

**Maísa Pavani dos Santos**

**EFEITOS DA DIETA HIPOPROTEICA NAS VIAS DE GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO, NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL DE RATOS EM CRESCIMENTO.**

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DA DIETA HIPOPROTEICA NAS VIAS DE GERAÇÃO DE GLICEROL-3-  
FOSFATO, NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO  
TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL DE RATOS EM  
CRESCIMENTO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Medicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Cirurgia, Nutrição e Metabolismo.

**Orientanda: Maísa Pavani dos Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Nair Honda Kawashita**

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S237e Santos, Maísa Pavani dos.  
Efeitos da dieta hipoprotéica nas vias de geração de glicerol-3-fosfato, na proliferação celular e atividade lipolítica do tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos em crescimento / Maísa Pavani dos Santos. – Cuiabá – MT: UFMT, 2009.  
91 f. : il. color. ; 30 cm

Orientadora: Dra. Nair Honda Kawashita  
Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Mestrado em Ciências da Saúde, 2009.

1. Dieta hipoproteica. 2. Metabolismo lipídico – Tecido adiposo branco. 3. Glicerol-3-fosfato. I. Título.

CDU 616-008.9

Permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte.

*“... Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como um bronze que soa, ou como um sino que tine. E, ainda, que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a **CIÊNCIA**, e tivesse toda a fé até o ponto de transportar montes, se não tivesse amor nada seria...”*

**(1 Coríntios 13, 1-2)**

**DEDICATÓRIA**

*Ao meu amado Deus pelo sustento diário, amor, proteção e socorro bem presente  
na hora da angústia.*

*Aos meus pais, Aurísio e Isabel, razões da minha vida, pelo sacrifício, incentivo,  
ensinamento, cuidados, amor, educação e exemplos de vida.*

*A minha querida irmã Michelle Pavani e meu cunhado Marcelo Almo pelo apoio,  
amor, orações e sábios conselhos.*

*Ao meu namorado Hugo Jorge, meu cúmplice, por estar sempre presente em minha  
vida, me proporcionando momentos de carinho, amor e felicidade, pelo apoio,  
paciência, incentivo e sacrifício a mim dedicado.*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ A Profa. Dra. **Nair Honda Kawashita**, minha orientadora e amiga, pelos inúmeros ensinamentos e valiosos conselhos, por sempre estar disposta e presente em todas as etapas deste trabalho científico (até mesmo nos fins de semana e feriado), por ter me acolhido 5 anos no Laboratório de Bioquímica e me mostrado o caminho da verdadeira ciência e acima de tudo pela paciência, presteza, apoio, alegrias, carinho e confiança a mim depositados. A senhora, meu eterno agradecimento pela amizade, compreensão e seriedade em todos os momentos.
- ❖ Ao Prof. **M.Sc. Christiann Davis Tosta**, meu amigo e irmão em Cristo, por todo incentivo, ajuda, ensinamentos, amizade, colaboração, orações e confiança. Obrigada pelo conforto nos momentos mais difíceis desta jornada, pelas palavras ditas segundo a vontade do Espírito Santo, pelos momentos de alegria e descontração e principalmente por me apoiar na realização deste trabalho. Uma pessoa admirável pela bondade, bom humor e sabedoria divina.
- ❖ Ao Prof. **M.Sc. Leone Covare**, diretor do IFMT Campus São Vicente, por sempre estar me apoiando em todos os momentos.
- ❖ As Profas. Dras. **Amanda Martins Baviera** e **Shirley Kuhnen** por aceitarem participar da banca de qualificação, pelas sugestões, atenção e disponibilidade em todos os momentos.
- ❖ A Profa. **Dra. Maria Teresa Pepato**, pela pronta disposição em participar da banca de defesa, pelas importantes contribuições e troca de experiência.
- ❖ A minha eterna amiga-irmã, **Suelem Aparecida de França Lemes**, pelos momentos de alegria e desabafos, pelo carinho, apoio, grande amizade, cumplicidade, pela convivência agradável e harmoniosa, por ter iniciado as primeiras pesquisas com este modelo experimental, pelos sinceros conselhos, pelo respeito e forças dadas na busca dos meus sonhos.
- ❖ Ao Dr. **Renato Hélios Migliorini** (in memorian), a Dra **Isis do Carmo Kettelhut** e ao Dr. **Luiz Carlos Carvalho** Navegantes por sempre terem contribuído nesta pesquisa, através de sugestões e disponibilidade em ensinar, bem como por sempre abrirem as portas do Laboratório de Controle do Metabolismo, da USP- Ribeirão Preto.
- ❖ Ao Prof. Dr. **Edson Molleta** e a Profa. Dra. **Caroline Argenta Pescador** pelo auxílio na análise histológica.
- ❖ Ao pessoal de Ribeirão Preto: **Danúbia Frasson**, **Valéria Chaves**, **Maria Antonieta Rissato**, **Neuza Maria Zanon** e **Elza Aparecida**, pelo auxílio, competência e pela paciência em ensinar detalhes das práticas.
- ❖ Ao **Air Francisco**, pelo auxílio, presteza, amizade, entusiasmo, harmonia e momentos de descontração.
- ❖ Ao **Celso Afonso**, pelo apoio, auxílio, paciência e disponibilidade em todos os momentos.
- ❖ A **Marlene Mariano** pela ajuda e por seu grande coração de mãe, me auxiliando e acolhendo sempre.
- ❖ Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica: **Gustavo Aiko**, **Carolinny Torres**, **João Carlos**, **Damiana Luiza**, **Thaís Favaro**, **Andressa Viegas**, **Andreza Menezes**, **Carlos Dechandt** e **Patrícia Ceolin** pela amizade, auxílio, generosidade, paciência e por terem transformado nosso ambiente de pesquisa em um ambiente familiar, repleto de harmonia, alegria e emoções.

