indivíduos.

Tabela 1. Classificação de sobrepeso e da obesidade de acordo com base no índice de massa corporal (IMC), onde $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m)}^2$.

	IMC
Baixo peso	Menor de 18,5
Normal ou eutróficos	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade	
Classe I	30 – 34,9
Classe II	35 – 39,9
Classe III (extrema)	Maior de 40

(GREENSPAN, 2006)

3.3 Amostragem sanguínea

As coletas de sangue foram realizadas no dia do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico nos tempo de jejum e ao longo de 120 minutos de ensaio. As análises de insulina e glicose plasmáticas foram realizadas pelo Hospital das Clínicas da Unicamp, e foram utilizadas por nós para calcular o índice de HOMA ($IR = FIRI \times FPG / 22,5$) onde FIRI é a concentração plasmática de insulina ($\mu\text{U/mL}$) e FPG é a concentração plasmática de glicose no jejum (mmol/L) de cada indivíduo (MATTHEWS *et al.*, 1985).

3.4 Isolamento de Adipócitos

O procedimento de isolamento de adipócitos do tecido adiposo humano foi realizado segundo Crege, 2006, descrita a seguir.

O tecido adiposo visceral coletado foi colocado em um recipiente estéril contendo solução de KREBS-RINGER-HEPES (KR-HEPES) fria ($\pm 4^\circ\text{C}$), pH 7,4 e levado imediatamente para o laboratório onde se realizou o procedimento. A quantidade de tampão KR-HEPES utilizada para coletar o tecido adiposo em cada experimento foi de 200 mL. O preparo do tampão KR-HEPES envolve duas etapas. A primeira delas é a preparação de 200 mL do tampão KREBS-RINGER, que é constituído por 200 mL de NaCl (0,154 M), 8 mL de KCl (0,154 M), 6 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,110 M), 2 mL de KH_2PO_4 (0,154 M), 2 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,154 M). Em seguida, é feita uma mistura deste tampão KR com NaHCO_3 , na proporção de 91% de KR e 9% de NaHCO_3 , portanto, para se fazer 200 mL utilizamos 182 mL de KR e 18 mL de NaHCO_3 . Para completar o tampão é adicionadas glicose e hepes. Para o volume de 200 mL, adicionamos 0,476 g de Hapes e 0,216 g de glicose, obtendo no tampão, a concentração de 25 mM para o Hapes e 6 mM de glicose.

Para realização da digestão do tecido adiposo e do ensaio funcional com os adipócitos isolados, foi preparado 200 mL de um novo tampão KR-HEPES, porém com adição de 6 g de albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos graxos). Para cada 100 mL de KR-HEPES adiciona-se 3 g de albumina. Esse novo tampão recebe o nome de KRBA (KREBS-RINGER BICARBONATO ALBUMINA).

A digestão do tecido foi realizada em quatro a cinco tubos de polietileno (50 mL) tipo *falcon*, contendo cada um cerca de 3 g de tecido adiposo picado, em um meio contendo 6 mL de KRBA com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*).

Os tubos foram agitados em 60 ciclos/min. a 37°C durante 45 minutos. A suspensão celular resultante de cada um dos *falcons* foi filtrada através de uma malha de *nylon* para um novo *falcon*. Com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, o infranadante foi removido, permanecendo no interior do tubo apenas as células. Em seguida, adicionamos 6 mL do tampão KRBA e esperamos 3 minutos até que a maioria das células adiposas flutuassem. Seguiu-se então uma nova aspiração do infranadante e uma nova lavagem das células. Este procedimento foi repetido três vezes e após a última lavagem o volume do *falcon* foi acertado para 12 mL (RODBELL, 1964 adaptado por CREGE, 2006).

3.5 Contagem das Células

Após a preparação dos adipócitos, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular final é pipetada em um tubo de ensaio e adiciona-se mais 900 µL de KRBA para obter uma diluição de 1:10. Desta nova suspensão celular são pipetados 10 µL em uma câmara de *Mallassez* (Figura 1), que é levada ao microscópio óptico a fim de constatar a integridade e realizar a contagem do número de células adiposas presentes no campo demarcado da

câmara e, assim, ajustar a concentração de células em 100.000 células/mL conforme Faintrenie & Géloën (1996), e adaptado para estudos em humanos (CREGE, 2006).

Este procedimento de contagem dos adipócitos foi feito por quatro vezes, e em seguida fez-se a média dos valores obtidos. A partir desta média realizou-se a multiplicação deste valor pelo fator de diluição que, conforme descrito anteriormente, foi de 10 vezes.

Para ajustar o valor para 100.000 células/mL, divide-se 100 pelo valor encontrado na etapa anterior. Este novo número deve ser multiplicado por 1000 para transformar mL em μL , de maneira que o valor encontrado corresponde a quantidade de μL que deve ser pipetada do *falcon* para se obter 100.000 células.

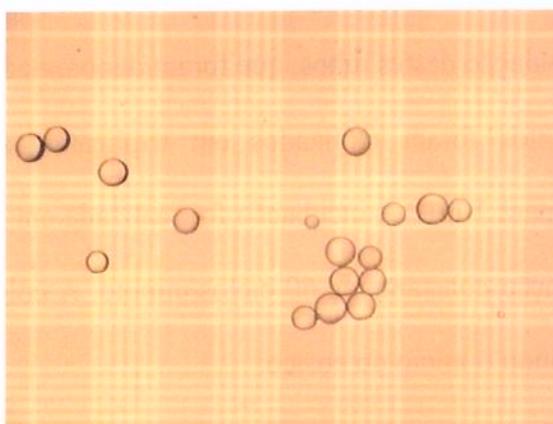


Figura 1. Câmara de *Mallassez* contendo adipócitos isolados para realização da contagem. Imagem obtida de microscópio óptico em aumento de 50 vezes.

3.6 Estudo Farmacológico

Uma vez realizada a contagem, bem como o ajuste do volume para concentração de 100.000 células/mL foi iniciada a incubação dos adipócitos. As células foram incubadas

com o agonista seletivo ou não: noradrenalina de 0,001 μM a 1 μM ; insulina de 50 a 500 $\mu\text{U/mL}$; cirazolina de 10 pM a 10 μM (GELLAI & RUFFOLO, 1987) e quando necessário, utilizamos também antagonistas: 1 μM de prazosin, não seletivo para os subtipos de adrenoreceptores α (PAUL *et al.*, 1999); bem como 1 nM de WB4101 antagonista seletivo α_{1A} (HEIBL *et al.*, 1995) e 10 nM de BMY 7378, antagonista seletivo α_{1D} (PIASCIK *et al.*, 1995).

Para determinação do valor basal, os adipócitos foram incubados conforme descrito abaixo, na ausência de agonistas ou antagonistas. Foram preparados também *ependorfs* contendo suspensão celular e solução tampão, que foram imediatamente colocados em gelo picado logo após o processo de digestão. Os valores de glicerol e lactato obtidos a partir destes ensaios foram utilizados para descontar os valores de lipólise e/ou glicólise decorrentes da manipulação destes tubos, que foram denominados “gelo”.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo o volume final dos *ependorfs* acertado para 1 mL. A incubação foi realizada em banho-maria a 37°C durante 60 minutos, sob agitação constante de 60 ciclos/minuto. A colocação da suspensão celular no *ependorf* determinou o início do ensaio.

A reação foi finalizada após esse período colocando-se as amostras em gelo picado. Após a permanência das células no gelo por 40 minutos, os adipócitos foram retirados do meio de incubação através da aspiração e o infranadante foi imediatamente congelado e armazenado a -20°C para posterior análise da concentração de glicerol e lactato com *kit* apropriado.

3.7 Determinação do Glicerol no Meio de Incubação

O índice de lipólise foi avaliado pela quantidade de glicerol produzida no meio de incubação. Este glicerol, presente no meio de incubação foi quantificado através de reações catalisadas pelas enzimas glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase (*kit* de triglicerídeos da Laborlab, SP, Brasil).

O glicerol é fosforilado pela adenosina trifosfato (ATP) formando glicerol-1-fosfato e ADP, sendo esta reação catalisada pela glicerol quinase. O glicerol-1-fosfato é então oxidado pela enzima glicerol fosfato oxidase em fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A coloração é então produzida pela reação catalisada pela peroxidase.

Antes de iniciar o experimento foram feitas curvas com concentração conhecida de glicerol. Foram preparados cinco *ependorfs* contendo a solução padrão de glicerol e tampão KRBA e um *ependorf* contendo apenas tampão KRBA, que chamamos de “zero”. As concentrações conhecidas foram 5 µg/ 200 mL (5 mL da solução padrão + 195 mL de KRBA), 10 µg/ 200 mL (10 mL da solução padrão + 190 mL de KRBA), 20 µg/ 200 mL (20 mL da solução padrão + 180 mL de KRBA) 25 µg/ 200 mL (25 mL da solução padrão + 175 mL de KRBA) e 50 µg/ 200 mL (50 mL da solução padrão + 150 mL de KRBA), que compreendia o valor da liberação de glicerol em adipócitos.

Para análise da quantidade de glicerol liberada foi utilizada uma placa de Elisa, e nos *wells* foram pipetadas alíquotas de 10 µL para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10 µL de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10 µL da amostra de cada *ependorf* do ensaio

funcional. Em seguida, foi adicionado 50 μL do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Transcorrido este tempo a reação foi parada adicionando-se 50 mL de água mili Q gelada em todos os *wells* e, imediatamente após a adição da água, foi realizada a leitura da concentração de glicerol através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm.

A concentração de glicerol no meio de incubação foi expressa em μmol de glicerol em 10^6 células/60 minutos (FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1996, modificado)

3.8 Determinação do Lactato no Meio de Incubação

Para a determinação da concentração de lactato presente no meio de incubação dos adipócitos, foi utilizado *kit* enzimático da Trinity (código 735-10).

O ácido láctico é convertido em piruvato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela lactato oxidase. Na presença do H_2O_2 formado, a peroxidase catalisa a oxidação de um precursor cromogênico que produz a coloração.

Da mesma maneira que o ensaio realizado para determinar a quantidade de glicerol liberada pelos adipócitos, inicialmente é preparada uma curva com concentrações conhecidas de lactato. São preparados sete *ependorfs* contendo diferentes quantidades da solução padrão que acompanha o *kit*, e de KRBA.

A partir do ponto 444 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (50 μL da solução padrão + 450 μL de KRBA) são preparados os outros pontos da curva: 341 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 μL da solução 444 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 30 μL de KRBA); 296 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 μL da solução 444 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 50 μL de KRBA); 222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (75 μL da solução 444 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 75 μL de KRBA); 148 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 μL da solução 444 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +

200 μL de KRBA); 74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 μL da solução 148 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 100 μL de KRBA); 37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (75 μL da solução 74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 75 μL de KRBA). Também é considerado um ponto zero para a curva, que contém apenas KRBA.

Para análise da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos utilizamos uma placa de Elisa, e nos *wells* pipetamos aliquotas de 10 μL para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10 μL de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10 μL da amostra de cada *ependorf* do ensaio funcional. Em seguida, foi adicionado 90 μL do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C e, para prevenir a degradação do lactato pela ação luminosa, a placa deve ser envolvida em papel alumínio. Após a incubação é feita a leitura da concentração de lactato através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996, modificado).

4. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias \pm EPM (n), onde “n” indica o número de ensaios realizados. Os resultados dos experimentos de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos foram realizados em triplicata e em dias diferentes. Os valores foram analisados através de ANOVA seguida do teste de Tukey ou Dunnet, para amostras não pareadas, ou teste “t” para amostras pareadas. Foi também realizada a análise de correlação utilizando Spearman. O índice de significância foi estabelecido em 5%. O programam utilizado para as análises estatísticas foi o “software” Prisma (Graphpad Software Inc., USA).

5. RESULTADOS

Ensaio *in vivo*

Em nossos ensaios demonstramos que dentre os indivíduos analisados (tabela 2), que realizaram o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, 6 eram eutróficos ($IMC \leq 25$): 3 do sexo feminino e 3 do sexo masculino e 17 eram do grupo de obesos ($IMC \geq 35$): 11 eram do sexo feminino e 6 do sexo masculino. A idade dos indivíduos analisados não apresentou diferença estatística apresentando um valor médio de $35,75 \pm 0,5$ anos. A tabela 2 mostra os dados para o IMC e idade dos indivíduos analisados.

Os indivíduos participantes deste trabalho que apresentaram $IMC < 25$, os caracterizava como eutróficos e os indivíduos com $IMC > 30$ os caracterizava como obesos. O valor de IMC dos indivíduos eutróficos do sexo feminino foi de $22 \pm 1 \text{ kg/m}^2$ e dos indivíduos masculino foi de $24 \pm 0 \text{ Kg/m}^2$. Não foi encontrada diferença significativa entre esses valores. Já para os indivíduos obesos, o valor de IMC das mulheres foi igual a $46 \pm 2 \text{ Kg/m}^2$ e para os homens foi de $60 \pm 4 \text{ Kg/m}^2$. Neste caso, encontramos diferença significativa entre os valores de mulheres e homens obesos (tabela 2).

Tabela 2. Idade (anos), Índice de Massa Corporal (IMC = kg/m²) e concentração de lactato no jejum dos indivíduos analisados. Os valores estão expressos em média \pm EPM, e o n indica o número de indivíduos analisados.

	EUTRÓFICO		OBESO	
	Mulheres (n= 3)	Homens (n = 3)	Mulheres (n = 11)	Homens (n = 6)
Idade (anos)	35 \pm 5	36 \pm 11	37 \pm 2	35 \pm 5
IMC (kg/m²)	22 \pm 1	24 \pm 0	46 \pm 2*	60 \pm 4* [#]

*Mulheres Obesas vs Mulheres Eutróficas; Homens Obesos vs Homens Eutróficos (p< 0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey).

[#] Homens Obesos vs Mulheres Obesas (p<0,01, ANOVA seguida do teste de Tukey).

Destes mesmos indivíduos que participaram do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, analisamos as concentrações de glicose, insulina para o cálculo do índice de HOMA e quantificamos também a concentração sanguínea de lactato. Os resultados estão apresentados ponto a ponto (média \pm EPM) e como AUC (área sob a curva). As amostras foram coletadas antes e durante o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, e os resultados estão apresentados nas figuras 3 a 6 e tabela 3.

Concentração plasmática de glicose

As concentrações plasmáticas de glicose dos diferentes grupos não diferiram significativamente. Sendo mantida a euglicemia durante todo o tempo (figura 2 e tabela 3).

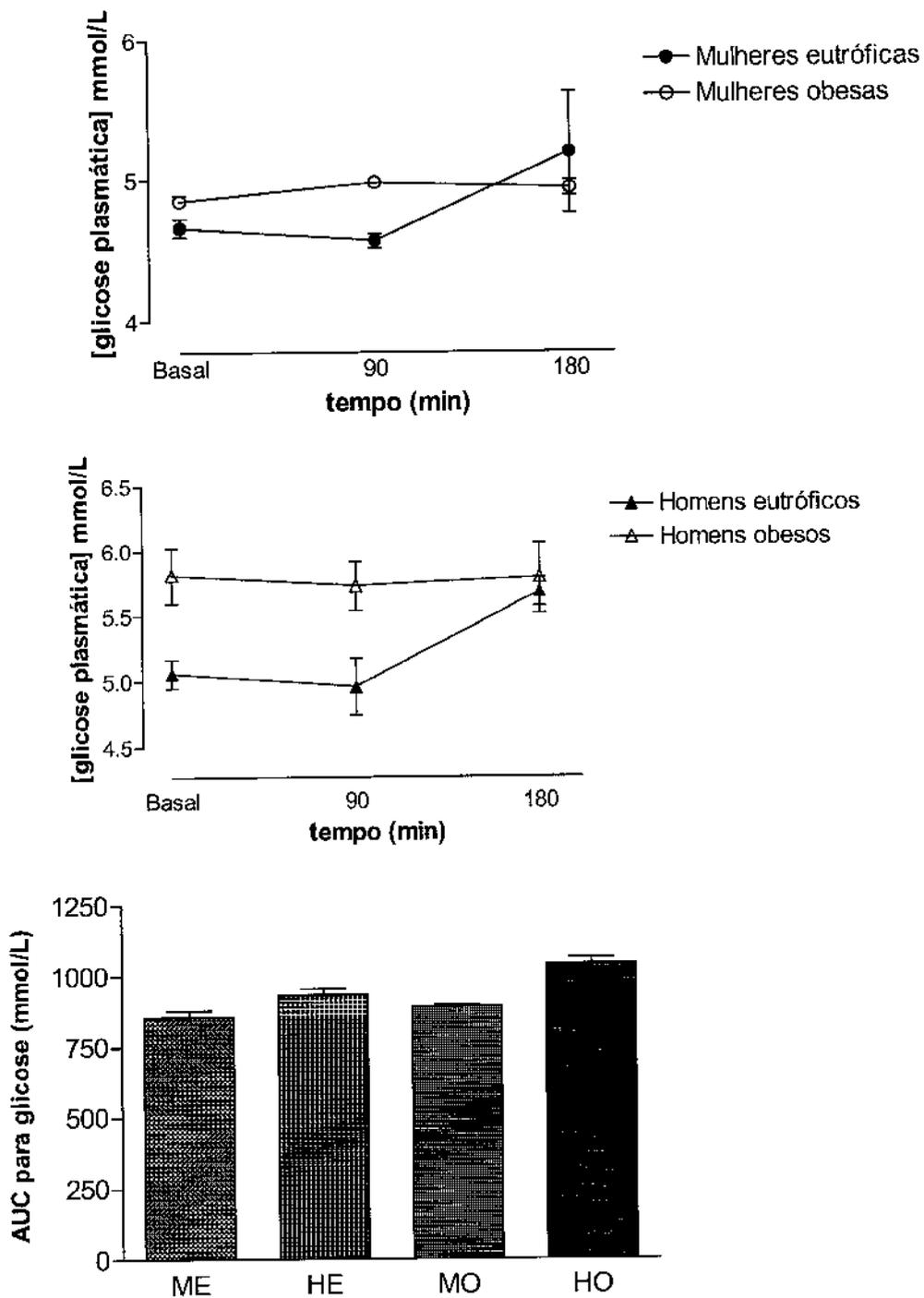


Figura 3 – Concentrações plasmáticas de glicose (médias \pm EPM em mmol/L) e áreas sob a curva (AUC) para glicose (médias \pm EPM em mmol/L) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo ● com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo ○ com $n = 11$) e em voluntários homens eutróficos (HE, símbolo ▲ com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo △ com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*). Não houve diferença estatística entre tempos ou grupos.

Concentração plasmática de insulina

A insulinemia de jejum dos indivíduos obesos, tanto homens quanto mulheres, apresentou-se bastante elevada em relação aos seus respectivos controles. Estes valores não foram significativos quando analisados pela ANOVA seguida de Tukey, porém, quando analisados pelo teste *t* de Student, a insulinemia de jejum de mulheres obesas foi significativamente maior que de mulheres eutróficas. Entretanto, mesmo utilizando esta última análise os valores de insulinemia de jejum de homens obesos não foram significativamente maiores do que aqueles de homens eutróficos (respectivamente: 56 ± 21 $\mu\text{U/mL}$ vs 10 ± 1 $\mu\text{U/mL}$). Provavelmente este fato se deva a variação amostral associada ao número reduzido de voluntários coletados (tabela 3).

A concentração plasmática de insulina aumentou significativamente no tempo 90 min após o início do *clamp* em relação ao jejum em todos os grupos estudados. A hiperinsulinemia foi mantida alta até o tempo 180 min em todos os grupos (figura 4 e tabela 3).

A análise da área sob a curva (AUC) da insulina apontou para um aumento significativo da área da insulina para o grupo de homens obesos em relação às mulheres obesas ($p < 0,05$, ANOVA seguida de Tukey). Não foi encontrada, para este índice, nenhuma diferença significativa entre os sexos nos diferentes tempos do *clamp* (figura 4).

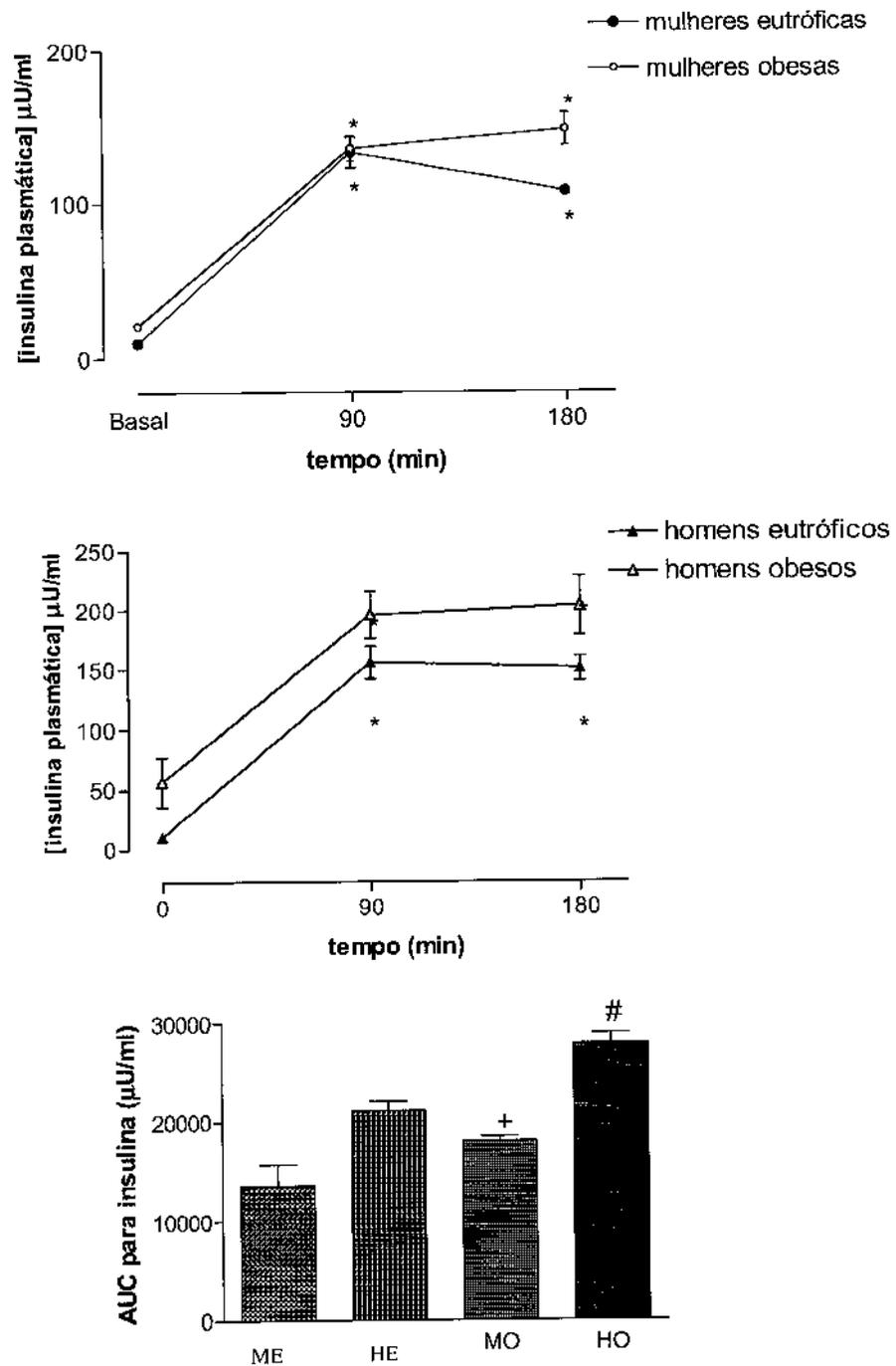


Figura 4 – Concentrações plasmáticas de insulina (médias \pm EPM em $\mu\text{U/ml}$) e AUC (médias \pm EPM em $\mu\text{U/ml}$) de voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo \bullet com $n=3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo \circ com $n=11$) e em voluntários homens, eutróficos (HE, símbolo \blacktriangle com $n=3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo \triangle com $n=6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*). A ANOVA seguida do teste de Tukey com $p<0,05$, foi significativa para: *MO jejum vs MO 90; MO jejum vs MO 180; ME jejum vs ME 90; ME jejum vs ME 180; [#]AUC de HO vs MO e no teste *t* de Student: ⁺AUC de MO vs ME.

Índice de HOMA

O índice de HOMA aumentou significativamente no tempo de 90 min após o início do *clamp* em relação ao jejum em todos os grupos estudados. Este aumento foi mantido até o tempo de 180 min em todos os grupos (figura 5 e tabela 2).

Além disto os valores do índice de HOMA obtidos de homens obesos foram significativamente maiores que aqueles de mulheres obesas nos tempos 90 e 180 min após o início do *clamp* (figura 5 e tabela 3).

A análise da AUC mostrou também diferença significativa entre homens e mulheres obesas e entre homens obesos e homens eutróficos. O índice de HOMA foi significativamente maior inclusive entre os sexos nos tempos 90 e 180 minutos de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (figura 5 e tabela 3).

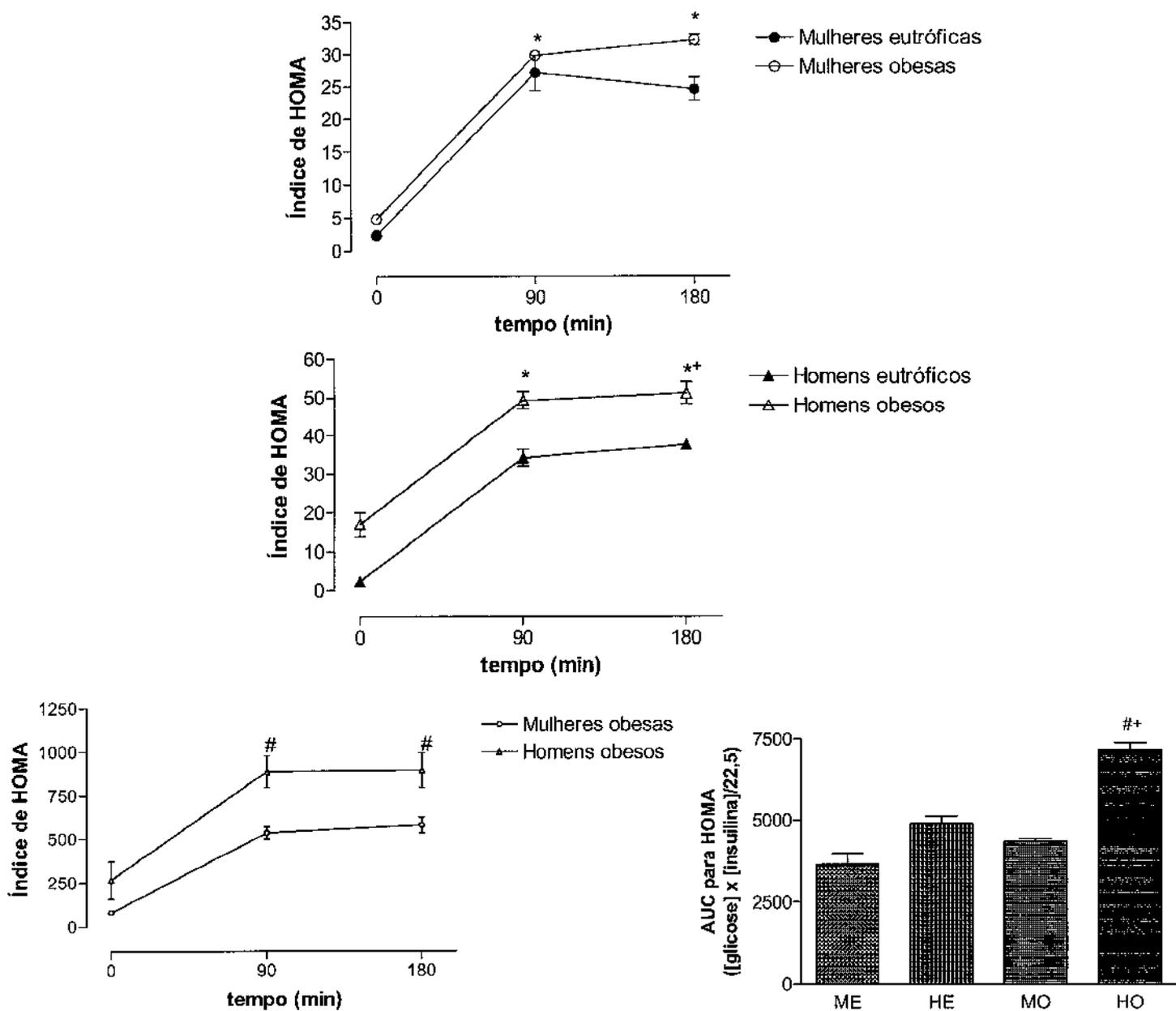


Figura 5 – Índices de HOMA (médias \pm EPM) calculados a partir da fórmula: $[\text{glicose}] \times [\text{insulina}] / 22,5$ e AUC (médias \pm EPM) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens eutróficos (HE, símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo Δ com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*). A ANOVA seguida do teste de Tukey com $p < 0,05$, foi significativa para: *MO jejum vs MO 90; MO jejum vs MO 180; ME jejum vs ME 90; ME jejum vs ME 180; #MO vs HO; MO 90 vs HO 90; MO 180 vs HO 180; +HO vs HE.

Concentração plasmática de lactato

Os valores plasmáticos de lactato no jejum já demonstraram que os voluntários obesos, tanto homens como mulheres, apresentavam uma significativa hiperlactatemia. Os voluntários obesos homens apresentaram também uma hiperlactatemia significativa no tempo 90 min, em relação ao mesmo tempo em amostras de homens eutróficos.

A concentração plasmática de lactato foi alterada ao longo da realização do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (figura 6 e tabela 3), de forma a diminuir significativamente no tempo 180 minutos em relação ao jejum, para os voluntários eutróficos homens e mulheres bem como para os voluntários obesos tanto homens como mulheres. Em relação às amostras obtidas de obesos homens também houve uma queda significativa da lactatemia já no tempo de 90 min em relação ao jejum e as amostras obtidas no tempo 180 foram significativamente inferiores àquelas do tempo 90 min.

Os valores da lactatemia obtidos em mulheres da população obesa no tempo 180 minutos não foram estatisticamente diferentes da lactatemia obtida no tempo zero das voluntárias eutróficas (mulheres: obesas 180 min *vs* eutrófica basal – 1282 ± 146 *vs* 912 ± 305 μM), entretanto foi significativamente inferior para os homens (homens obesos 180 min *vs* eutrófico basal – 858 ± 42 *vs* 1154 ± 113 μM).

Mesmo com a redução na concentração plasmática de lactato ao longo do tempo, quando os resultados foram analisados como AUC, observamos um aumento significativo do grupo de mulheres obesas em relação ao grupo de mulheres eutróficas.

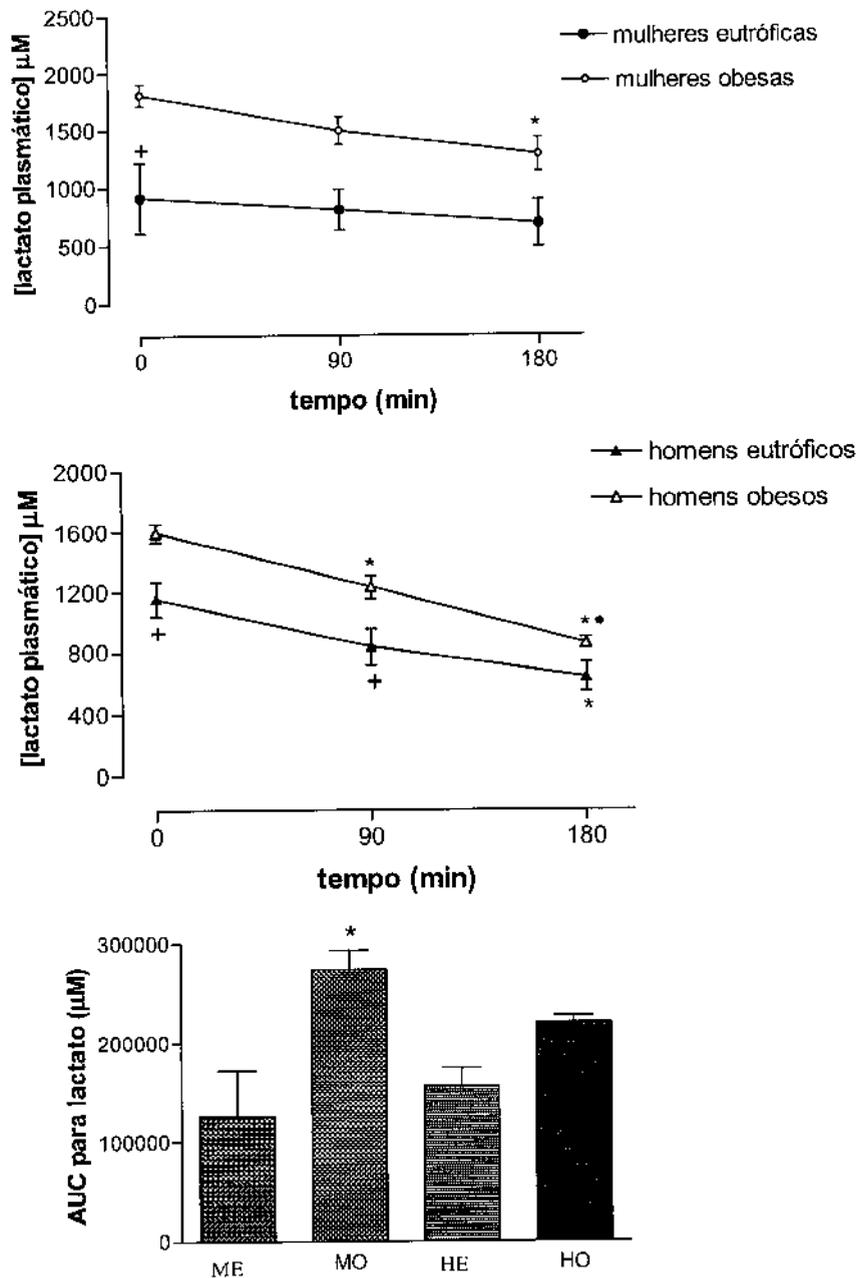


Figura 6 – Concentrações plasmáticas de lactato (médias \pm EPM em μM) e AUC (médias \pm EPM em μM) em voluntárias mulheres eutróficas (ME, símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens eutróficos (HE, símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo \triangle com $n = 6$), antes (tempo 0) e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico (90 e 180 minutos após o início do *clamp*). A ANOVA seguida do teste de Tukey com $p < 0,05$, foi significativa para: *MO jejum vs MO 180; HO jejum vs HO 90; HO jejum vs HO 180; HE jejum vs HE 180; +MO jejum vs ME jejum; HO jejum vs HE jejum; AUC ME vs MO; *HO 180 vs HE jejum.