- ❖ *A minha querida amiga **Paula Domingues Babilone** por ter me emprestado o ombro nos momentos de lágrimas, pelas caronas nos finais dos experimentos (mesmo diante do cansaço), pela pronta disponibilidade em me ouvir e principalmente pela verdadeira disposição e indispensável ajuda no desenvolvimento deste trabalho. A você minha sincera muito obrigada e minha eterna gratidão!!!*
- ❖ *A **Samyra Lopes Buzelle** pela disposição em ajudar sempre e pela paciência diante dos desencontros.*
- ❖ *A minha amiga **Cristiana Barbosa Salvatiera** pela amizade, conforto, carinho, por ter aceitado realizar todos os trabalhos das disciplinas do mestrado comigo, pela paciência em ouvir algumas vezes as mesmas coisas, pelas orações e por, apoiar meus ideais e me transmitir coragem.*
- ❖ *A minha amiga “maluquinha” **Rosângela Madalena Ferreira** por estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e dando força para lutar por meus ideais, por sempre acreditar que eu podia, por dividir comigo nossos segredos e acima de tudo pela amizade extremamente sincera, agradável e confortadora. A você minha imensa admiração!!!*
- ❖ *A minha amiga eletroforética, **Silvia Regina**, por sempre me ajudar e dar uma dica de forma alegre diante dos problemas das vias de sinalização e do western blotting, pelo exemplo de disposição, pela admirável bondade, pela serenidade mágica em fazer os experimentos e pela amizade.*
- ❖ *As minhas grandes amigas **Vera Morreto** e **Márcia Ballen** por sempre acreditarem em mim, dispondo-me todo apoio; mesmo antes do meu ingresso no mestrado, pelos conselhos, agradáveis conversas, pela capacidade de fazerem as dificuldades e obstáculos desaparecerem e pela sabedoria em me ensinar a construir meu próprio caminho.*
- ❖ *Aos meninos do Biotério “**Jorginho** e **Chiquinho**” por sempre atenderem prontamente meus pedidos com um grande sorriso, pelas conversas agradáveis e pelos cuidados com nossos lindos ratinhos.*
- ❖ *A minha amiga **Maria Meires** pela sincera amizade, confiança, admiração, apoio, pelo ombro amigo, exemplo de determinação e longas conversas e desabafos.*
- ❖ *A base da vida “**minha família**” por serem os responsáveis pela criação do meu caráter e educação, por me transmitirem ânimo, proteção e me ensinarem a aceitar as coisas que não posso modificar e a ter coragem para modificar as que posso. Meus sinceros agradecimentos, a DEUS, por ter vocês ao meu lado.*
- ❖ *Ao **CAPES** pelo apoio financeiro.*
- ❖ *A **todos** que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.*
- ❖ *A **Universidade Federal de Mato Grosso**.*



## RESUMO

Em estudos prévios, ratos em crescimento submetidos à uma dieta com restrição de proteína apresentam ao final de 15 dias aumento no conteúdo de lipídeos (aumento no peso dos tecidos adiposos) e diminuição de proteína e água, com redução do peso corporal. O glicerol-3-fosfato (G3P) necessário para esterificação dos ácidos graxos (AGs) e formação de triacilgliceróis (TAG), pode ser gerado através de três vias: a partir da glicose, pela gliceroneogênese e através da fosforilação direta do glicerol pela enzima gliceroquinase (GK). O objetivo deste trabalho foi aprofundar o estudo do metabolismo lipídico no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR), nos seguintes aspectos: **1.** Verificar a natureza hiperplásica do aumento do TABR; **2.** Avaliar individualmente as vias de geração de G3P; **3.** Avaliar a atividade lipolítica; **4.** Avaliar a sensibilidade do tecido à insulina e ao agente lipolítico noradrenalina. Foram utilizados ratos machos, pesando aproximadamente 100g, tratados com dieta contendo 17% de proteína (Grupo N) ou hipoproteica com 6% de proteína (Grupo H). Todas as determinações foram realizadas ao final de 15 dias de dieta. Na análise dos dados foram utilizados o teste t-Student e ANOVA 2 vias ( $p < 0,05$ ). Através de contagem de células em câmara de Neubauer, da suspensão de adipócitos isolados, e da histologia do TABR, constatou-se aumento de 26% no número de células com uma maior frequência relativa de adipócitos pequenos ( $< 2930 \mu\text{m}^2$ ). A atividade lipolítica basal e a sensibilidade à noradrenalina ( $10^{-7}$  M) foram avaliadas, *in vitro*, em adipócitos isolados, pela medida da liberação de glicerol no meio de incubação. A quantidade de glicerol basal liberado pelos adipócitos dos ratos H foi menor do que os adipócitos dos ratos N. A resposta dos adipócitos na presença de noradrenalina e a concentração dos ácidos graxos livres séricos, após 12 horas de jejum, não foram alterados pela dieta. A avaliação das vias de geração de G3P mostrou um aumento da atividade da gliceroquinase (GK), uma redução na expressão de PEPCK (Western-blot) e não alterou a incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em glicerol de triacilglicerol (GLI-TAG), em adipócitos dos animais H quando incubados sem insulina. Quando os adipócitos foram incubados com insulina, constatou-se que, diferentemente dos adipócitos dos animais N, os adipócitos dos animais H não foram sensíveis ao estímulo. Tendo em vista a importância da insulina na adipogênese, geração de G3P e como agente anti-lipolítico, foram avaliadas a expressão das proteínas envolvidas na sua via de sinalização. Foi observada uma redução na expressão do IRS1 e AKT. O conjunto de dados deste trabalho permite concluir que:

- ❖ O aumento dos depósitos de lipídeos do TABR ocorre por hipertrofia e hiperplasia;

- ❖ Houve uma redução da expressão da PEPCK provavelmente com redução de G3P a partir da gliceroneogênese, que parece ter sido compensada pela geração de G3P a partir da fosforilação do glicerol (maior atividade da GK e menor liberação de glicerol no meio de incubação com adipócitos);

- ❖ A redução das proteínas de sinalização da insulina e a ausência de resposta à insulina nos experimentos de incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em glicerol, sugere uma redução na sensibilidade à insulina no TABR destes animais.

**Palavras chaves:** Dieta hipoproteica, metabolismo lipídico, tecido adiposo branco retroperitoneal, Glicerol- 3- fosfato.

## ABSTRACT

In previous study, rats in growing treated a low-protein diet showed at the end of the 15<sup>th</sup> day of treatment increase in lipid content (increase in weight adiposes tissues) and decrease in protein and water, with reduction in body weight. The necessity of glycerol-3-phosphate (G3P) to esterificate the fats acids (FAs) and to build the triacilglicerides (TAGs) can be generated through three pathways: from the glucose, through glyceroneogenesis and by glycerol direct phosphorylation by glycerokinase (GyK). The aim of this work was to make a profound study of lipid metabolism in retroperitoneal white adipose tissue (RWAT), in these aspects: **1.** To verify the hyperplasic nature in the RWAT increase; **2.** To evaluate the pathways of G3P generation; **3.** To evaluate the lipolytic activity; **4.** To evaluate the insulin and norepinephrine lipolytic agents sensibility in the tissue. Male rats weighting about 100g, treated with diet content 17% protein (Group N) or low-protein diet with 6% protein (Group LP) were used. All determinations were realized after 15 days of treatment with the diet. In the data analysis were utilized Student`s test and ANOVA two ways ( $p < 0.05$ ). In the suspension adipocytes cells counting, in Neubauer`s camera and in the RWAT histology, was verified an increase of 26% in cells number with more relative frequency of smaller adipocytes ( $< 2930 \mu\text{m}^2$ ). The basal lipolytic activity and the norepinephrine sensibility ( $10^{-7}$  M) was availed, *in vitro*, in isolated adipocytes by measuring of the glycerol released in incubation medium. The basal glycerol quantity released by rats LP adipocytes was lower than in the rats N adipocytes. The adipocytes response in norepinephrine presence and the serum fat acids concentration, after 12 hours fasting, did not was altered by diet. The assessment of the G3P ways showed an increase of the GK activity and a decrease in PEPCK expression (Western-blot) and did not show alterations in the incorporation of the U-<sup>14</sup>C-glucose in glycerol by triacilglycerol (GLY-TAG), in LP adipocytes, when incubated without insulin. When the adipocytes of the LP animals, were incubated with insulin, the results showed that, differing of the N adipocytes, the LP animal`s adipocytes were not sensible to stimuli. Considering the insulin importance in adypogenesis, G3P generation and as anti-lypolitic agent, the protein expression involved in your signaling pathway was evaluated. A decrease in IRS1 and AKT expression was observed. With these results was possible to conclude:

- ❖ The lipid deposit increasing in RWAT was caused by hypertrophy and hyperplasia;
- ❖ A PEPCK expression decrease, probably by G3P decrease by glyceroneogenesis, looking like be compensated by G3P generate by glycerol phosphorylation (increase of GyK activity and decrease of glycerol release in incubation medium with adipocytes);
- ❖ The reduction of the insulin signalization proteins and the absence of the insulin response in the assessments with U-<sup>14</sup>C-glucose in glycerol incorporation, suggests a decrease in the insulin sensibility in animal`s RWAT.

**Keywords:** Low-protein diet, lipid metabolism, retroperitoneal White adipose tissue, glycerol-3-phosphate.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Lipólise .....	21
2.2 Proliferação celular .....	29
2.3 Vias de geração de G3P .....	32
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38
<b>4. MÉTODOS ..</b>	<b>39</b>
4.1 Animais e dieta .....	40
4.2 Histologia do TABR.....	42
4.3 Dosagem de ácidos graxos séricos.....	42
4.4 Avaliação da atividade lipolítica .....	43
4.4.1 Isolamento e contagem de adipócitos.....	43
4.4.2 Lipólise <i>in vitro</i> .....	44
4.5 Avaliação das vias de geração de G3P.....	44
4.5.1 Atividade da gliceroquinase.....	45
4.5.2 Determinação do conteúdo protéico da PEPCK .....	46
4.5.3 Incorporação de U- <sup>14</sup> C- glicose em glicerol de TAG .....	48

4.5.4 Extração de lipídeos totais e isolamento de AG e fração GLI-TAG.....	48
4.6 Determinação do conteúdo protéico de intermediários da via de sinalização da insulina .....	50
4.7 Análise estatística .....	50
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
5.1 Morfologia do TABR e número de adipócitos .....	52
5.2 Avaliação da lipólise .....	54
5.2.1 Lipólise <i>in vitro</i> .....	54
5.3 Determinação de AGs séricos.....	56
5.4 Vias de geração de G3P.....	57
5.4.1 Atividade da gliceroquinase.....	57
5.4.2 Determinação do conteúdo protéico da PEPCK.....	58
5.4.3 Incorporação de U- <sup>14</sup> C-glicose em glicerol.....	59
5.5 Determinação do conteúdo protéico de intermediários da via de sinalização da insulina.....	61
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Via de sinalização da insulina .....	31
Figura 02: Vias de geração de G3P no TAB .....	33
Figura 03: Número de adipócitos ( $n^{\circ}$ células/mL) do TABR de ratos tratados com dieta N ou H ao final de 15 dias de tratamento .....	52
Figura 04: Distribuição relativa de adipócitos do TABR, por área, provenientes de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento.....	53
Figura 05: Corte histológico seccional do TABR (20x), de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento .....	54
Figura 06: Glicerol liberado ( $\mu\text{mol} \cdot 10^6 \cdot \text{células}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), no meio de incubação, por adipócitos isolados do TABR de ratos N e H, ao final de 15 dias de tratamento, sem (basal) e com noradrenalina ( $10^{-7}$ M) .....	56
Figura 07: Atividade da gliceroquinase no TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento .....	58
Figura 08: Efeito da dieta N e H sobre o conteúdo da PEPCK no TABR ao final de 15 dias de tratamento .....	59
Figura 09: Efeito da dieta N e H na incorporação basal e estimulada, de $U\text{-}^{14}\text{C}$ -glicose em glicerol-TAG ( $\text{nmol}/10^6 \cdot \text{células}^{-1} \cdot \text{h}$ ), no TABR de ratos machos ao final de 15 dias de tratamento. ....	60
Figura 10: Efeito da dieta N ou H no conteúdo da proteína IR $\beta$ do TABR de ratos machos ao final de 15 dias de tratamento.....	61

Figura 11: Efeito da dieta N e H no conteúdo da proteína IRS-1 do TABR de ratos machos ao final de 15 dias de tratamento .....	62
Figura 12: Efeito da dieta N e H no conteúdo da proteína PI3-K (p85 $\alpha$ ) do TABR de ratos machos ao final de 15 dias de tratamento.....	62
Figura 13: Efeito da dieta N ou H no conteúdo da proteína AKT1 do TABR de ratos machos, ao final de 15 dias de tratamento .....	63

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Composição das dietas normoproteica e hipoproteica (g/Kg), utilizadas durante 15 dias de tratamento dos grupos N e H.....	41
Tabela 02: Glicerol liberado no meio de incubação por adipócitos isolados do TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H ao final de 15 dias de tratamento, sem (basal) e com noradrenalina ( $10^{-7}M$ ) .....	55
Tabela 03: Concentração sérica (mEq/L) de AGLs de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento.....	57
Tabela 04: Atividade da gliceroquinase no TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H, após 15 dias de tratamento.....	58
Tabela 05: Incorporação basal e estimulada (1 mU/mL de insulina), de U- <sup>14</sup> C-glicose em glicerol-TAG (nmol/ $10^6$ células.h) em adipócitos do TABR de ratos machos tratados com dieta N ou H ao final de 15 dias.....	60

**LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

$^3\text{H}_2\text{O}$  – Água triciada

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ADRP – Proteína relacionada à diferenciação do adipócito

aFABP – Proteína ligante de ácidos graxos do adipócito

AG - Ácido graxo

AGLs - Ácidos graxos livres

AG-TAG – Ácido graxo de triacilglicerol

AIN – American Institute of Nutrition

ALBP – Proteína ligadora de lipídeos de adipócitos

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação animal;