Tabela 3 Concentrações plasmáticas (médias \pm EPM) de glicose (mmol/L), insulina (μ U/mL), lactato (μ M) e área sob a curva (AUC), de voluntários homens (H, n=3) e mulheres (M, n=3) eutróficos (E) e obesos mórbidos (O, homens, n=6; mulheres, n=11) antes e durante o ensaio de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. O índice de HOMA foi calculado utilizando a fórmula: [glicose] x [insulina]/22,5. Análise estatística: ANOVA seguida de Tukey ou teste *t* de Student, quando necessário.

	EUTRÓFICO		OBESO	
	Mulheres (n= 3)	Homens (n= 3)	Mulheres (n = 11)	Homens (n = 6)
Glicose				
Jejum	4,66 \pm 0,09	5,06 \pm 0,18	4,85 \pm 0,14	5,81 \pm 0,48
90 min	4,57 \pm 0,07	4,96 \pm 0,37	4,98 \pm 0,12	5,73 \pm 0,42
180 min	5,19 \pm 0,61	5,68 \pm 0,19	4,94 \pm 0,17	5,79 \pm 0,61
AUC da glicose	854,2 \pm 29,6	929,5 \pm 38,09	888,2 \pm 19,4	1038 \pm 49,19
Insulina				
Jejum	10 \pm 1	10 \pm 1	21 \pm 2 ⁺	56 \pm 21
90 min	132 \pm 10 [*]	155 \pm 14 [*]	135 \pm 8 [*]	195 \pm 20 [*]
180 min	107 \pm 2 [*]	102 \pm 3 [*]	147 \pm 11 [*]	203 \pm 25 [*]
AUC da insulina	13576 \pm 3785	21193 \pm 1523	18052 \pm 1434 ⁺	27922 \pm 2689 [#]
Índice de HOMA				
Jejum	2,34 \pm 0,19	2,29 \pm 0,14	4,74 \pm 0,41	16,92 \pm 6,66
90 min	27,04 \pm 3,86 [*]	34,17 \pm 3,93 [*]	29,75 \pm 1,94 [*]	49,24 \pm 5,06 [#]
180 min	24,53 \pm 2,54 [*]	37,70 \pm 1,53 [*]	32,13 \pm 2,53 [*]	51,13 \pm 6,50 [#]
AUC de HOMA	3643 \pm 453	4875 \pm 402,3	4336 \pm 258,2	7147 \pm 498,2 ^{#+}
Lactato				
Jejum	912 \pm 305	1154 \pm 113	1807 \pm 98 ⁺	1594 \pm 65 ⁺
90 min	805 \pm 175	833 \pm 121	1488 \pm 122	1230 \pm 75 ⁺⁺
180 min	685 \pm 199 [*]	635 \pm 94 [*]	1282 \pm 146 [*]	858 \pm 42 ^{**♦}
AUC de lactato	125800 \pm 46530	15550 \pm 19110	274400 \pm 19050 ⁺	220100 \pm 6459

* $p < 0,05$ para os tempos 90 e 180 vs jejum no mesmo grupo; # $p < 0,05$ quando analisadas diferenças entre sexo no mesmo tempo.

• $p < 0,05$ diferenças entre os tempos 180 vs 90 no mesmo grupo; + $p < 0,05$ quando analisados o mesmo tempo em relação ao seu controle; ♦ diferenças entre os tempos 180 vs jejum entre grupos diferentes no mesmo sexo.

Correlação entre concentração de lactato plasmática e IMC ou tempo de clamp

As correlações foram estabelecidas num primeiro momento entre o IMC e a concentração de lactato sanguíneo nos tempos antes (0 ou basal, figura 7), 90 minutos (figura 8) e 180 minutos (figura 9) após o início *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Não foi possível demonstrar correlação entre esses parâmetros, quando os dados foram analisados respeitando o gênero. Por outro lado, o grupo obeso mórbido (homens e mulheres) apresentou uma correlação negativa significativa entre IMC e a concentração de lactato plasmática no tempo zero ($p= 0,028$, figura 10).

Analisamos também a correlação entre a concentração de lactato plasmático e os tempos do *clamp*: antes do *clamp* (basal ou jejum), 90 e 180 minutos respectivamente. Houve correlação significativa em: MO, HC e HO. Entretanto não houve correlação entre a concentração de lactato plasmático e tempo de *clamp* para o grupo ME (figura 11).

Como houve uma queda importante nas concentrações plasmáticas de lactato resolvemos verificar se o tempo 180 min, sob as condições de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, seria suficiente para trazer a lactatemia a valores basais encontrados no grupo de eutróficos. Comparamos então as médias (teste *t* de Student) de concentração de lactato no tempo (basal/jejum) do grupo eutrófico (homens e mulheres) com a concentração de lactato no tempo 180 de *clamp* do grupo obeso mórbido (homens e mulheres) e não foram observadas diferenças significativas entre as duas médias (E: $1033 \pm 155,2 \mu\text{M}$, $n= 6$ vs O: $1132 \pm 106,8 \mu\text{M}$, $n= 17$, figura 12).

Os resultados demonstraram que sob as condições *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, ocorre um retorno a normalidade nas concentrações de lactato plasmática.

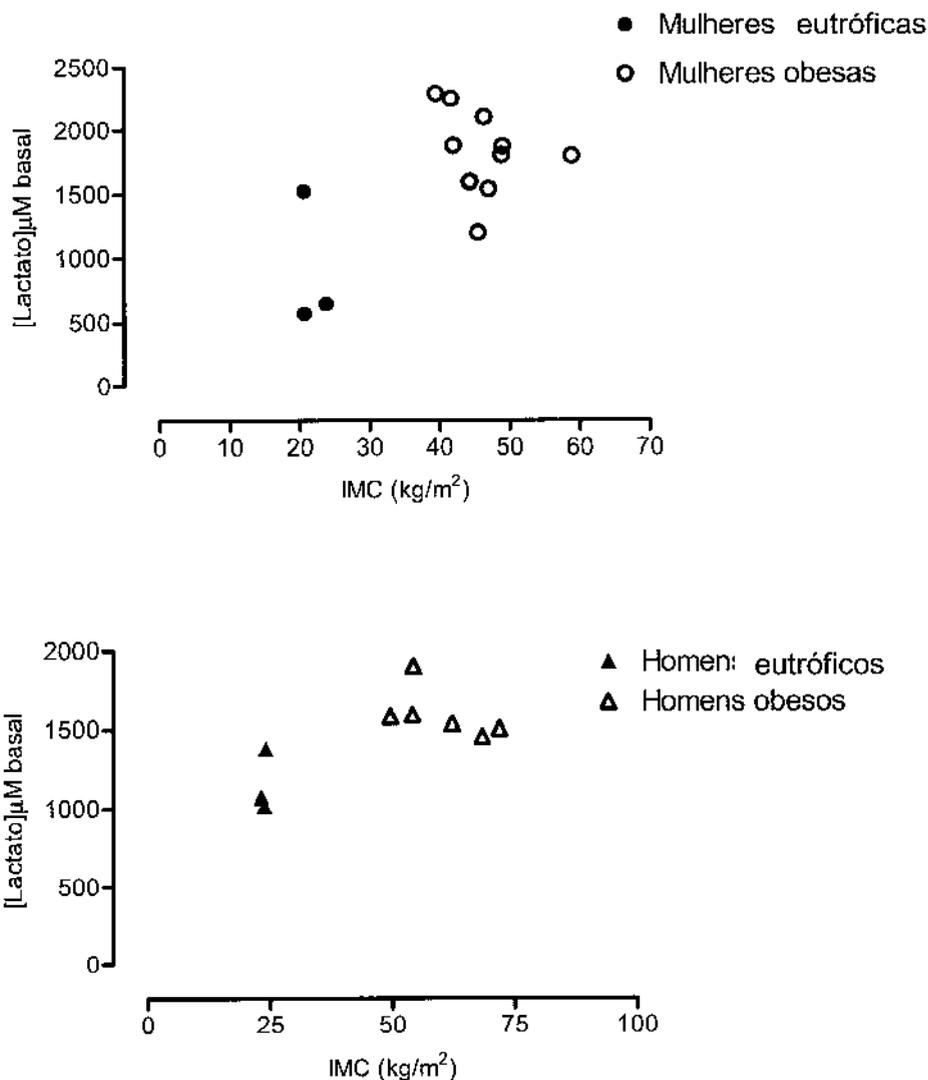


Figura 7 – Correlações entre IMC (kg/m^2) e lactato plasmático (μM) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (HE, símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo \triangle com $n = 6$), antes (tempo 0/ basal) do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado r de Spearman para determinar se havia correlação entre os parâmetros adotados e foi aceito como correlação significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. Não houve correlação significativa (mulheres eutróficas $r = -0,50$; mulheres obesas $r = -0,41$; homens eutróficos $r = 0,50$; homens obesos $r = -0,71$).

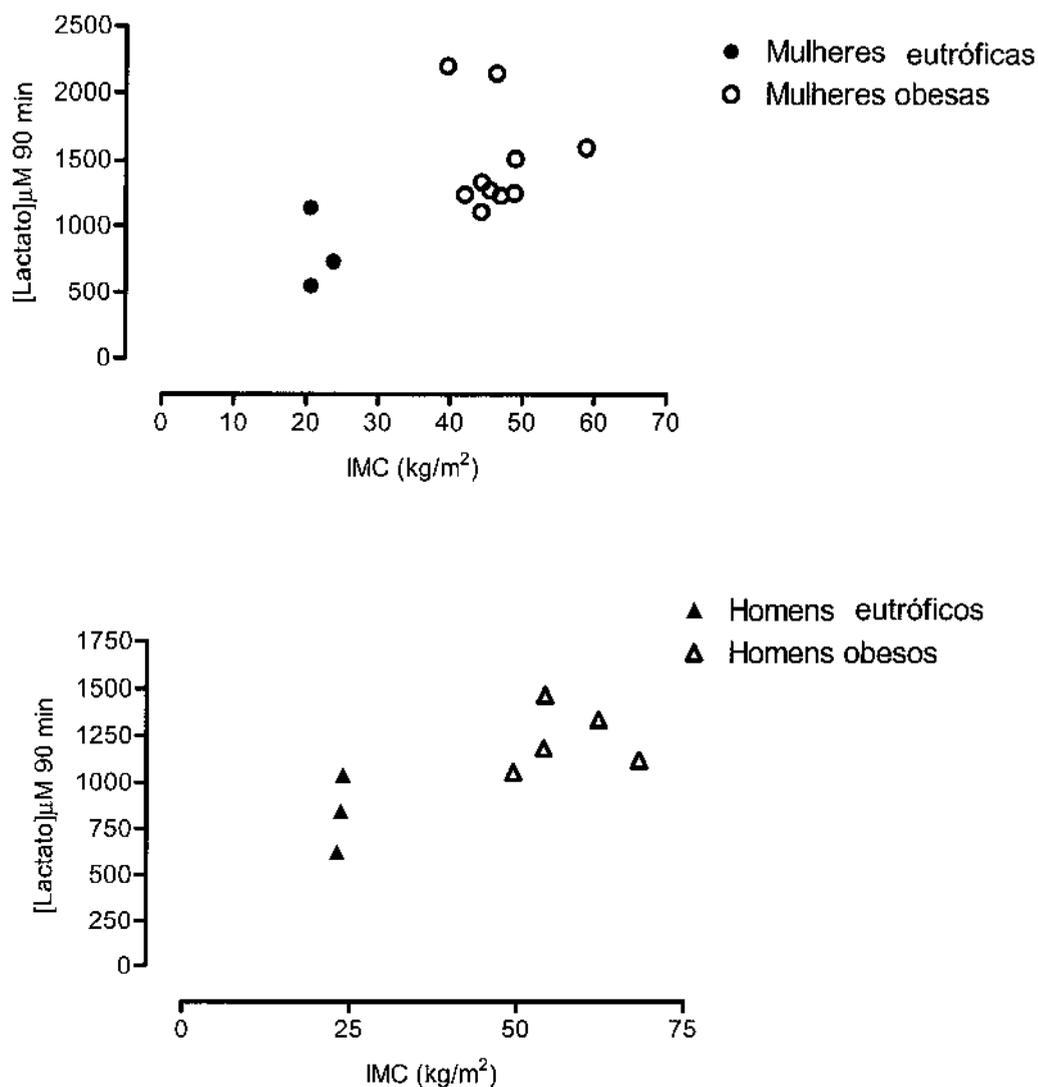


Figura 8 – Correlações entre IMC (kg/m^2) e lactato plasmático (μM) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo ● com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo ○ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (HE, símbolo ▲ com $n = 3$) e obesos mórbidos (MO, símbolo △ com $n = 6$), no tempo 90 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado r de Spearman para determinar se havia correlação entre os parâmetros adotados e foi aceito como correlação significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. Não houve correlação significativa entre as amostras analisadas (mulheres eutróficas $r = -0,50$; mulheres obesas $r = 0,10$; homens eutróficos $r = 1,00$; homens obesos $r = 0,30$).

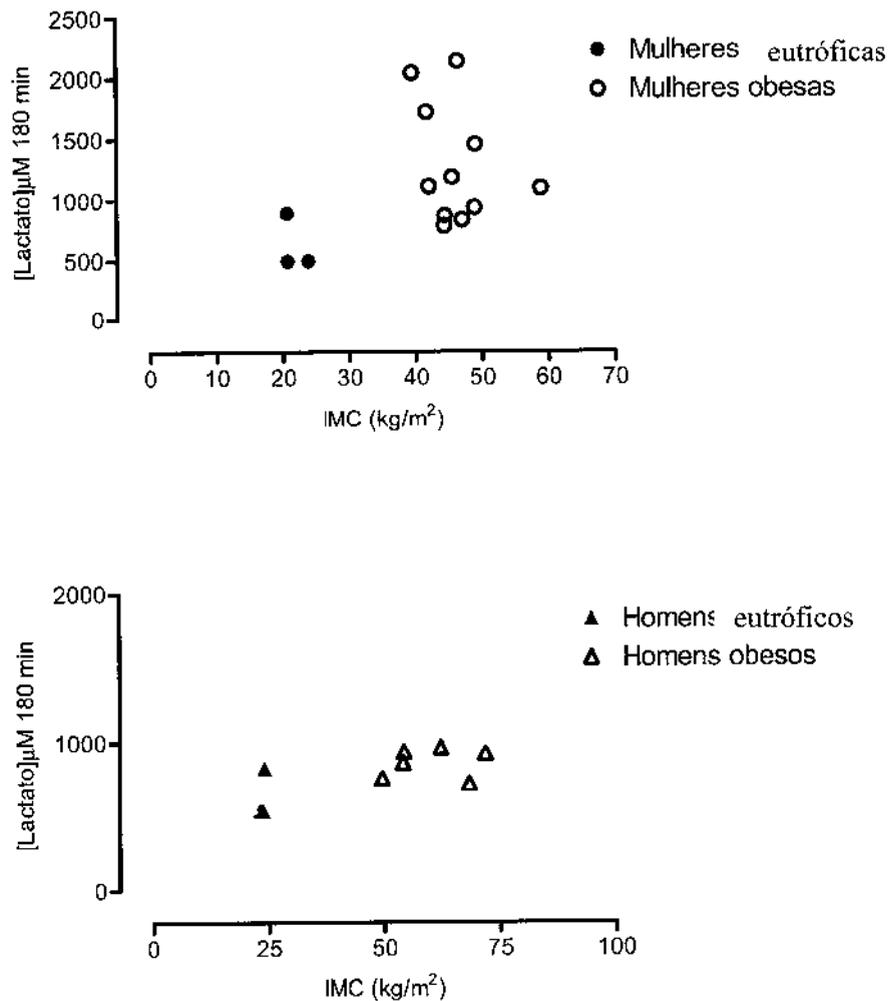


Figura 9 – Correlações entre IMC (kg/m^2) e lactato plasmático (μM) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo ● com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo ○ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (HE, símbolo ▲ com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo △ com $n = 6$), no tempo 180 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado r de Spearman para determinar se havia correlação entre os parâmetros adotados e foi aceito como correlação significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. Não houve correlação significativa entre as amostras analisadas (mulheres eutróficas $r = -0,87$; mulheres obesas $r = -0,21$; homens eutróficos $r = 0,50$; homens obesos $r = 0,14$).

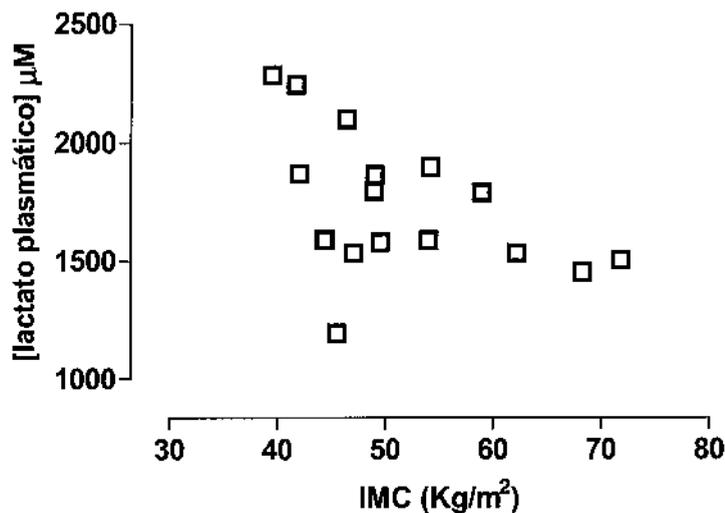


Figura 10: Correlação entre IMC (kg/m²) e lactato plasmático (µM) do grupo obeso mórbido (homens e mulheres) no tempo 0 (basal/jejum), antes do início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado r de Spearman para determinar se havia correlação entre os parâmetros adotados e foi aceito como correlação significativa aqueles que apresentaram $p \leq 0,05$. Houve correlação significativa: $p=0,028$ e $r=-0,53$.

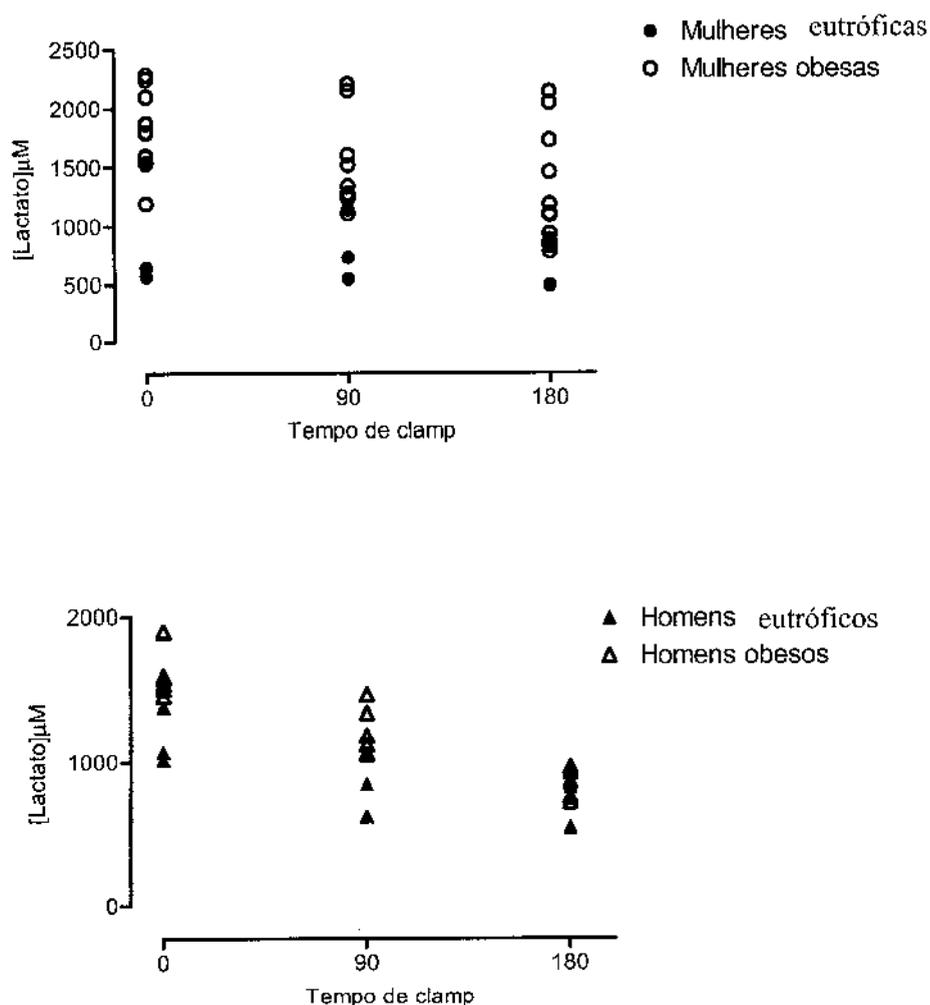


Figura 11 – Correlações entre tempo de *clamp* (min) e lactato plasmático (μM) em voluntários mulheres, eutróficas (ME, símbolo \bullet com $n = 3$) e obesas mórbidas (MO, símbolo \circ com $n = 11$) e em voluntários homens, eutróficos (HE, símbolo \blacktriangle com $n = 3$) e obesos mórbidos (HO, símbolo \triangle com $n = 6$), nos tempos antes do *clamp*: tempo 0/basal/jejum, 90 e 180 minutos após o início do ensaio de *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado r de Spearman para determinar se havia correlação entre os parâmetros adotados e foi aceito como correlação significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$, foi significativa em: MO ($r = -0,52$; $p = 0,002$), HE ($r = -0,84$; $p = 0,006$) e HO ($r = -0,93$; $p = 0,00001$). Não houve correlação entre concentração de lactato plasmático e tempo de *clamp* para o grupo ME ($r = -0,24$; $p = 0,58$).

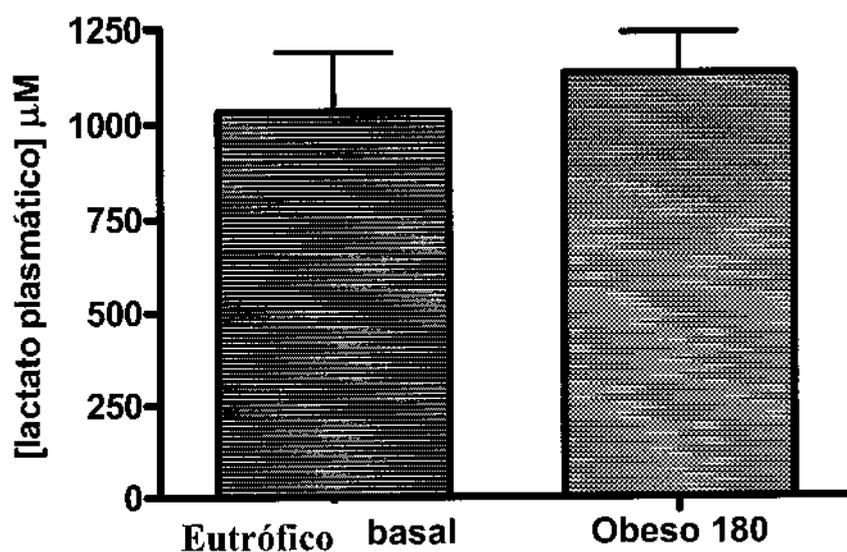


Figura 12 – Médias (\pm EPM) das concentrações plasmáticas de lactato (μM) de indivíduos eutróficos (homens e mulheres – barra cheia, $n= 6$) no tempo 0 (jejum/basal) e indivíduos obesos mórbidos (homens e mulheres – barra quadriculada, $n= 17$) no tempo 180 minutos do início do *clamp* euglicêmico – hiperinsulinêmico. Foi utilizado teste *t* de Student e não houve diferença significativa.

Ensaio *in vitro*

Ensaio farmacológico

Curvas concentração-efeito à noradrenalina com ou sem a presença de prazosin (antagonista α_1), em adipócitos isolados de obesos mórbidos.

A figura 13 mostra a resposta lipolítica induzida pela noradrenalina. Os valores médios de cada ponto da curva estão apresentados na tabela 4, sendo o estímulo máximo na concentração de 0,1 μM de noradrenalina. A estimulação máxima em relação ao basal foi 2,8 vezes o valor do basal para indivíduos eutróficos ($0,33680 \pm 0,05$ vs $0,96120 \pm 0,07$ μmol de glicerol 10^6 céls/ 60 min) e de 2,7 vezes o valor do basal para indivíduos obesos ($0,63750 \pm 0,08$ vs $1,72600 \pm 0,24$ μmol de glicerol 10^6 céls/ 60 min).

Foram feitas análises de glicerol nas amostras destinadas ao estudo da produção de lactato. Como pode ser observado (figura 13), houve uma curva concentração-efeito, ou seja a quantidade de glicerol liberada foi significativamente maior com o aumento na concentração do agonista utilizado (diferenças significativas em relação aos seus basais para o ponto 0,1 μM para obesos e 0,1 μM e 1 μM de noradrenalina para eutróficos).

Pudemos verificar também, na figura 13, que houve diferença significativa nos valores de glicerol entre amostras basais de eutróficos e obesos, confirmando dados da literatura de concentração plasmática (LOVEJOY *et al.*, 1992; DIGIROLAMO *et al.*, 1989 e 1992).

Na tabela 5 estão os valores médios de área sob a curva para a produção de glicerol estimulada pela noradrenalina em adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos mórbidos. O resultado correspondeu ao achado na curva farmacológica sendo 1,4 vezes maior a produção de glicerol, nestas condições, para obesos mórbidos.

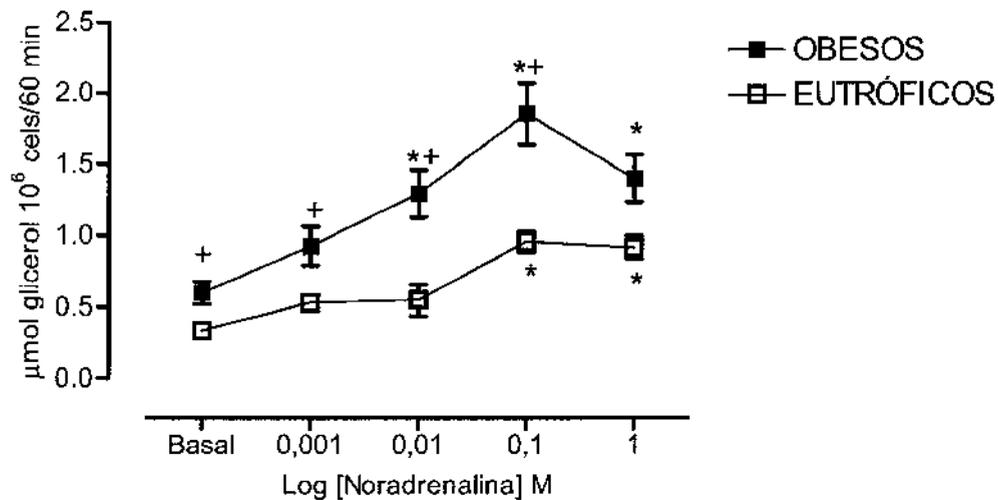


Figura 13 – Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de voluntários eutróficos e obesos mórbidos. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de glicérol 10^6 céls/60 min de incubação) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. O símbolo * indica os pontos da curva de noradrenalina que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett). O símbolo + indica as diferenças entre eutróficos e obesos para os mesmos pontos (teste t de Student).

Tabela 4 Liberação de glicerol (média \pm EPM, $\mu\text{mol glicerol } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina, de adipócitos isolados de indivíduos eutróficos e obesos.

	EUTRÓFICOS	OBESOS
Concentração de noradrenalina	$\mu\text{mol glicerol}$ (n=6 a 11)	$\mu\text{mol glicerol}$ (n=10 a 17)
Basal	0,33680 \pm 0,05	0,60288 \pm 0,08 ⁺
0,001 μM	0,53300 \pm 0,05	0,92817 \pm 0,13 ⁺
0,01 μM	0,55330 \pm 0,11	1,29707 \pm 0,17 ^{*+}
0,1 μM	0,96120 \pm 0,07 [*]	1,85800 \pm 0,21 ^{*+}
1 μM	0,92120 \pm 0,08 [*]	1,40447 \pm 0,16 [*]

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Tabela 5 Liberação de glicerol induzida pela noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de humanos eutróficos e obesos mórbidos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM dos valores obtidos de área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol glicerol } 10^6$ cels/60 minutos), o “n” indica o número de ensaios realizados.

AUC	
$\mu\text{M glicerol } 10^6$ cels/60 minutos	
EUTRÓFICOS	OBESOS
(n= 13)	(n =14)
3,54 \pm 0,51	4,9728 \pm 0,36*

* Análise estatística: teste *t* de Student. $p=0,03$.

Verificamos também a possível interferência do antagonista de adrenoceptor α_1 , o prazosin na produção de glicerol (figura 14).

Analisamos então a produção de glicerol pelos adipócitos frente ao estímulo da noradrenalina na presença de prazosin ($1\mu\text{M}$). Observamos que, quando incubamos os adipócitos com prazosin, ocorreu um aumento significativo na produção de glicerol tanto em indivíduos eutróficos (Crege, 2006), como em adipócitos isolados de obesos ($0,01\mu\text{M}$: $1,29707 \pm 0,17$ vs $1,95636 \pm 0,27$ $\mu\text{mol glicerol } 10^6$ céls em 60 min de incubação, $p < 0,05$; figura 14 e tabela 6).

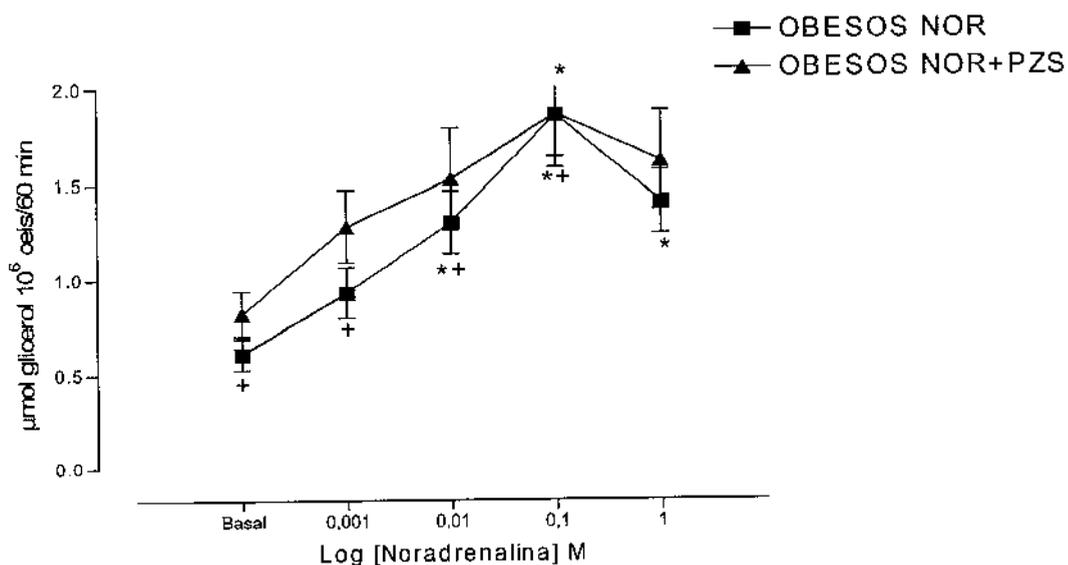


Figura 14 – Curva concentração-efeito à noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos com ou sem a adição de 1 μM de prazosin. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μM) e foi aceita como diferença significativa àqueles que apresentaram $p < 0,05$. O símbolo * indica os pontos das curvas que diferiram de seus respectivos basais(ANOVA seguida de Dunnett). O símbolo + indica as diferenças entre os mesmos pontos das duas curvas (teste *t* de Student).

Tabela 6 – Liberação de glicerol (média \pm EPM, μmol glicerol 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos com ou sem a adição de $1 \mu\text{M}$ prazosin (PZS).

Concentração de noradrenalina com ou sem a adição de prazosin	OBESOS (NOR)	OBESOS (NOR+PZS)
	μmol glicerol (n=10 a 17)	μmol glicerol (n=11 a 15)
Basal/PZS	$0,60288 \pm 0,08$	$0,99355 \pm 0,09^+$
$0,001 \mu\text{M}$	$0,92817 \pm 0,13$	$1,47788 \pm 0,19^+$
$0,01 \mu\text{M}$	$1,29707 \pm 0,17^*$	$1,95636 \pm 0,27^{*+}$
$0,1 \mu\text{M}$	$1,85800 \pm 0,21^*$	$2,03700 \pm 0,29^*$
$1 \mu\text{M}$	$1,40447 \pm 0,16^*$	$2,05473 \pm 0,29^{*+}$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Na tabela 7 estão os valores médios de área sob a curva para produção de glicerol estimulada pela noradrenalina na presença ou ausência de prazosin (antagonista α_1 não seletivo) em adipócitos isolados de indivíduos obesos mórbidos. Também quando a análise foi realizada em AUC o prazosin induziu um aumento significativo na produção de glicerol induzida pela noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos mórbidos.

Tabela 7 Liberação de glicerol induzida pela noradrenalina na ausência ou presença de 1µM de prazosin em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos. Os resultados estão apresentados em média \pm EPM da área sob a curva (µM de glicerol 10⁶ células/60 min).

AUC	
µM de glicerol 10 ⁶ células/60 min	
NOR	NOR+PZS
(n =13)	(n=14)
4,9728 \pm 0,36	6,6438 \pm 0,46*

* Análise estatística: teste *t* de Student. p=0,082.