G3P - Glicerol-3-fosfato

GCs – Glicocorticóides

GDP – Guanosina difosfato

$G_i$  – Proteína ligadora de nucleotídeos inibitória

GK – gliceroquinase

GLI-TAG – Glicerol-triacilglicerol

$G_s$  - Proteína ligadora de nucleotídeos estimulatória

GTP – Guanosina trifosfato

H – Hipoproteica

HC – Hormônio do crescimento

HPA – Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal



IRS-1 – Substrato do receptor de insulina 1

LHS - Lipase hormônio sensível

LPL - Lipase lipoproteica

N – Normoproteica

DHAP - Diidroxiacetona fosfato

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PKA – Proteína Kinase A

TA – Tecido Adiposo

TAB - Tecido Adiposo Branco

TABR – Tecido Adiposo Branco Retroperitoneal

TAG – Triacilglicerol

TAM – Tecido adiposo Marrom

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

Dados da literatura apontam efeitos contraditórios da restrição protéica sobre os parâmetros metabólicos, energéticos e bioquímicos. A análise destes dados mostra que as variações nos resultados se devem a muitos fatores, entre eles, o grau de restrição protéica, o tempo e a fase da vida em que ocorre a restrição, mas principalmente à relação entre o grau da restrição e o requerimento protéico do animal<sup>1,2,3,4,5</sup>. Os primeiros estudos<sup>6</sup> do nosso laboratório sobre o efeito de uma dieta hipoproteica (H - 6% de proteína), em ratos machos na fase de crescimento, mostram que esses animais, ao final de 15 dias, apresentam um aumento de 14% na ingestão absoluta e 25% na ingestão relativa de alimento, em relação aos animais que receberam uma dieta normoproteica (N - 17% de proteína). A redução de proteínas da dieta H, em calorias, foi substituída por carboidratos. O gasto energético adicional que ocorre nesta fase de desenvolvimento estimula o quadro de hiperfagia que é uma resposta do organismo para tentar suprir o requerimento de proteína. Apesar do aumento na ingestão de alimento, constatamos que ao final do período experimental, a ingestão protéica foi cerca de 60% menor do que a ingestão dos animais que receberam dieta N. Mesmo com o aumento na ingestão de calorias (já que as dietas são isocalóricas) houve uma redução de 12% no ganho de peso corporal, prejuízo no crescimento (avaliada pelo índice de Lee) e redução nas proteínas séricas totais (hipoproteinemia) nos animais H, deixando claro, que a reduzida ingestão de proteínas prejudicou o crescimento e o desenvolvimento dos animais.

Entre outras alterações, os animais H apresentaram maior gasto energético com maior ganho energético quando comparado aos animais N. O aumento no ganho energético com redução de peso corporal (mencionado anteriormente) só foi

possível graças a profundas alterações na composição química corporal, com aumento no conteúdo de lipídeos (tecidos adiposos, fígado e carcaça) e redução de proteínas (carcaça, fígado e músculos) e água.

As alterações metabólicas e no balanço energético observadas nos animais H foram acompanhadas por um conjunto de alterações hormonais e neurais; como por exemplo, maior atividade simpática (determinada pelo *turnover* de noradrenalina) no Tecido Adiposo Marrom (TAM) e Tecido Adiposo Branco Retroperitoneal (TABR) e aumento de cerca de 100% na concentração de leptina e corticosterona sérica. A avaliação da glicemia e insulinemia sugeriram um aumento na sensibilidade ao hormônio, uma vez que os animais H, alimentados, apresentaram o mesmo nível de glicemia com menor insulina plasmática; e menor glicemia de jejum sem alteração na insulina, quando comparada aos animais N.

Com o conjunto de dados obtidos nesta fase preliminar das experimentações, os animais H se mostraram extremamente interessante como modelo experimental para o estudo do metabolismo lipídico e seu controle. O quadro de adiposidade constatado nestes animais após 15 dias de tratamento com dieta restrita em proteína, poderia estar sinalizando para uma obesidade futura; já que as adaptações metabólicas nesta fase inicial são determinantes para a instalação ou não da obesidade<sup>7</sup>.

Estudos iniciais sobre o metabolismo de lipídeos realizadas no TABR<sup>8</sup> de animais deste grupo mostraram uma redução de 50% na síntese de ácidos graxos total, avaliada *in vivo* pela incorporação de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O. Constatamos, no entanto, um aumento de 100% na atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL), o que sugere que o acúmulo de triacilglicerol (TAG) possa ser decorrente de um maior aproveitamento dos ácidos graxos pré-formados provenientes das lipoproteínas

circulantes, o que não descarta, no entanto, a possibilidade de maior velocidade de reesterificação dos ácidos graxos (AG) endógenos ou uma menor velocidade de lipólise neste tecido.

Outro ponto fundamental para maior esterificação de AG e maior extensão dos depósitos de TAG é a disponibilidade de G3P. Fazendo uso do mesmo experimento de  $^3\text{H}_2\text{O}$ , avaliamos também a incorporação em GLI-TAG, onde foi constatado que não houve alteração na síntese de G3P pelo conjunto das vias da gliceroneogênese e a partir da glicose. Este experimento, no entanto, não permite avaliar cada uma das vias individualmente, o que não descarta a possibilidade de que uma delas tenha sido ativada e a outra inibida. Além disto, esta metodologia não avalia o G3P sintetizado por fosforilação do glicerol pela enzima GK que apesar de reduzida no tecido adiposo branco (em condições normais), parece ter significância em determinadas condições<sup>9</sup>.

Entre as muitas alterações hormonais constatadas nos animais H que poderiam contribuir de maneira relevante para o aumento dos depósitos de TAG, está o aumento de 100% nos níveis de corticosterona. Como já é claramente colocado na literatura, altos níveis de glicocorticóides, cronicamente, pode levar a um estado de resistência à insulina<sup>10</sup>, condizente com o acúmulo de gordura constatado nestes animais.

Como podemos perceber, as investigações iniciais já realizadas sobre o metabolismo lipídico nestes animais, suscitaram novas interrogações que merecem serem melhores esclarecidas para a compreensão do processo que conduziu a este estado de adiposidade. Diante deste fato, o nosso objetivo neste trabalho é dar continuidade a este estudo no TABR, de modo a permitir uma maior compreensão sobre os fatores e os mecanismos que determinam o acúmulo de TAG neste tecido.

Partindo do princípio, que grande parte dos casos de obesidade humana está associada, da mesma maneira nos animais H, ao aumento da ingestão de calorias totais de dietas ricas em carboidratos e com redução de proteínas; os estudos envolvidos com a adiposidade destes animais podem contribuir para melhor compreensão da obesidade humana, levando a medidas preventivas e condutas terapêuticas mais eficazes.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

---

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Lipólise

O tecido adiposo branco é o maior reservatório de energia do corpo. O papel primário dos adipócitos é estocar ácidos graxos na forma de triacilglicerol, durante o período de excesso calórico e mobilizar estas reservas, na forma de ácidos graxos livres (AGLs), quando o gasto de energia exceder a ingestão<sup>11</sup>.

O controle metabólico do TAB é realizado pela integração de fatores humorais (hormônios e substratos), locais (tamanho dos adipócitos e mecanismos parácrinos, autócrinos e endócrinos) e pelo sistema nervoso autônomo<sup>12,13,14</sup>, de acordo com a disponibilidade de substratos e as necessidades energéticas do organismo<sup>15</sup>. A quantidade de TAG armazenado no TAB é decorrente do balanço entre sua velocidade de síntese (lipogênese) e de degradação (lipólise). A taxa relativa destes processos determinará o acréscimo ou a perda líquida de lipídeos<sup>16</sup>. Independente da lipólise controlada por fatores hormonais, metabólicos e neurais, a lipólise basal ocorre continuamente nas células adiposas a uma taxa reduzida<sup>17</sup>. A mobilização dos lipídeos ocorre por hidrólise completa dos TAG pela enzima lipase hormônio sensível (LHS)<sup>18</sup>, resultando em 3 mols de AGLs e 1 mol de glicerol<sup>19</sup>. Esta enzima é agudamente estimulada por uma variedade de hormônios (adrenalina, glucagon, glicocorticóides, hormônio adrenocorticotrófico, entre outros) e pelo neurotransmissor noradrenalina<sup>12,16</sup>.

Qualquer que seja o agente promotor da lipólise, o ácido graxo e o glicerol proveniente da hidrólise dos TAG, no tecido adiposo, podem seguir diversos destinos<sup>20</sup>. O próprio adipócito pode reesterificar parte destes AGs determinando a



quantidade de AG liberados pelo tecido adiposo<sup>21</sup> na circulação, que podem então ser utilizados pelo fígado ou por outro tecido periférico<sup>20,22</sup>.

Contrariamente aos AG, a maior parte do glicerol proveniente da hidrólise dos TAG no TAB, em situações normais, é liberada dos adipócitos para reaproveitamento por outros tecidos<sup>20,21</sup>. A pouca reutilização do glicerol pelo Tecido Adiposo Branco é atribuída a uma baixa atividade da gliceroquinase, neste tecido<sup>18,21,23</sup>. Esta enzima é responsável pela fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato, para posterior reesterificação com os AG e formação dos TAG. A reduzida atividade da GK no TAB justifica a utilização do glicerol como parâmetro para avaliação da lipólise<sup>21,24</sup>.

Trabalhos têm mostrado, no entanto, que mesmo em situações normais, a atividade da GK é detectável no TAB<sup>21,25</sup>, embora seja bem mais reduzida que no fígado e apresente atividade em torno de 1/10 da atividade encontrada no TAM<sup>26</sup>. Outros trabalhos na literatura, no entanto, mostram que a GK pode ter papel importante na geração de G3P no TAB em determinadas condições, como por exemplo, em diversos tipos de obesidade. A atividade da GK em camundongos obesos ob/ob<sup>27,28</sup> e ratos Zucker fa/fa<sup>28</sup> é mais elevada do que a atividade encontrada em camundongos e ratos não obesos. A maior utilização do glicerol pelo fígado se deve a maior atividade da GK neste órgão, em relação a outros tecidos, que podem então ser utilizados não só para a reesterificação de AG, mas também, como substrato importante da gliconeogênese<sup>29</sup>.

A adrenalina e a noradrenalina são dois agentes importantes no controle do metabolismo de lipídeos. A sua ação é desencadeada após a interação destas substâncias com receptores  $\beta$ -adrenérgicos lipolíticos e pelo receptor anti-lipolítico  $\alpha_2$ . Estudos utilizando animais de laboratório e agonistas sintéticos mostram que

parte do efeito lipolítico das catecolaminas é devido ao receptor  $\beta$ -adrenérgico -  $\beta_3$  - altamente expresso no TAB, TAM e trato gastrointestinal de roedores<sup>30</sup>, e que se apresentam altamente resistentes à dessensibilização<sup>31,32</sup>.

O receptor  $\beta_3$  na superfície da membrana plasmática está associada à proteína estimulatória ligadora de nucleotídeos ( $G_s$ ), formada por 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Na forma não estimulada a subunidade  $\alpha$  se encontra ligada ao GDP. A interação das catecolaminas com o seu receptor na superfície da membrana plasmática, leva à troca de GDP por GTP na subunidade  $\alpha$ , dissociando esta subunidade das demais, formando o dímero  $\beta\gamma$ . A subunidade  $\alpha$  ligada ao GTP ativa a enzima adenilato ciclase catalisando a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Uma das principais ações do AMPc é a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), através da ligação deste nucleotídeo cíclico às subunidades regulatórias (R) da PKA, havendo a liberação das subunidades catalíticas (C), responsáveis pela fosforilação de vários substratos protéicos citoplasmáticos e nucleares, como por exemplo a fosforilação da lípase hormônio sensível, induzindo a sua ativação e a translocação do citosol para o glóbulo de gordura desencadeando a hidrólise dos TAGs estocados<sup>17,33,34</sup>.

Estudos com fracionamento celular e microscopia confocal mostram que sob condição não estimulada cerca de 50% da enzima LHS presentes na célula, estão localizadas na gota lipídica<sup>35</sup>. Apesar da presença das enzimas na superfície da célula de gordura, a lipólise basal é controlada pela presença da proteína perilipina A, que recobre a superfície do glóbulo de lipídeos nos adipócitos maduros, constituindo uma barreira que restringe a ação da LHS sob os lipídeos neutros. Essas proteínas também são fosforiladas pela PKA durante o estímulo lipolítico e após sofrerem mudança conformacional permitem o acesso da LHS ao glóbulo de

gordura<sup>36</sup>. A translocação da enzima do compartimento citosólico para a superfície da gota, como consequência da fosforilação da perilipina, embora não devidamente esclarecida, parece representar um importante passo na ativação da lipólise<sup>37</sup>. Trabalhos relatam a participação de outras enzimas que participam da lipólise no TA, como por exemplo, a lipase de triglicerídeo presente nos adipócitos e ,que catalisa a etapa inicial da hidrólise de TAG<sup>38,39</sup>. Além disso, o aumento na taxa lipolítica basal em camundongos, deficientes em LHS, sugere a existência de uma via não mediada pela LHS na lipólise das células gordurosas<sup>38</sup>. O processo de hidrólise dos TAGs é, ainda, dependente da proteína ligante de ácidos graxos do adipócito (aFABP), também chamada proteína ligadora de lipídeos dos adipócitos (ALBP) ou proteína aP2 ou proteína p15, que pertence a família de proteínas ligadoras de lipídeos. A ligação dos AGs à aFABP, favorece uma rápida saída dos AGLs dos adipócitos<sup>40</sup>, resultando no aumento da taxa lipolítica, uma vez que a remoção dos AGLs do adipócito, impede o acúmulo dos produtos da reação e evita à inibição da lipase por *feedback*<sup>41</sup>.

Estes achados deixam claro, que outras enzimas e outros fatores além da LHS contribuem para a regulação da velocidade da lipólise no tecido adiposo. Entretanto, em depósitos internos de gordura (epididimal, retroperitoneal) a atividade lipolítica é maior do que nos de gordura subcutânea, fato este, associado à maior expressão da LHS nos TABs internos, deixando clara a importância desta enzima na regulação da lipólise<sup>42</sup>.

A ação antilipolítica resultante da modulação na transdução do sinal através do sistema adenilato ciclase, pode ser decorrente da ação das prostaglandinas (E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>), adenosina e pela própria noradrenalina e adrenalina que agem via seus receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, os quais se encontram acoplados a proteína G inibitória

ligadora de nucleotídeos (Gi), e cuja ativação leva à inibição da atividade da adenilato ciclase. Desta forma, as catecolaminas podem estimular ou inibir a lipólise, sendo o efeito final, dependente do número relativo de receptores  $\beta$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de cada adipócito<sup>17</sup>.

A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos<sup>43</sup>, também exerce ação estimulatória sobre a atividade lipolítica. Após sua ligação ao seu receptor no hipotálamo, a leptina induz uma série de eventos neurais que culminam na estimulação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) que inervam os adipócitos do TAB e TAM<sup>44</sup>, resultando na ativação dos receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos. No entanto, camundongos transgênicos que super-expressam o gene da leptina (LepTg) apresentaram significativa redução na atividade lipolítica basal, contrariando a hipótese de que a hiperleptinemia crônica e constante, pode levar à ativação do SNS e a um estado crônico de lipólise. A reduzida atividade lipolítica do TAB dos camundongos LepTg foi resultante de uma diminuição de aproximadamente 30% na atividade da PKA, acompanhada da redução nos níveis da proteína relacionada à diferenciação do adipócito (ADRP) e da atividade das perilipinas A e B<sup>45</sup>.