Como observado na figura 14 e tabelas 6, os adipócitos que foram incubados com noradrenalina + prazosin, apresentaram uma produção de glicerol significativamente maior (p<0,05), que o seu respectivo basal (obesos vs obesos+pzs).

Caracterização farmacológica da produção de lactato.

A figura 15 mostra a resposta da via glicídica, com relação à produção de lactato, induzida pela noradrenalina. Os valores médios de cada ponto da curva estão apresentados na tabela 8. A estimulação máxima da produção de lactato aconteceu na concentração de 0,1 μM de noradrenalina, sendo que o estímulo máximo produziu 2,25 vezes mais lactato que o valor do basal em adipócitos isolados de indivíduos eutróficos ($0,08755 \pm 0,01$ vs $0,1973 \pm 0,04$ μmol de lactato 10^6 céls/ 60 min) e 2,3 vezes mais que o valor do basal em adipócitos isolados de indivíduos obesos ($0,15060 \pm 0,01$ vs $0,34230 \pm 0,03$ μmol de lactato 10^6 céls/ 60 min).

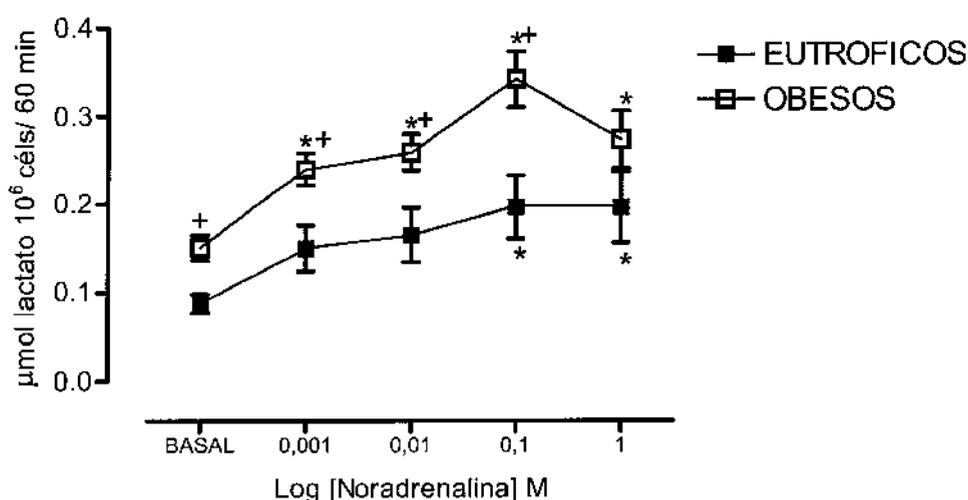


Figura 15 – Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 células/60 min). * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Tabela 8 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina de indivíduos eutróficos e obesos.

Concentração de noradrenalina	EUTRÓFICOS	OBESOS
	μmol lactato (n=6 a 15)	μmol lactato (n=14 a 21)
Basal	0,08755 \pm 0,01	0,15060 \pm 0,01 ⁺
0,001 μM	0,1499 \pm 0,02	0,24070 \pm 0,01* ⁺
0,01 μM	0,1645 \pm 0,03	0,25990 \pm 0,02* ⁺
0,1 μM	0,1973 \pm 0,04*	0,34230 \pm 0,03*
1 μM	0,1970 \pm 0,04*	0,27420 \pm 0,03*

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

A figura 16 mostra a curva concentração-efeito, com relação à produção de lactato, induzida pela noradrenalina, entre mulheres e homens obesos. Os valores médios de cada ponto da curva estão apresentados na tabela 9.

A estimulação máxima da produção de lactato aconteceu na concentração de 0,1 μM de noradrenalina, para mulheres obesas, sendo que o estímulo máximo produziu 2,11 ($0,1561 \pm 0,01$ vs $0,3309 \pm 0,02$ μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) vezes mais lactato que o valor do basal (figura 16 e tabela 9).

O estímulo máximo para a produção de lactato em adipócitos isolados de homens obesos, ocorreu na concentração de 0,01 μM de noradrenalina, muito próximo, daquele

apresentado por mulheres obesas, ou seja, 2,7 vezes ($0,1043 \pm 0,02$ vs $0,2823 \pm 0,04$ μmol lactato 10^6 cels/60 minutos).

Embora o número de experimentos seja muito diferente para homens e mulheres obesos, podemos observar uma maior produção de lactato pelos adipócitos de mulheres obesas, principalmente quando analisamos como área sob a curva (tabela 10) de produção de lactato pelos adipócitos isolados, estimulados pela noradrenalina.

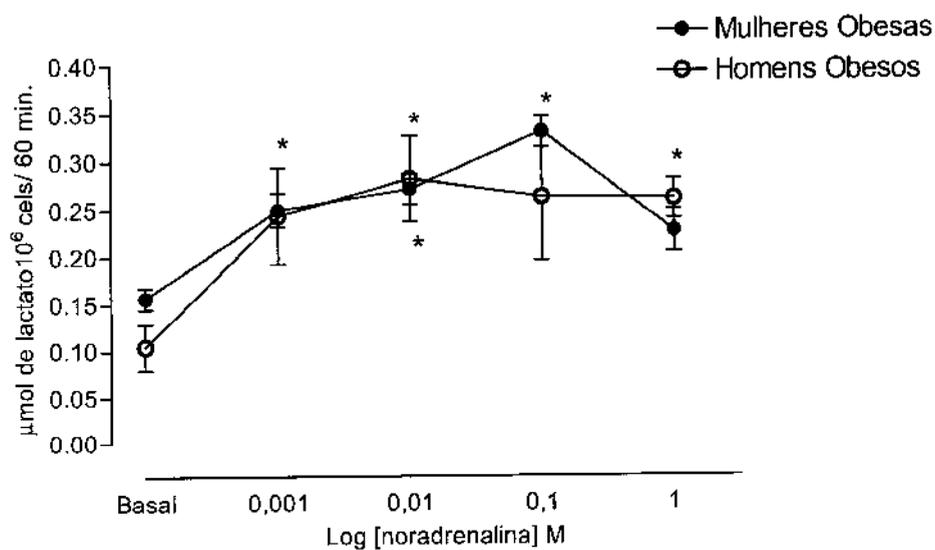


Figura 16 – Curva concentração-efeito à noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos, mulheres e homens, sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 células/60 min) e foi aceita como diferença significativa àqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 9 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina de mulheres e homens obesos.

Concentração de noradrenalina	MULHERES OBESAS	HOMENS OBESOS
	μmol lactato (n=11 a 17)	μmol lactato (n=2 a 4)
Basal	0,1561 \pm 0,01	0,1043 \pm 0,02
0,001 μM	0,2497 \pm 0,02*	0,2435 \pm 0,05
0,01 μM	0,2714 \pm 0,02*	0,2823 \pm 0,04*
0,1 μM	0,3309 \pm 0,02*	0,2631 \pm 0,07
1 μM	0,2272 \pm 0,02*	0,2611 \pm 0,02

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 10 Área sob a curva de lactato liberado pela noradrenalina de adipócitos isolados de obesos, mulheres e homens, apresentados como média \pm EPM μmol lactato 10^6 cels/60 minutos.

AUC	
μM de lactato 10^6 células/60 min	
MULHERES OBESAS	HOMENS OBESOS
(n =13)	(n=6)
6,5904 \pm 0,36	4,9318 \pm 0,37*

* Análise estatística: teste t de Student. $p < 0,05$ significativo.

A produção de lactato por adipócitos isolados provenientes de tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos e obesos mórbidos também foi analisada em incubações com insulina (50-500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina) e os resultados estão na figura 17 e na tabela 11, estes resultados estão comparados às curvas concentração-efeito à insulina na ausência de noradrenalina e na figura 18 e tabela 12 na presença de 1 μM de noradrenalina.

Os resultados mostram que houve diferença significativa dos respectivos basais em relação às concentrações de 50, 100 e 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina para eutróficos e nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ para adipócitos de indivíduos obesos mórbidos. Demonstrando assim que tanto adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos como de obesos mórbidos apresentam, frente à insulina, um aumento na produção de lactato concentração-efeito.

A concentração que correspondeu ao estímulo máximo nessas células foi a de 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina para ambos os grupos, sendo que o máximo estímulo foi de 3,5 vezes o valor do basal para o grupo de eutróficos ($0,08755 \pm 0,01$ vs $0,31100 \pm 0,03$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos) e de 2,4 vezes o valor do basal para indivíduos obesos ($0,15060 \pm 0,01$ vs $0,36770 \pm 0,04$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos) (tabela 11).

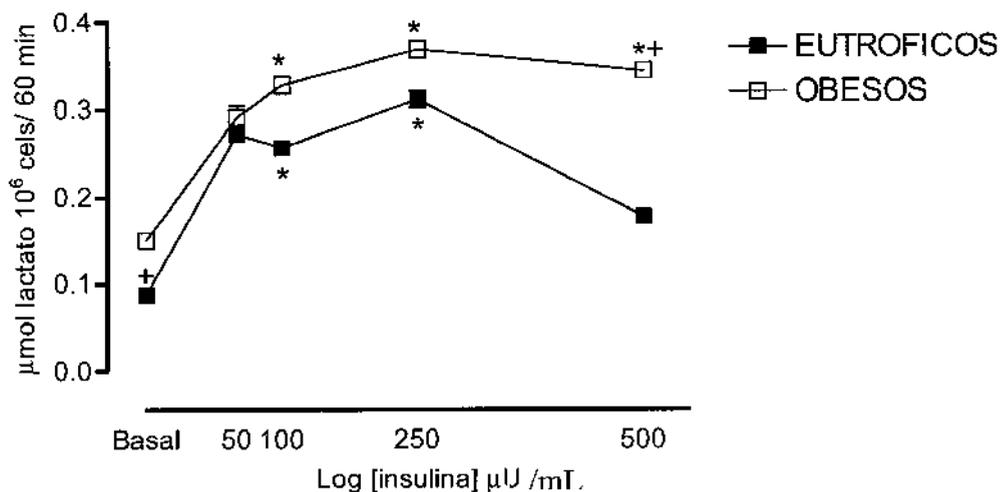


Figura 17 – Curva concentração-efeito à insulina em adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos, sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Tabela 11 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela insulina em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos eutróficos e obesos.

Concentração de insulina	EUTRÓFICOS	OBESOS
	μmol lactato (n=9 a 15)	μmol lactato (n=10 a 21)
Basal	$0,08755 \pm 0,01$	$0,15060 \pm 0,01^+$
50 $\mu\text{U}/\text{mL}$	$0,27180 \pm 0,01^*$	$0,29100 \pm 0,04$
100 $\mu\text{U}/\text{mL}$	$0,25640 \pm 0,02^*$	$0,32710 \pm 0,04^*$
250 $\mu\text{U}/\text{mL}$	$0,31100 \pm 0,03^*$	$0,36770 \pm 0,04^*$
500 $\mu\text{U}/\text{mL}$	$0,17750 \pm 0,02$	$0,34320 \pm 0,04^{*+}$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Quando analisamos separadamente os gêneros dentro do grupo de obesos frente ao tratamento com a insulina, observamos duas curvas semelhantes no seu desenho, mas diferentes em magnitude entre mulheres e homens (figura 16).

A figura 16 mostra a curva concentração-efeito à insulina na produção de lactato pelos adipócitos isolados de indivíduos obesos, mulheres e homens. A concentração que correspondeu ao estímulo máximo nessas células foi a de 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina para ambos os gêneros, sendo que o máximo estímulo foi de 2,5 vezes o valor do basal para o grupo de mulheres obesas ($0,1561 \pm 0,01$ vs $0,3868 \pm 0,05$ μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) e de 3,2 vezes o valor do basal para homens obesos ($0,1043 \pm 0,02$ vs $0,3387 \pm 0,06$ μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) (tabela 12).

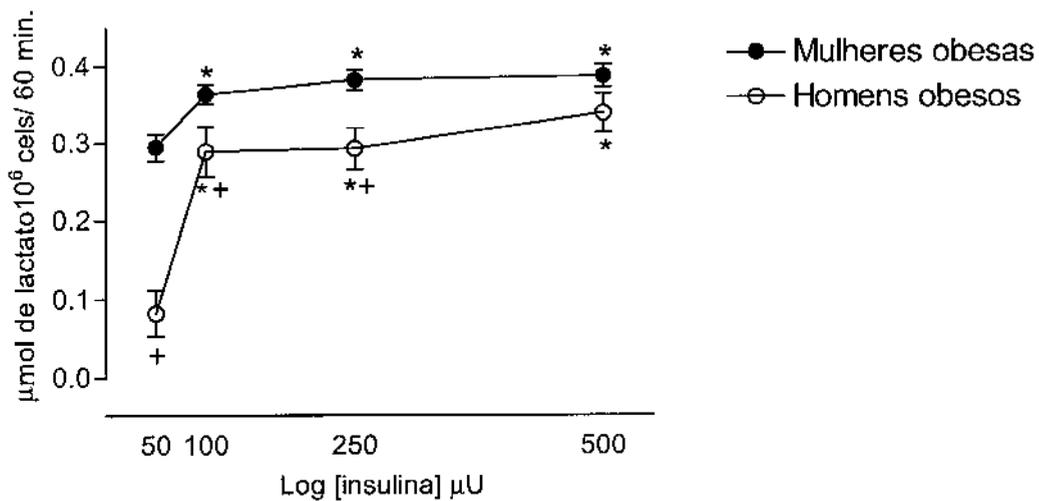


Figura 18 – Curva concentração-efeito à insulina de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos, sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste *t* de Student).

Tabela 12 –Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela insulina em adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos.

Concentração de insulina	MULHERES OBESAS	HOMENS OBESOS
	μmol lactato (n=9 a 13)	μmol lactato (n=3 a 6)
50 $\mu\text{U}/\text{mL}$	0,2947 \pm 0,05	0,0821 \pm 0,06* ⁺
100 $\mu\text{U}/\text{L}$	0,3640 \pm 0,05*	0,2891 \pm 0,06* ⁺
250 $\mu\text{U}/\text{L}$	0,3823 \pm 0,05*	0,2925 \pm 0,05* ⁺
500 $\mu\text{U}/\text{L}$	0,3868 \pm 0,05*	0,3387 \pm 0,06*

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

A produção de lactato por adipócitos isolados provenientes do tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos e obesos mórbidos também foi analisada em incubações com insulina (50-500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina 10^6 células/60 minutos) co-incubada com noradrenalina (1 μM), e os resultados podem ser observados na figura 19 e tabela 13.

Como a curva da insulina foi realizada conjuntamente à da noradrenalina e noradrenalina co-incubada com prazosin, a produção basal destes ensaios é a mesma referida na tabela 8 (vide figura 15 e tabela 8 – eutrófico: 0,0875 \pm 0,01 vs obesos mórbidos: 0,1506 \pm 0,01 μmol de lactato 10^6 células/60 minutos e são estatisticamente diferentes, sendo que adipócitos isolados de obesos mórbidos produzem mais lactato).

Os resultados obtidos destas incubações mostram que houve diferença significativa das concentrações de 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{U/mL}$ de insulina co-incubada com noradrenalina (1 μM), em relação aos respectivos basais, tanto para eutróficos como para obesos mórbidos.

A estimulação máxima ocorreu na concentração de 250 $\mu\text{U/mL}$ de insulina co-incubada com 1 μM de noradrenalina para ambos os grupos. Para o grupo de eutróficos, a estimulação foi de 3 vezes o valor do basal ($0,08755 \pm 0,01$ vs $0,26510 \pm 0,03$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos) e para o grupo de obesos a estimulação foi de 2,4 vezes o valor do basal ($0,15060 \pm 0,01$ vs $0,36830 \pm 0,04$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos).

As curvas diferiram entre si sendo a maior concentração de lactato produzida pelos adipócitos isolados provenientes de obesos mórbidos em relação aos adipócitos de eutróficos quando incubados em concentrações crescentes de insulina somada à concentração única de noradrenalina de 1 μM , e em todos os pontos a diferença foi significativa ($p < 0,05$).

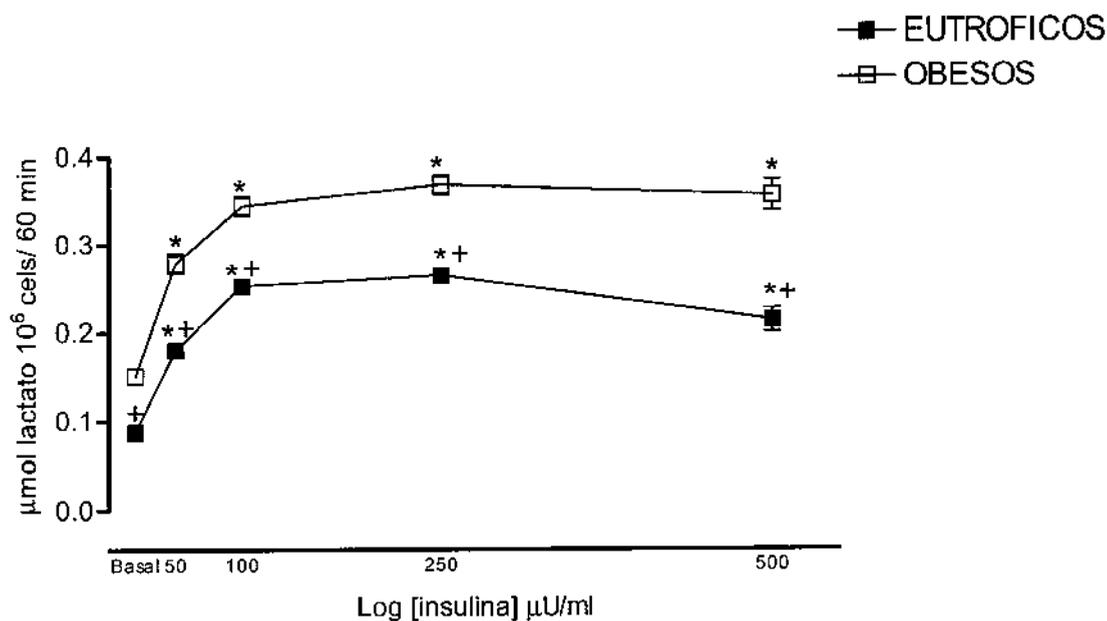


Figura 19 Curva concentração-efeito à insulina co-incubada com $1\mu\text{M}$ de noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos e obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Tabela 13 –Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada por concentrações crescentes de insulina ou insulina co-incubada com $1\mu\text{M}$ de noradrenalina, para eutróficos e obesos.