Além do controle agudo, a atividade lipolítica do TAB, está sujeita a um controle endócrino crônico pelos glicocorticóides (GCs), que são liberados pela glândula adrenal, e cuja secreção é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise, mediante estímulo do hipotálamo (eixo hipotálamo-pituitário-adrenal - HPA). A importância dos GCs na modulação dos níveis de AGLs plasmáticos, se mostra evidente com a constatação de que o aumento nos níveis de AGs na circulação inibe o eixo HPA por um sistema clássico de retroalimentação<sup>46</sup>.

A ação dos GCs sobre a lipólise parece ocorrer em conjunto com o hormônio do crescimento (HC), estimulando a liberação de glicerol e ácidos graxos por

mecanismos que envolvem a síntese protéica<sup>47</sup>. *In vitro*, a adição de HC a fragmentos do TAB ou a adipócitos isolados, promoveu uma mobilização de AGs somente após 2 h de incubação; um efeito que foi potencializado pelos pela adição de GCs<sup>48</sup>. Estudos em adipócitos de humanos e de ratos, mostram também uma ação lipolítica direta deste hormônio, aumentando a expressão da LHS, via o fator de transcrição nuclear PPAR $\alpha$ , cuja atividade catabólica favorece também a  $\beta$ -oxidação dos AGs e a hidrólise dos TAGs das lipoproteínas, mediada pela indução da síntese de LPL. Esta indução da lipólise pelo PPAR $\alpha$ , pode ser desencadeada também pela leptina<sup>49,50</sup>.

Além desta ação direta, o tratamento em conjunto com HC e dexametasona em ratos, aumentam também a sensibilidade das células de gordura à ação lipolítica das catecolaminas e teofilinas, sendo este efeito atribuído ao aumento de AMPc no meio intracelular<sup>51</sup>. Adipócitos isolados do TAB de animais adrenalectomizados apresentam uma redução da resposta lipolítica à adrenalina e ACTH<sup>14,52</sup>; assim como, o tratamento *in vivo* com o HC e GC promoveram um significativo aumento na liberação de AGs pelo Tecido Adiposo epididimal, sem nenhuma alteração do glicerol. Tal fato só pode ser explicado pelo maior reaproveitamento do glicerol no próprio adipócito, após a hidrólise dos TAG.

A complexidade para estabelecer as várias ações dos GCs no metabolismo, aumenta à medida que as ações deste hormônio em diferentes órgãos (fígado e tecido adiposo) e nos diferentes depósitos de gordura corporal, são variadas. Enquanto aumentam a lipólise por indução na atividade da LHS e diminuição da LPL<sup>53</sup> nos depósitos de tecido periférico, eles promovem a diferenciação dos pré-adipócitos, estimulam a atividade da via pré-lipogênica e levam a hipertrofia da gordura central<sup>54,55,56</sup>.

O aumento na hidrólise dos TAGs, com liberação de AGs desenvolvem um papel chave no enfraquecimento da ação da insulina no músculo e fígado. Assim, os GCs influenciam diretamente o sistema de sensibilidade à insulina<sup>57</sup>, em virtude de sua função regulatória no metabolismo do tecido adiposo.

A insulina, como os GCs, exerce também regulação aguda e crônica sob a lipólise por meio de processos dependentes ou não de AMPc. A supressão da lipólise dependente de AMPc, induzida pela insulina, envolve a ativação de fosfodiesterases tipo 3B<sup>58</sup>, enzima responsável pela degradação do AMPc no adipócito. Este processo se inicia, após a ligação da insulina na subunidade extracelular do seu receptor (IR), promovendo a sua autofosforilação, e subsequentemente a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1), que permite a interação do domínio SH2 da subunidade regulatória (p85) da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) estimulando a sua atividade de fosforilação de fosfolipídeos de membrana na posição 3 do anel inositol, ocorrendo a geração de fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). A PIP2 e PIP3 recrutam várias proteínas para a membrana plasmática, dentre elas proteína kinase B (PKB, também conhecida como AKT), formas atípicas da proteína kinase C (PKC) e proteína kinase-1 e 2 dependente de fosfoinositol (PDK-1 ou PDK-2). PDK-1 ativada tem como substratos PKC e AKT. A fosforilação de AKT em resíduos específicos de serina e treonina resulta em sua ativação enzimática, permitindo que se separe do complexo formado na membrana plasmática e, então, realize fosforilação de vários substratos como, por exemplo, a fosfodiesterase que, então, se torna ativa. Com isto ocorre redução dos níveis do AMPc e conseqüentemente da PKA; o que reduz a fosforilação da LHS e perilipinas, diminuindo a hidrólise dos TAG. A regulação da lipólise pela insulina por uma via independente do AMPc

envolve a estimulação da fosfatase-1 que defosforila a LHS, causando assim, redução na taxa lipolítica<sup>59,60,61,62,63</sup>.

A quantidade e a composição da dieta podem, portanto, influenciar potencialmente a via lipolítica, uma vez que podem provocar alterações na concentração sérica dos hormônios que agem de forma aguda ou crônica e/ou por alterações na atividade simpática. De maneira geral, o excesso de energia na dieta contribui para redução da lipólise em adipócitos<sup>17</sup>. Entretanto, em seus trabalhos Garcia-Diaz (2008)<sup>64</sup> e Arner (1999)<sup>65</sup> mostram que, em adipócitos isolados do TABR de ratos alimentados com dieta cafeteria, há um aumento da lipólise induzida por isoproterenol quando comparados a ratos controles.

Apesar da atividade lipolítica ser mais sensível à disponibilidade de nutrientes, a composição da dieta, pode também alterá-la, inclusive ativando outros mecanismos diferente dos citados anteriormente. Uma ingestão de dieta rica em carboidratos<sup>66</sup> ou lipídios<sup>67</sup>, por exemplo, pode levar a um acúmulo de gordura e aumento na lipólise basal, com aumento na concentração celular de AGLs. Como mecanismo compensatório para evitar a depleção dos estoques, ocorre a ativação de proteínas quinases estimuladas por AMPc, que fosforilam a LHS em outros sítios, inibindo a enzima<sup>17,68</sup> e conseqüentemente levando à inibição da lipólise<sup>69</sup>. Já o tratamento de ratos em crescimento, por 15 dias, com uma dieta hiperprotéica, livre de carboidratos, mostrou uma redução na mobilização dos AGLs, *in vivo*, acompanhado por uma redução na taxa lipolítica basal do TAB epididimal, *in vitro*, avaliada pela liberação de AGLs e glicerol no meio. A resposta lipolítica máxima desses animais foi ainda menor, quando estimulada por agonistas adrenérgicos não-específicos (noradrenalina, adrenalina, isoproterenol e fenilefrina), específicos (dobutamina, clenbuterol, BRL37,344 e CL316,243) ou agentes lipolíticos

intracelulares (dibutiril-AMPC, forskolina e isobutilmetilxantina). A avaliação do mecanismo bioquímico envolvido na redução desta taxa lipolítica demonstrou que, nestes animais, há uma relativa diminuição da atividade total da LHS e da sua translocação para a superfície de gordura, sem nenhuma mudança do seu conteúdo no tecido. Esses dados, portanto, sugerem que a adaptação a dieta hiperprotéica resulta em um aumento proporcional na forma defosforilada da LHS<sup>70</sup>. Por outro lado, quando animais são submetidos à restrição de proteína na vida intrauterina e neonatal, os adipócitos desses animais exibem aumento na taxa lipolítica na fase adulta e quando estimulada por isoproterenol<sup>71</sup>, sugerindo uma maior sensibilidade à ação das catecolaminas.

## 2.2 Proliferação celular

Investigações morfológicas do TAB de animais ou pessoas obesas têm mostrado que a hipertrofia dos adipócitos pode ser acompanhada de hiperplasia, quando comparada a animais não obesos<sup>72,73,74</sup>. Além do maior tamanho, estas células exibem redução na captação de glicose e são mais resistentes à insulina<sup>74</sup>.

Além da interação célula-célula ou matriz celular, sinais hormonais e nutricionais afetam a diferenciação do adipócito de maneira positiva ou negativa e são importantes na regulação do processo<sup>75,76</sup>.

Estudos sobre o complexo arranjo de eventos que envolvem proliferação e diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos, tem sido extensivamente conduzidos, com o intuito de desvendar a base molecular e celular envolvida no desenvolvimento do tecido adiposo e o seu comprometimento em estados fisiológicos e patológicos. O processo de diferenciação é altamente controlado, pelos fatores de transcrição da proliferação celular incluindo o PPAR $\gamma$ <sup>43</sup> (*peroxisome*



*proliferator-activated  $\gamma$* ), SREBP-1c<sup>77</sup> (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins-1C*) e as C/EBPs<sup>43,76,78</sup> (*CCAAT/enhancer binding protein*) que desempenham papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a proliferação.

As proteínas SREBP, composta por dois membros: o SREBP-1 e o SREBP-2, possuem importante papel não só na adipogênese, mas também na sensibilidade insulínica e na homeostase dos ácidos graxos<sup>79</sup>. *In vivo*, a associação entre o fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1), com a isoforma SREBP-1c, aumentou a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , elevando a proporção de células submetidas ao processo de diferenciação<sup>80</sup>. Além desses, o C/EBP, proteína altamente expressa no tecido adiposo, também induzem a hiperplasia, possivelmente estimulando a expressão do PPAR $\gamma$ , um dos três membros da super família dos receptores de hormônios nucleares ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ) requerido para a diferenciação do adipócito normal<sup>81</sup>.

A cascata de sinalização do PPAR $\gamma$  é dependente dos ligantes, que por sua vez podem ser naturais ou endógenos, como os ácidos graxos (linoléico, linolênico e araquidônico) e seus derivados; ou sintéticos, como as drogas pertencentes à classe das tiazolidinedionas - TZD (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona) que aumentam a sensibilidade à insulina<sup>43,76,78,82</sup>.

Os glicocorticóides exercem efeitos tanto sobre a hipertrofia como a hiperplasia do TAB<sup>54,56</sup>. Camundongos com ausência da enzima 11 $\beta$ HSD, essencial para aumento dos níveis locais de glicocorticóides<sup>83</sup>, são caracterizados por apresentarem aumento no tamanho de adipócitos<sup>10</sup>. Além disso, a diferenciação de pré-adipócitos em modelos de cultura de células primárias também são promovidas por esse hormônio<sup>84</sup>. O efeito dos GCs sobre a diferenciação é mediado, pelo menos em parte, por uma função não transcricional dos receptores de glicocorticóides

(GRs) que resulta em aumento na expressão de elementos críticos, como o fator de transcrição C/EBP $\alpha$ <sup>85</sup>. Além disso, os GRs também se associam a fatores de transcrição da tradução do sinal e ativadores da transcrição (STAT), que por sua vez, promovem a diferenciação de adipócitos<sup>86</sup>.

Paralelamente a ação das proteínas envolvidas na proliferação celular e diferenciação de pré-adipócitos, acima citadas, a insulina também exerce importante papel na expressão do gene do PPAR $\gamma$  e conseqüentemente na diferenciação celular. Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Essa via, inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2<sup>87</sup>, que está constitutivamente associada a SOS. Após a troca de GDP por GTP, pela SOS, ocorre a ativação da Ras que estimula a fosforilação e diferenciação celular<sup>88</sup> (Figura 01).

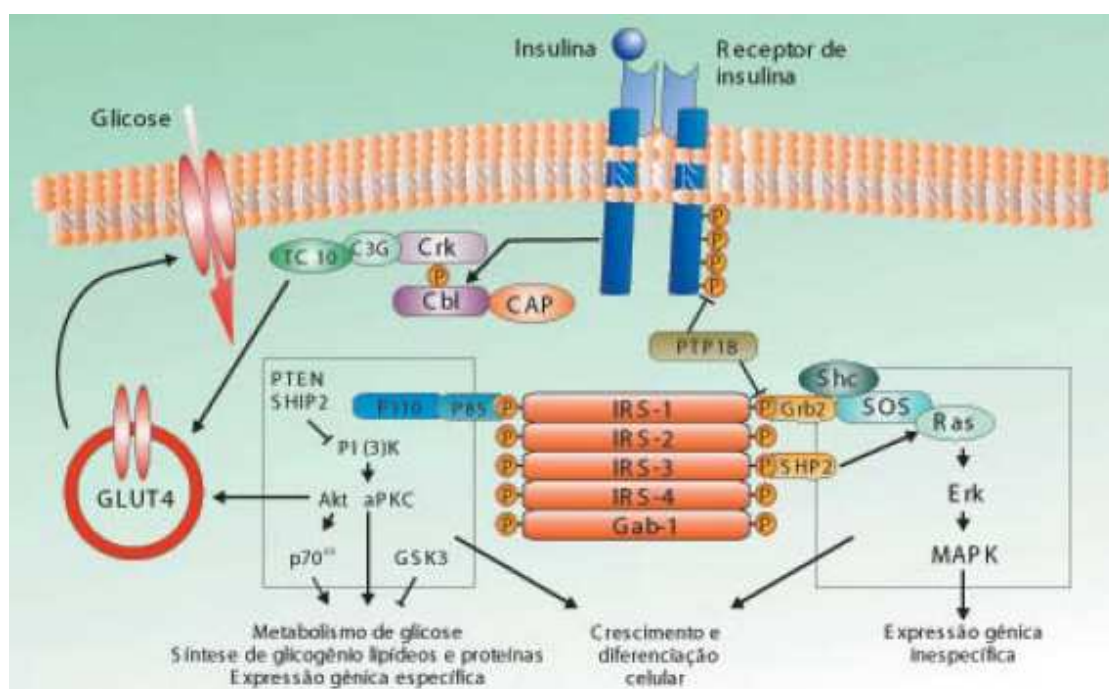


Figura 01: Via de sinalização da insulina

Estudos têm mostrado que o número de células adiposas pode aumentar quando ratos são alimentados com dieta rica em carboidratos ou lipídeos<sup>75,89</sup>. A hipertrofia dos adipócitos, devido ao aumento na ingestão de calorias, favorece a liberação de AGLs para a circulação sanguínea, levando a utilização preferencial de AG derivados do TAG, como substratos energéticos, e conseqüentemente diminuição da mobilização dos estoques de glicose<sup>90</sup>. Tal efeito resulta em hiperlipidemia, intolerância à glicose, resistência periférica à ação da insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia<sup>91</sup>. Wueest et al (2008)<sup>89</sup>, demonstraram que em casos de hipertrofia induzida pela dieta, parece que os adipócitos não são determinantes diretos da severa resistência à insulina no tecido destes animais; entretanto, o aumento na taxa lipolítica basal destes adipócitos, parece contribuir para uma resistência insulínica em diversos locais do organismo, como conseqüência de alterações na secreção de adipocina e liberação de AGLs.