Conc. de Insulina $\mu\text{U/mL}$	EUTRÓFICOS		OBESOS	
	μmol lactato (n=9 a 14)		μmol lactato (n=11 a 21)	
	Insulina	+ $1\mu\text{M}$ de noradrenalina	Insulina	+ $1\mu\text{M}$ de noradrenalina
Basal	$0,08755 \pm 0,01$	$0,08755 \pm 0,01$	$0,15060 \pm 0,01^+$	$0,15060 \pm 0,01^+$
$50\mu\text{U/mL}$	$0,27180 \pm 0,01^*$	$0,18000 \pm 0,02^*$	$0,29100 \pm 0,04$	$0,27880 \pm 0,04$
$100\mu\text{U/mL}$	$0,25640 \pm 0,02^*$	$0,25320 \pm 0,02^*$	$0,32710 \pm 0,04^*$	$0,34460 \pm 0,04^*$
$250\mu\text{U/mL}$	$0,31100 \pm 0,03^*$	$0,26510 \pm 0,03^*$	$0,36770 \pm 0,04^*$	$0,36830 \pm 0,04$
$500\mu\text{U/mL}$	$0,17750 \pm 0,02$	$0,21340 \pm 0,04^*$	$0,34320 \pm 0,04^{*+}$	$0,35620 \pm 0,06^*$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); $^+$ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

A curva concentração-efeito à insulina na presença de noradrenalina na concentração de $1\mu\text{M}$, comparando os gêneros no grupo de obesos está representada na figura 20 e tabela 14. A estimulação máxima para o grupo de mulheres obesas ocorreu na concentração de $250\mu\text{U/mL}$ de insulina acrescentada de $1\mu\text{M}$ de noradrenalina. Para o grupo de mulheres obesas, a estimulação foi de 2,5 vezes o valor do basal ($0,1561 \pm 0,01$ vs $0,3865 \pm 0,05\mu\text{mol}$ de lactato 10^6 céls/ 60 min). Para o grupo de homens obesos, a estimulação foi semelhante ao do grupo das mulheres obesas, ocorrendo também a máxima estimulação na concentração de $250\mu\text{U/mL}$ de insulina co-incubada $1\mu\text{M}$ de noradrenalina

sendo de 2,7 vezes o valor do basal ($0,1043 \pm 0,02$ vs $0,2860 \pm 0,03$ μmol de lactato 10^6 céls/ 60 min).

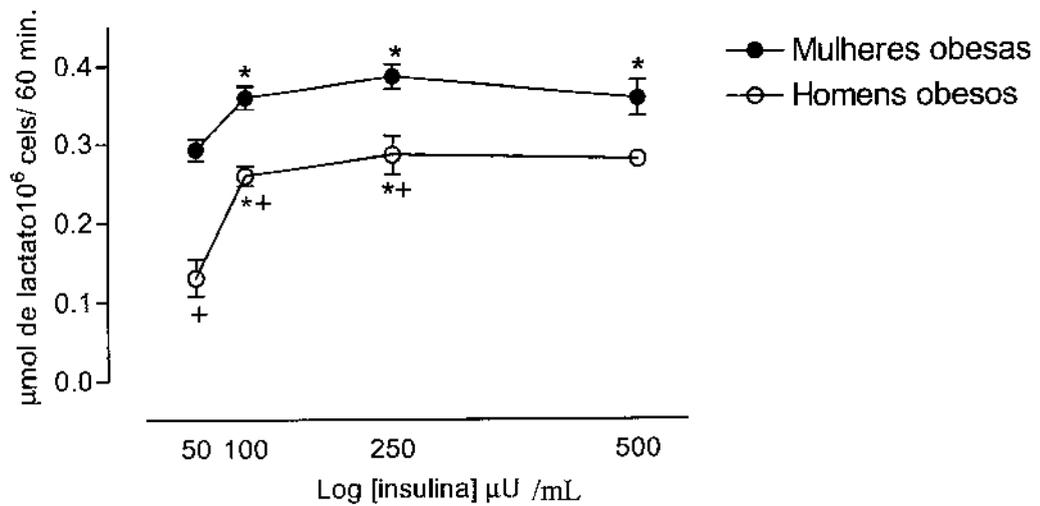


Figura 20 Curva concentração-efeito à insulina co-incubada com $1\mu\text{M}$ de noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos mórvidos, mulheres e homens, sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

Tabela 14 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada por concentrações crescentes de insulina acrescidas de $1\mu\text{M}$ de noradrenalina, em adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos.

	MULHERES OBESAS	HOMENS OBESOS
Concentração de Insulina + $1\mu\text{M}$ de noradrenalina	μmol lactato (n=8 a 13)	μmol lactato (n=1 a 4)
Basal	$0,1561 \pm 0,01$	$0,1043 \pm 0,02^+$
$50\mu\text{U}/\text{Ml}$	$0,2928 \pm 0,05^*$	$0,1312 \pm 0,05^+$
$100\mu\text{U}/\text{L}$	$0,3596 \pm 0,05^*$	$0,2598 \pm 0,02^{*+}$
$250\mu\text{U}/\text{L}$	$0,3865 \pm 0,05^*$	$0,2860 \pm 0,03^*$
$500\mu\text{U}/\text{mL}$	$0,3582 \pm 0,06^*$	$0,2800 \pm 0,00$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto as duas curvas (teste t de Student).

A figura 21 mostra as médias de produção de lactato por adipócitos isolados de indivíduos eutróficos, comparando as curvas concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de prazosin (1 μ M).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa na produção basal de lactato entre os adipócitos isolados de eutróficos, na ausência de prazosin (1 μ M) antagonista α_1 não-seletivo, quando comparamos aos valores de lactato produzido por adipócitos isolados com a adição de prazosin (basal sem prazosin: $0,0875 \pm 0,01$ vs basal com prazosin: $0,1239 \pm 0,02$ μ mol de lactato 10^6 células/60 minutos).

As curvas concentração-efeito obtidas de adipócitos isolados da região visceral de indivíduos eutróficos sem ou com a adição de prazosin, estão ilustradas na figura 21 e tabela 15. Os resultados mostram que houve diferença significativa em relação aos respectivos basais nas concentrações de 0,1 e 1 μ M de noradrenalina sem a adição de prazosin, mas quando acrescentamos o prazosin às concentrações crescentes de noradrenalina, não foi possível encontrar diferença significativa em relação ao basal.

A estimulação máxima da produção de lactato aconteceu na concentração de 0,1 μ M de noradrenalina, sendo que o estímulo máximo produziu 2,25 vezes mais lactato que o valor basal para a curva de noradrenalina sem o prazosin ($0,0875 \pm 0,01$ vs $0,1973 \pm 0,04$ μ mol de lactato 10^6 células/60 minutos). Quando acrescentamos o prazosin à curva de noradrenalina, não foi possível observar estimulação para a produção de lactato em relação ao basal prazosin ($0,1239 \pm 0,02$ vs $0,2222 \pm 0,04$ μ mol de lactato 10^6 células/60 minutos).

É possível observar que o prazosin não teve um efeito inibitório na produção de lactato em tecido adiposo de indivíduos eutróficos (figura 21 e tabela 15).

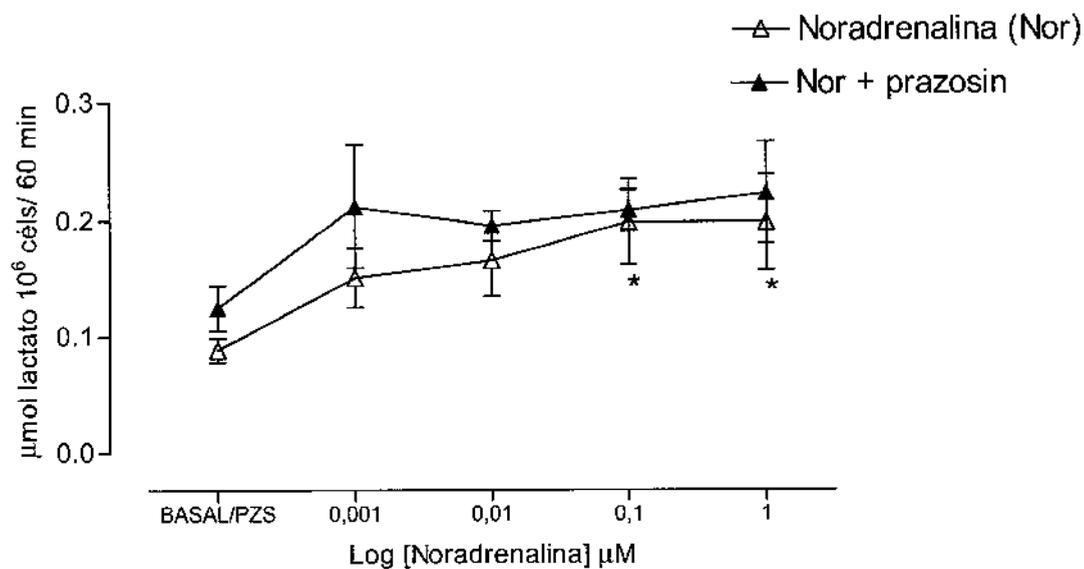


Figura 21 Curva concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de tecido adiposo de eutróficos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (\square mol de lactato 10^6 células/60 minutos) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 15 - Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de indivíduos eutróficos.

	NOR	NOR+PZS
Concentração de noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin	μmol lactato (n=6 a 15)	μmol lactato (n=3 a 6)
Basal/PZS	$0,08755 \pm 0,01$	$0,1239 \pm 0,02$
$0,001\mu\text{M}$	$0,1499 \pm 0,03$	$0,2110 \pm 0,05$
$0,01\mu\text{M}$	$0,1645 \pm 0,03$	$0,1944 \pm 0,01$
$0,1\mu\text{M}$	$0,1973 \pm 0,04^*$	$0,2077 \pm 0,02$
$1\mu\text{M}$	$0,1970 \pm 0,04^*$	$0,2222 \pm 0,04$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva de noradrenalina em relação à curva de noradrenalina + prazosin (teste t de Student).

Diferentemente do resultado dos adipócitos isolados de indivíduos eutróficos (figura 21 e tabela 15), o prazosin apresentou efeitos inibitórios na produção de lactato estimulada pela noradrenalina em adipócitos isolados de indivíduos obesos (figura 22 e tabela 16).

Demonstramos que houve diferença significativa na produção basal de lactato na presença ou ausência do prazosin ($1\mu\text{M}$) antagonista não-seletivo α_1 (basal sem prazosin: $0,1506 \pm 0,01$ vs basal com prazosin: $0,1284 \pm 0,009$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos, $p < 0,05$).

A estimulação máxima na produção de lactato ocorreu na concentração de 0,1 μ M de noradrenalina, sendo que o estímulo máximo produziu 2,27 vezes mais lactato que o valor do basal para a curva de noradrenalina sem a adição de prazosin ($0,1506 \pm 0,01$ vs $0,3423 \pm 0,03$ μ mol de lactato 10^6 células/60 minutos). Quando acrescentamos o prazosin à curva da noradrenalina, a estimulação máxima ocorreu na concentração de 1 μ M de noradrenalina em relação ao basal prazosin ($0,1284 \pm 0,009$ vs $0,2711 \pm 0,02$ μ mol de lactato 10^6 células/60 minutos $p < 0,05$).

Podemos observar que tivemos uma inibição na produção de lactato apenas em adipócitos isolados de indivíduos obesos mórbidos e esta inibição foi semelhante em todos os pontos da curva, produzindo em média de 1,27 vezes menos lactato aqueles adipócitos de obesos mórbidos que foram incubados com prazosin (tabela 17).

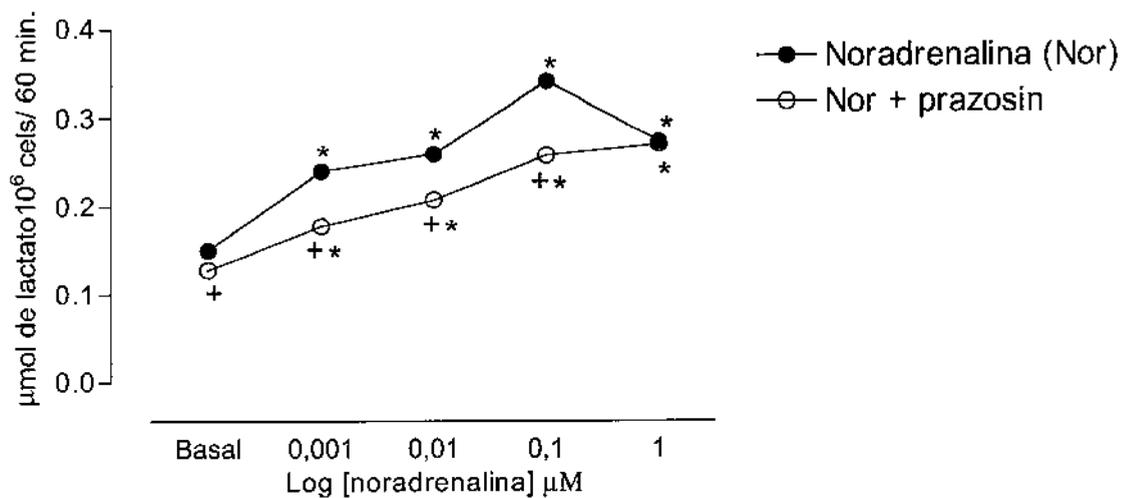


Figura 22 Curva concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de 1 µM de prazosin em adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 céls/ 60 min) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva dos obesos em relação à curva dos eutróficos (teste t de Student).

Tabela 16 –Liberação de lactato (média \pm EPM μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina ou noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de indivíduos obesos.

	NOR	NOR+PZS
Concentração de noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin	μmol lactato (n=6 a 15)	μmol lactato (n=2 a 12)
Basal/PZS	$0,15060 \pm 0,01$	$0,1284 \pm 0,009^+$
$0,001\mu\text{M}$	$0,24070 \pm 0,01^*$	$0,1781 \pm 0,01^{*+}$
$0,01\mu\text{M}$	$0,25990 \pm 0,02^*$	$0,2081 \pm 0,02^{*+}$
$0,1\mu\text{M}$	$0,34230 \pm 0,03^*$	$0,2585 \pm 0,02^{*+}$
$1\mu\text{M}$	$0,27420 \pm 0,03^*$	$0,2711 \pm 0,02^*$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva dos obesos em relação à curva dos eutróficos (teste t de Student).

Tabela 17 – Porcentagem de inibição, induzido pelo prazosin, na produção de lactato estimulada pela noradrenalina em adipócitos isolados de obesos mórbidos.

Concentração de noradrenalina + 1µM de prazosin	NOR	NOR+PZS	% de inibição proporcionada pela presença de 1 µM de prazosin
	Médias µmol lactato (n=6 a 15)	Médias µmol lactato (n=2 a 12)	
Basal/PZS	0,15060 ± 0,01	0,1284 ± 0,009 ⁺	14,7
0,001µM	0,24070± 0,01*	0,1781± 0,01* ⁺	26
0,01µM	0,25990± 0,02*	0,2081 ± 0,02* ⁺	20
0,1µM	0,34230 ± 0,03*	0,2585 ± 0,02* ⁺	24,5
1µM	0,27420 ± 0,03*	0,2711 ± 0,02*	1,1

*p<0,05 para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + p<0,05 quando comparamos ponto a ponto a curva dos obesos em relação à curva dos eutróficos (teste *t* de Student).

Quando comparamos as incubações de adipócitos isolados na presença de prazosin, separando o grupo de obesos por gênero, não houve diferenças significativas nas curvas concentração-efeito à noradrenalina, em nenhum ponto, como podemos observar na figura 23 e tabulado como valores médios das incubações na tabela 18.

A estimulação máxima na produção de lactato ocorreu na concentração de 1 µM de noradrenalina para as mulheres obesas, sendo que o estímulo máximo produziu 2 vezes mais lactato que o valor do basal com a adição de prazosin (0,1328 ± 0,01 vs 0,2759 ± 0,032 µmol de lactato 10⁶ células/60 minutos). Já para a curva de produção de lactato estimulado pela noradrenalina na presença de prazosin em adipócitos isolados de homens obesos, a estimulação máxima ocorreu na concentração de 0,1 µM de noradrenalina e

produziu também 2 vezes mais lactato que o valor basal ($0,1195 \pm 0,009$ vs $0,2421 \pm 0,05$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos, $p < 0,05$).

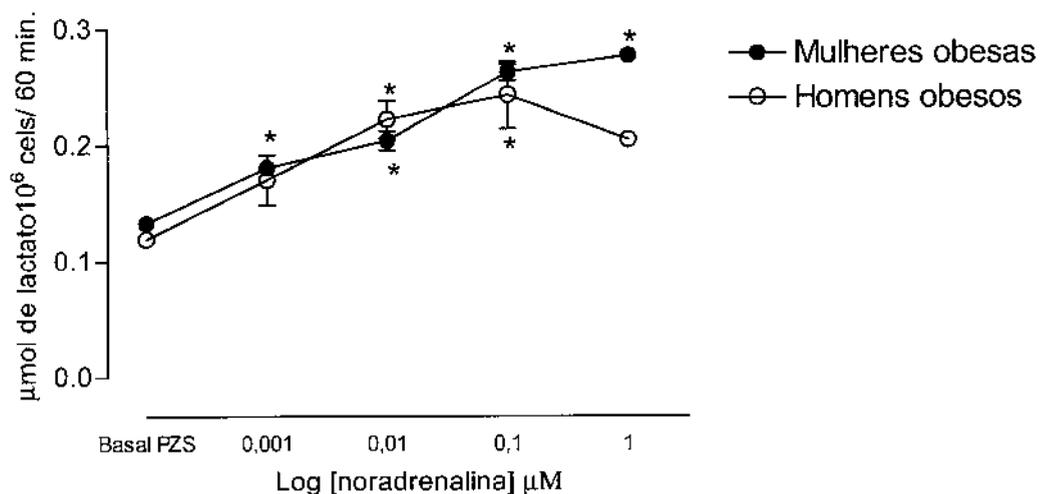


Figura 23 Curva concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de $1 \mu\text{M}$ de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 células/60 minutos) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva dos obesos em relação à curva dos eutróficos (teste t de Student).

Tabela 18 –Liberação de lactato (média \pm EPM μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de indivíduos obesos mulheres e homens.

Concentração de noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin	NOR+PZS Mulheres obesas	NOR+PZS Homens obesos
	μmol lactato (n=8 a 15)	μmol lactato (n=1 a 5)
Basal/PZS	0,1328 \pm 0,01	0,1195 \pm 0,009
0,001 μM	0,1801 \pm 0,02*	0,1700 \pm 0,03
0,01 μM	0,2033 \pm 0,03*	0,2215 \pm 0,03*
0,1 μM	0,2617 \pm 0,03*	0,2421 \pm 0,05*
1 μM	0,2759 \pm 0,02*	0,2040 \pm 0,00

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Quando separamos o grupo de obesos por gênero e comparamos suas curvas de noradrenalina na presença ou ausência de prazosin, pudemos observar uma resposta, dependendo do gênero.

A figura 24 representa graficamente a resposta na produção de lactato por adipócitos isolados de mulheres obesas, induzida por noradrenalina somada à ação inibitória da presença do prazosin (antagonista α_1 não-seletivo). O gráfico mostra claramente uma inibição na produção de lactato significativa em todos os pontos da curva. As médias estão apresentadas na tabela 19.

A estimulação máxima na produção de lactato de adipócitos isolados de mulheres obesas ocorreu na concentração de 0,1 μM de noradrenalina, sendo que o estímulo máximo produziu 2,12 vezes mais lactato que o valor do basal para a curva de noradrenalina sem a adição de prazosin ($0,1561 \pm 0,01$ vs $0,3309 \pm 0,02$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos). Quando acrescentamos o prazosin à curva da noradrenalina, a estimulação máxima somente ocorreu na concentração de 1 μM de noradrenalina em relação ao basal prazosin e foi de 2 vezes o valor do basal ($0,1328 \pm 0,01$ vs $0,2759 \pm 0,02$ μmol de lactato 10^6 células/60 minutos).

Podemos observar que a curva de noradrenalina na presença ou ausência de prazosin de mulheres obesas segue um traçado semelhante àquele apresentado pelo grupo de obesos.

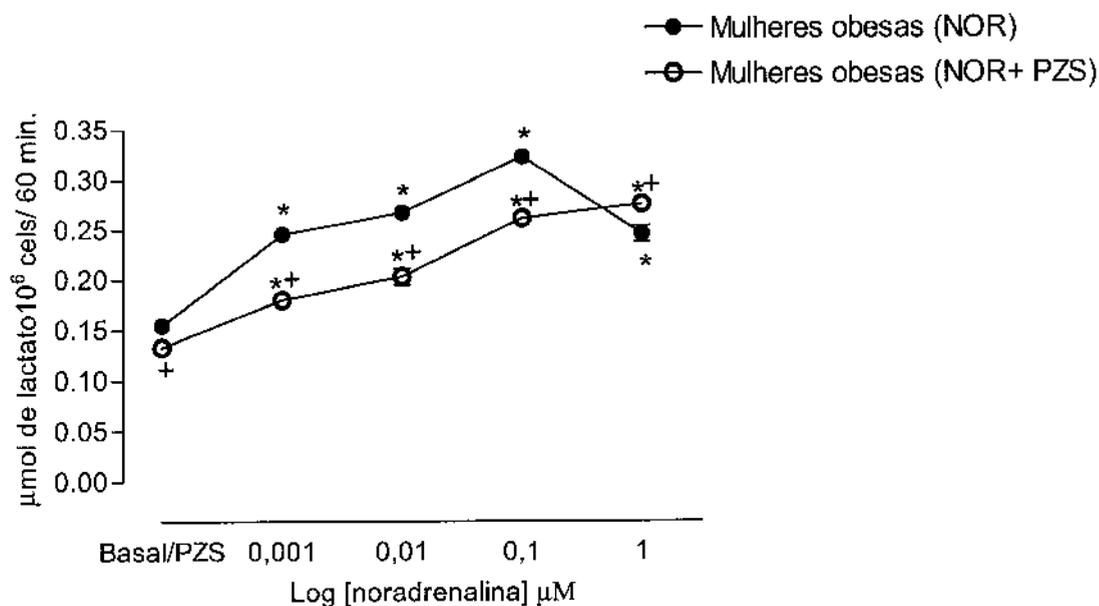


Figura 24 Curva concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres obesas sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($\square\text{mol de lactato } 10^6$ células/60 minutos) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 19 –Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina na presença ou ausência de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres obesas.

	NOR	NOR+PZS
Concentração de noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin	μmol lactato (n=6 a 15)	μmol lactato (n=6 a 15)
Basal/PZS	$0,1561 \pm 0,01$	$0,1328 \pm 0,01$
$0,001\mu\text{M}$	$0,2497 \pm 0,02^*$	$0,1801 \pm 0,02^{*+}$
$0,01\mu\text{M}$	$0,2714 \pm 0,02^*$	$0,2033 \pm 0,03^{*+}$
$0,1\mu\text{M}$	$0,3309 \pm 0,02^*$	$0,2617 \pm 0,03^{*+}$
$1\mu\text{M}$	$0,2272 \pm 0,02^*$	$0,2759 \pm 0,02^*$

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Na figura 25 representamos graficamente a resposta na produção de lactato por adipócitos isolados de homens obesos, induzida por noradrenalina somada à ação inibitória da presença do prazosin (antagonista α_1 não-seletivo). Nossos ensaios demonstram que uma tendência a inibição porém não foi significativa. Os valores médios de cada ponto da curva estão apresentados na tabela 20.

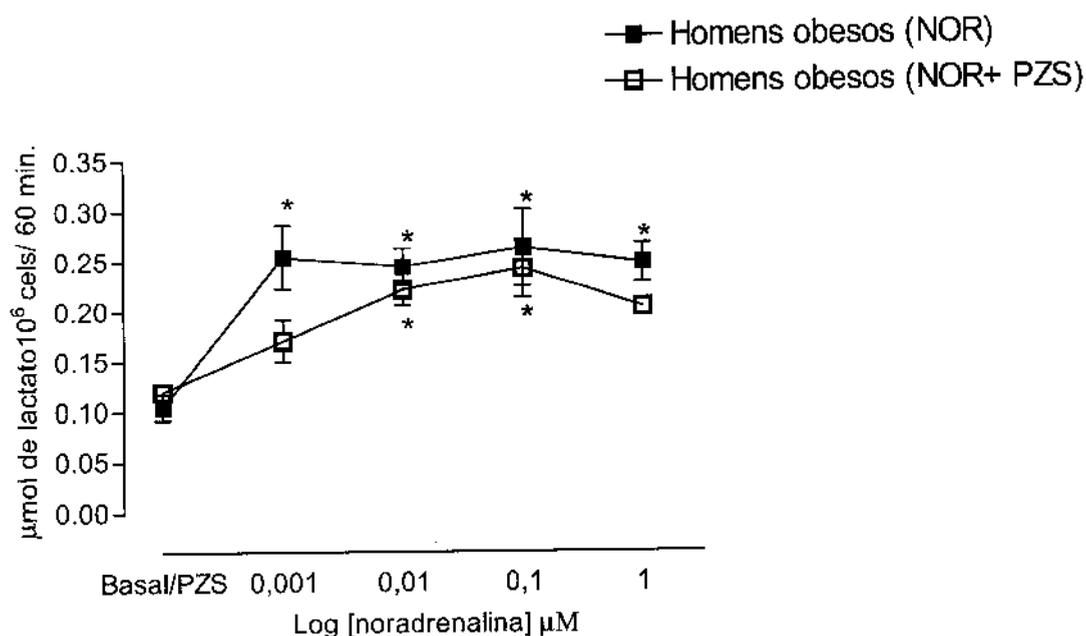


Figura 25 Curva concentração-efeito à noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin de adipócitos isolados de tecido adiposo de homens obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 20 – Liberação de lactato (média \pm EPM μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela noradrenalina na ausência ou presença de $1\mu\text{M}$ de prazosin em adipócitos isolados de homens obesos.

	NOR	NOR+PZS
Concentração de noradrenalina + $1\mu\text{M}$ de prazosin	μmol lactato (n=3 a 5)	μmol lactato (n=1 a 5)
Basal/PZS	0, 1043 \pm 0,02	0,1195 \pm 0,009
0,001 μM	0, 2435 \pm 0,05	0,1700 \pm 0,03
0,01 μM	0, 2823 \pm 0,04*	0,2215 \pm 0,03*
0,1 μM	0, 2631 \pm 0,07	0,2421 \pm 0,05*
1 μM	0, 2611 \pm 0,02	0,2040 \pm 0,00

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Foi possível realizar as incubações com cirazolina (agonista α_1) apenas em adipócitos isolados de indivíduos obesos mórbidos, devido à grande quantidade de tecido necessária para realizar as curvas com este agonista. estes resultados estão representados na figura 26 , com seus valores médios na tabela 21, em comparação com a curva obtida com noradrenalina.

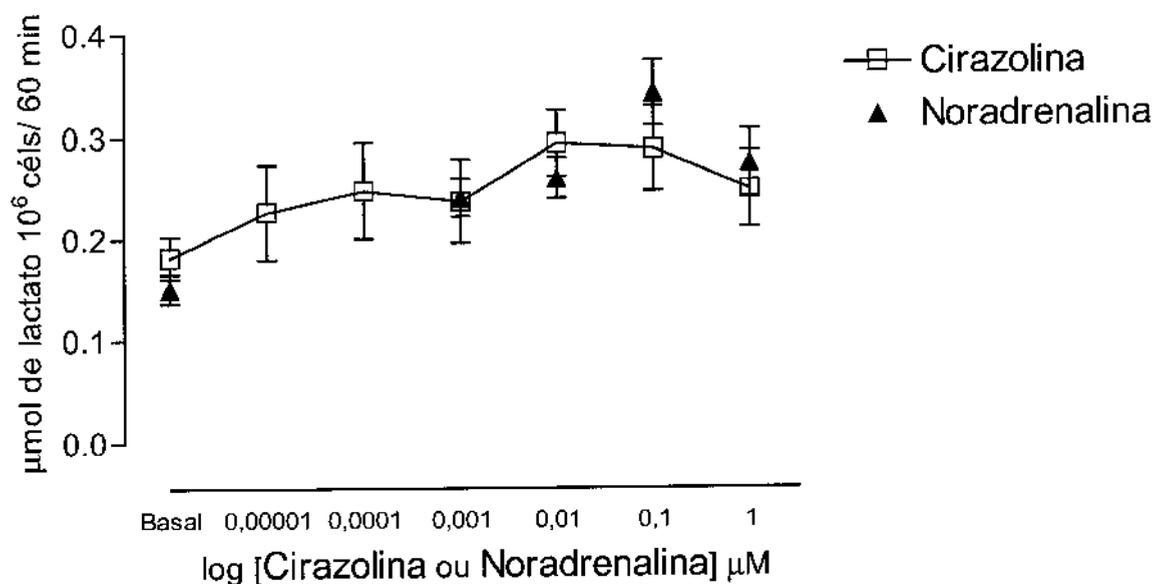


Figura 26 Curva concentração-efeito à cirazolina ou noradrenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 céls/ 60 min) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Estes dois agonistas da produção de lactato em adipócitos isolados de tecido adiposo humano não demonstraram diferenças significativas na magnitude de resposta estimulatória (figura 26 e tabela 21).

Tabela 21 –Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou noradrenalina em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos mórbidos.

	Cirazolina	Noradrenalina
Concentração de Cirazolina ou noradrenalina (μM)	μmol lactato (n=10 a 13)	μmol lactato (n=13 a 21)
Basal/WB	0,1810 \pm 0,02	0,15060 \pm 0,01
0,00001 μM	0,2260 \pm 0,05	-
0,0001 μM	0,2480 \pm 0,05	-
0,001 μM	0,2370 \pm 0,04	0,24070 \pm 0,01*
0,01 μM	0,2940 \pm 0,03	0,25990 \pm 0,02*
0,1 μM	0,2880 \pm 0,04	0,34230 \pm 0,03*
1 μM	0,2480 \pm 0,04	0,27420 \pm 0,03*

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Assim como para a curva da cirazolina do grupo de obesos mórbidos, quando separamos estes dados por gênero, o resultado não foi diferente (figura 27 e tabela 22), não obtivemos significância nestes experimentos.

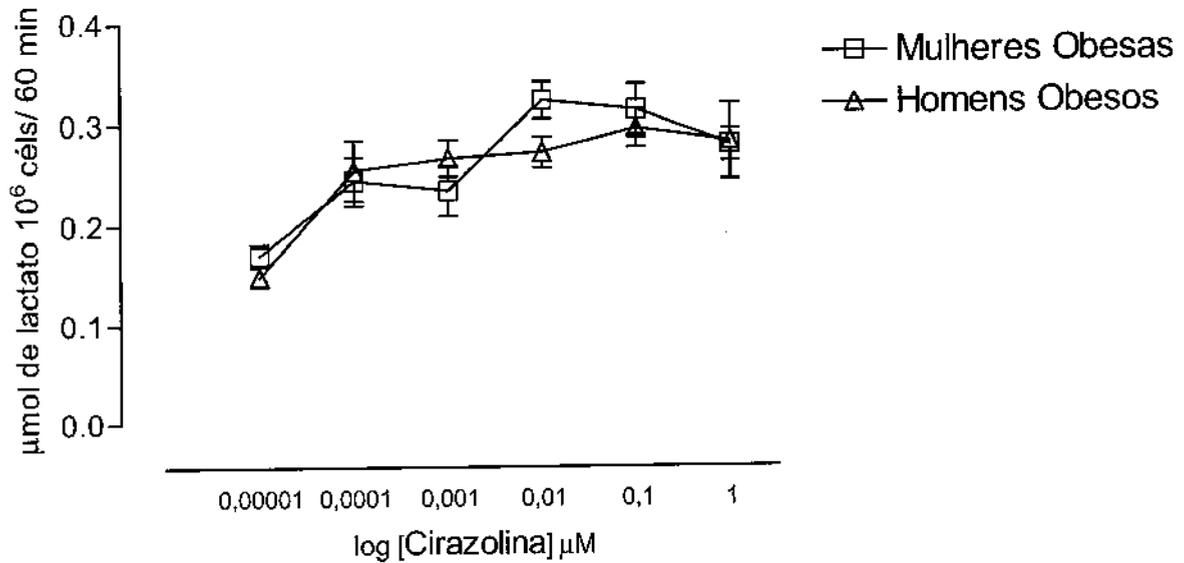


Figura 27 Curva concentração-efeito à cirazolina de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres e homens obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ céls/ } 60 \text{ min}$) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

Tabela 22 – Médias de liberação de lactato ($\mu\text{mol lactato } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ minutos}$) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina em adipócitos isolados de mulheres e homens obesos.

	Mulheres obesas	Homens obesos
Concentração de Cirazolina	$\mu\text{mol lactato}$ (n=5 a 7)	$\mu\text{mol lactato}$ (n=4 a 7)
0,00001 μM	0,17032 \pm 0,03	0,1490 \pm 0,02
0,0001 μM	0,2441 \pm 0,05	0,2546 \pm 0,06
0,001 μM	0,2345 \pm 0,06	0,2665 \pm 0,04
0,01 μM	0,3239 \pm 0,05	0,2719 \pm 0,04
0,1 μM	0,3142 \pm 0,07	0,2955 \pm 0,05
1 μM	0,2791 \pm 0,03	0,2826 \pm 0,08

Realizamos também ensaios de curvas concentração-efeito com cirazolina na presença ou ausência de dois antagonistas seletivos para os subtipos de receptores adrenérgico α_1 , o WB4101 (1 nM), antagonista seletivo α_{1A} (figura 28 e tabela 23) e o BMY7378 (10 nM), antagonista seletivo α_{1D} (figura 29 e tabela 24).

Observamos inibição significativa na produção de lactato pelo antagonista de adrenoceptores α_{1A} , o WB4101, em apenas 1 ponto em comparação à curva concentração-efeito à cirazolina, que foi na concentração de 0,00001 μM de cirazolina (CIR: $0,2260 \pm 0,05$ vs CIR + WB: $0,1660 \pm 0,02$ μmol lactato 10^6 cels/60 minutos).

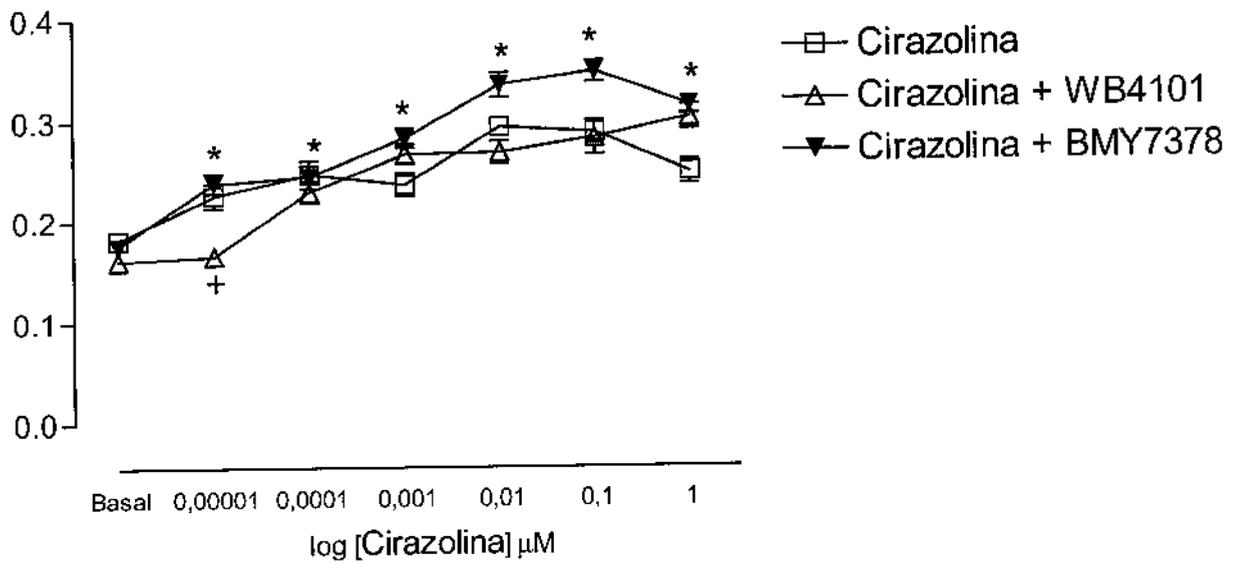


Figura 28 Curva concentração-efeito à cirazolina, cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 ou 10 nM de BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva com antagonista em relação à curva com a cirazolina (teste *t* de Student).

Tabela 23 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 ou 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de tecido adiposo de indivíduos obesos.

Concentração de Cirazolina	Cirazolina	Cirazolina+ 1 nM de WB4101	Cirazolina+ 10 nM de BMY7378
	μmol lactato (n=10 a 13)	μmol lactato (n=4 a 6)	μmol lactato (n=5 a 7)
Basal/WB	0,1815 \pm 0,02	0,1613 \pm 0,02	0,1763 \pm 0,02
0,00001 μM	0,2260 \pm 0,05	0,1660 \pm 0,02 ⁺	0,2389 \pm 0,03*
0,0001 μM	0,2480 \pm 0,05	0,2298 \pm 0,03	0,2452 \pm 0,04*
0,001 μM	0,2370 \pm 0,04	0,2673 \pm 0,03	0,2833 \pm 0,03*
0,01 μM	0,2940 \pm 0,03	0,2685 \pm 0,04	0,3348 \pm 0,04*
0,1 μM	0,2880 \pm 0,04	0,2827 \pm 0,05	0,3478 \pm 0,03*
1 μM	0,2480 \pm 0,04	0,3024 \pm 0,03	0,3144 \pm 0,03*

*p<0,05 para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ p<0,05 quando comparamos ponto a ponto a curva com antagonista em relação à curva com a cirazolina (teste *t* de Student).

Observamos que a cirazolina sozinha ou co-incubada com 1 nM de WB4101 não apresentou curva concentração-efeito na produção de lactato pelos adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos (figura 28 e tabela 23) como o que ocorreu quando co-incubamos cirazolina com 10 nM de BMY7378.

Quando separamos estas análises por gênero, não encontramos diferenças estatisticamente significativas nas curvas concentração-efeito à cirazolina e cirazolina com ambos os antagonistas (WB4101 e BMY7378) naquelas curvas obtidas de incubações de adipócitos isolados de mulheres obesas (figura 29 e tabela 24).

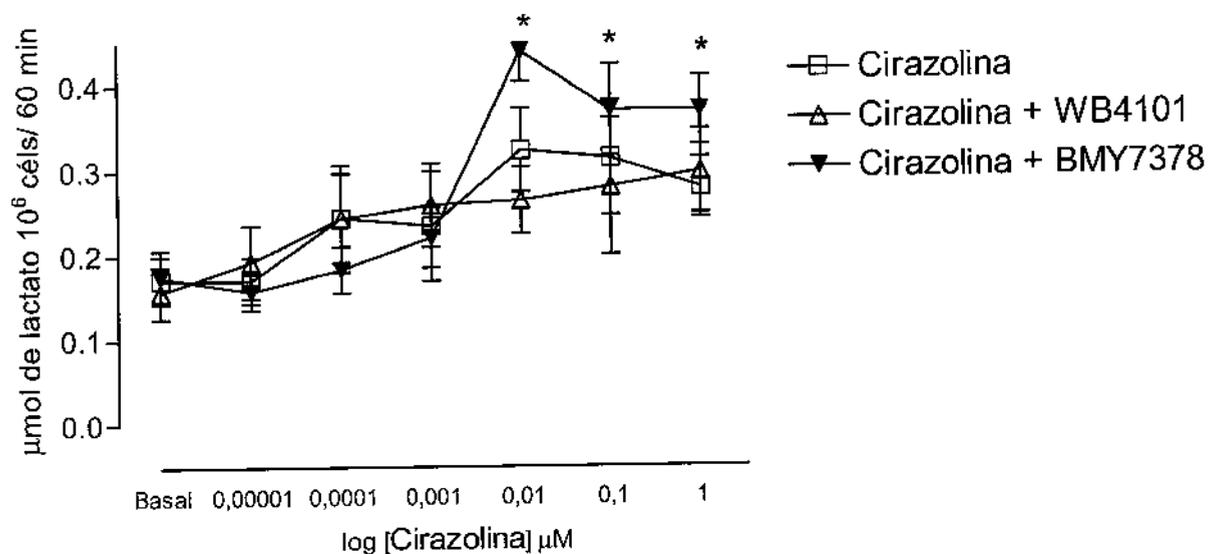


Figura 29 Curva concentração-efeito à cirazolina, cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 ou de 10 nM de BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo de mulheres obesas sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol de lactato 10^6 cels/ 60 min) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. * $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); + $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva com antagonista em relação à curva com a cirazolina (teste t de Student).

Tabela 24 – Liberação de lactato (μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de mulheres obesas.

	Cirazolina	Cirazolina+ 1 nM de WB4101	Cirazolina+ 10 nM de BMY7378
Concentração de Cirazolina	μmol lactato (n=5 a 7)	μmol lactato (n=3 a 8)	μmol lactato (n=5 a 7)
Basal/WB	0,1815 \pm 0,02	0,2013 \pm 0,05	0,1748 \pm 0,03
0,00001 μM	0,2260 \pm 0,05	0,1352 \pm 0,02	0,1568 \pm 0,02
0,0001 μM	0,2480 \pm 0,05	0,2459 \pm 0,05	0,1829 \pm 0,03
0,001 μM	0,2370 \pm 0,04	0,2604 \pm 0,06	0,2210 \pm 0,03
0,01 μM	0,2940 \pm 0,03	0,3272 \pm 0,07	0,4396 \pm 0,03*
0,1 μM	0,2880 \pm 0,04	0,2208 \pm 0,04	0,3703 \pm 0,05*
1 μM	0,2480 \pm 0,04	0,2274 \pm 0,04	0,3696 \pm 0,04*

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett); ⁺ $p < 0,05$ quando comparamos ponto a ponto a curva com antagonista em relação à curva com a cirazolina (teste *t* de Student).

Quando analisamos os ensaios de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos mórbidos observamos também que não houve efeito inibitório dos antagonistas utilizados.

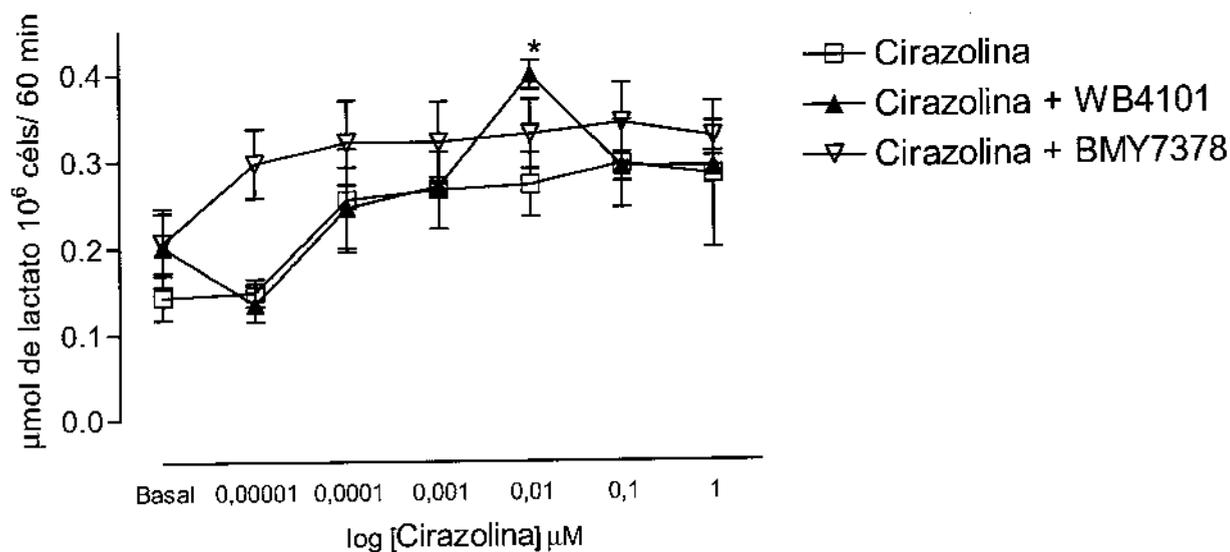


Figura 30 Curva concentração-efeito à cirazolina, cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 ou 10 nM de BMY7378 de adipócitos isolados de tecido adiposo de homens obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM (μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. O símbolo * indica os pontos das curvas que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Tabela 25 – Liberação de lactato (média \pm EPM, μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina na ausência ou presença de 1nM de WB4101 ou 10nM de BMY7378 em adipócitos isolados de tecido adiposo de homens obesos.

	Cirazolina	Cirazolina+ 1 nM de WB4101	Cirazolina+ 10 nM de BMY7378
Concentração de Cirazolina	μmol lactato (n=5 a 7)	μmol lactato (n=3 a 8)	μmol lactato (n=5 a 7)
Basal/WB	0,1436 \pm 0,03	0,2013 \pm 0,04	0,2068 \pm 0,04
0,00001 μM	0,1490 \pm 0,02	0,1352 \pm 0,02	0,2974 \pm 0,04
0,0001 μM	0,2546 \pm 0,06	0,2459 \pm 0,05	0,3209 \pm 0,05
0,001 μM	0,2665 \pm 0,04	0,2703 \pm 0,01	0,3209 \pm 0,05
0,01 μM	0,2719 \pm 0,04	0,3977 \pm 0,02	0,3303 \pm 0,04
0,1 μM	0,2955 \pm 0,05	0,2923 \pm 0,02	0,3426 \pm 0,05
1 μM	0,2826 \pm 0,08	0,2921 \pm 0,01	0,3264 \pm 0,02

*p<0,05 para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

Realizamos então ensaios de curva concentração-efeito utilizando um agonista de adrenoceptores β não-seletivo, que é o isoprenalina (ISO). Pudemos observar a formação de uma curva com formato de “sino” quando usamos o isoprenalina, sendo que apenas na concentração de 0,001 μM o isoprenalina levou a uma maior produção de lactato em relação à cirazolina (figura 31). Os valores médios de cada ponto da curva estão apresentados na tabela 26.

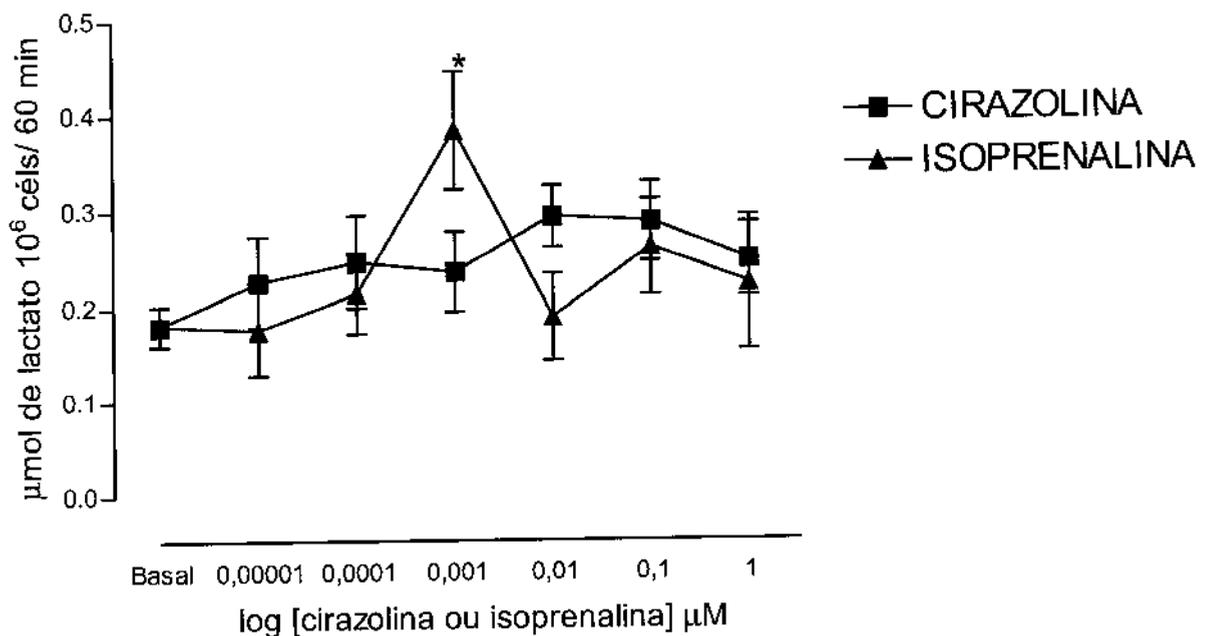


Figura 31 Curva concentração-efeito à cirazolina e isoprenalina de adipócitos isolados de tecido adiposo de obesos sobre a produção de lactato. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ céls} / 60 \text{ minutos}$) e foi aceita como diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$. O símbolo * indica os pontos das curvas que diferiram de seus respectivos basais.

Tabela 26 – Médias de liberação de lactato (μmol lactato 10^6 cels/60 minutos) no meio de incubação (KRBA), estimulada pela cirazolina ou isoprenalina em adipócitos isolados de indivíduos obesos.

	CIRAZOLINA	ISOPRENALINA
Concentração do fármaco	μmol lactato (n=10 a 13)	μmol lactato (n=5 a 13)
Basal	0,1850 \pm 0,02	0,1815 \pm 0,02
0,00001 μM	0,2260 \pm 0,05	0,1766 \pm 0,05
0,0001 μM	0,2480 \pm 0,05	0,2142 \pm 0,04
0,001 μM	0,2370 \pm 0,04	0,3840 \pm 0,06*
0,01 μM	0,2940 \pm 0,03	0,1894 \pm 0,04
0,1 μM	0,2880 \pm 0,04	0,2619 \pm 0,05
1 μM	0,2480 \pm 0,04	0,2245 \pm 0,07

* $p < 0,05$ para as concentrações que diferiram de seus respectivos basais (ANOVA seguida do teste de Dunnett).