Lembramos ainda, que mudanças na expressão dos fatores de transcrição além de regular a diferenciação ou hipertrofia das células, afeta também o metabolismo e outras funções do tecido. O metabolismo do adipócito e a menor expressão de C/EBPs, por exemplo, prejudicam a tolerância à glicose através do comprometimento da expressão da isoforma do transportador de glicose - GLUT4<sup>75</sup>.

### **2.3 Vias de geração de G3P**

Os AGs, utilizados para esterificação e manutenção dos estoques TAG podem ser provenientes de duas fontes: **a)** os sintetizados *de novo* a partir da glicose ou de outros compostos produtores de acetil-CoA e; **b)** os pré-formados provenientes da hidrólise dos TAGs endógenos ou captados da circulação. Os AGs endógenos são provenientes da ação da LHS sobre ao TAG armazenados nos

adipócitos. Os AGs captados da circulação são resultantes da ação da lipase lipoprotéica (LPL) promovendo a hidrólise dos TAG dos quilomicrons provenientes do intestino ou das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) secretadas pelo fígado. Independente da origem dos ácidos graxos, sua deposição como TAG requer adequado fornecimento de G3P. Atualmente, sabe-se que existem três vias de geração de G3P (Figura 02): 1) a partir de glicose ; 2) pela gliceroneogênese; 3) pela fosforilação do glicerol pela GK. A velocidade destas vias sofre influência de fatores metabólicos, nutricionais, hormonais e neurais, fornecendo G3P adequado para esterificação dos AGs.

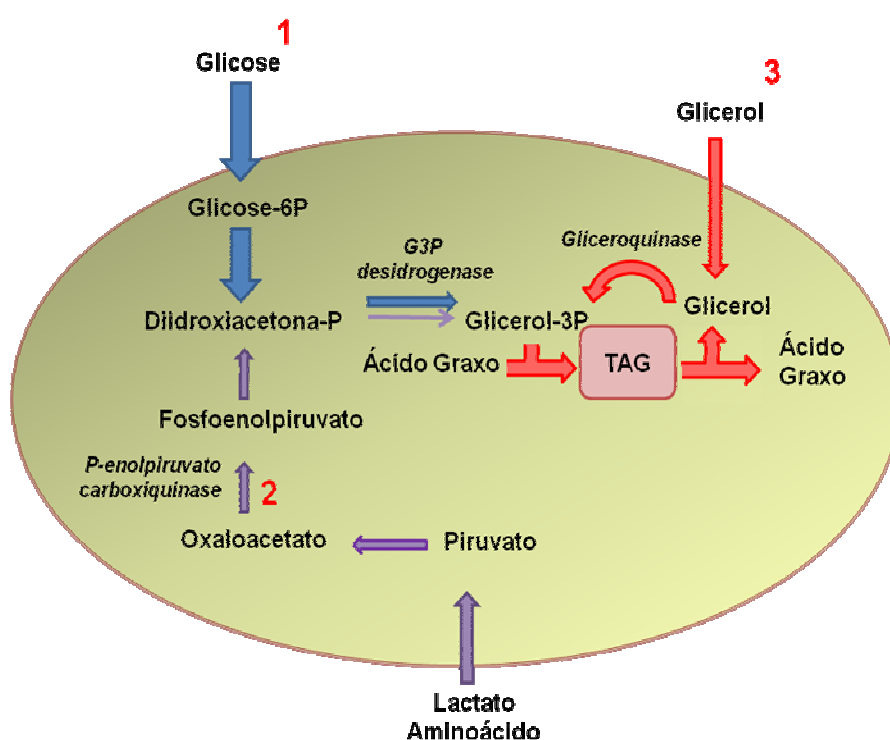


Figura 02: Fontes e vias de geração de G3P no TAG.

A via clássica de geração de G3P pelo TAG é a síntese a partir de carbonos da glicose que é convertido à dihidroxiacetona fosfato, um intermediário da via glicolítica, com posterior redução à G3P pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Esta via é ativa quando os níveis de glicose no meio intracelular

estão elevados e uma contínua produção de DHAP gera G3P para a reesterificação. Acima de 50% da glicose captada pelos adipócitos são normalmente usados para sintetizar glicerol e AG que compõem o TAG<sup>92</sup>.

O maior regulador da diferenciação de adipócitos, o PPAR $\gamma$ , desempenha importante papel na captação e controle da homeostase da glicose no TAB<sup>93</sup>, além de contribuir positivamente com a sensibilidade à insulina. O efeito do PPAR $\gamma$  sobre a sensibilidade à insulina parece ser decorrente da redistribuição dos TAG dos TAB viscerais para os subcutâneos. Mulder et al (2005)<sup>94</sup> demonstraram que a captação de glicose estimulada pela insulina pode ser diminuída na presença de catecolaminas e esse efeito inibitório ocorre via receptores  $\beta$ -adrenérgicos, provavelmente  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . O tratamento de adipócitos 3T3-L1 com antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos causou aumento na captação de glicose, mas nenhum efeito foi observado quando os adipócitos foram tratados com antagonista  $\alpha$ -adrenérgico. Este mesmo trabalho demonstrou que as catecolaminas interferem negativamente na translocação dos GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática.

A geração de G3P a partir da fosforilação direta do glicerol pela GK está associada com uma maior reciclagem do glicerol oriundo da hidrólise dos estoques de TAG intracelulares. Apesar da baixa, mas detectável atividade da GK no TABR já citado anteriormente (lipólise), ratos submetidos à desnervação simpática do TABR apresentam redução na transcrição<sup>95</sup> e na atividade da enzima<sup>96</sup>. A infusão prolongada de noradrenalina e de agonista  $\beta_3$ -adrenérgicos (CL216243) aumenta a atividade da GK, sugerindo um controle direto do SNS mediado por receptores do tipo  $\beta_3$ . Animais adaptados à dieta hiperprotéica com reduzida atividade simpática e baixos níveis de insulina mostraram diminuída fosforilação direta do glicerol pela GK.

A atividade da GK tem também sido associada a uma relação direta com a ativação do PPAR $\gamma$ , o que sugere fortemente que a GK pode ser ativada não só por fatores neurais, mas também hormonais<sup>96</sup>.

A gliceroneogênese é a via de síntese de G3P a partir de outros precursores, que não a glicose e glicerol; como por exemplo, através do piruvato, lactato, alanina e intermediários do ciclo do ácido cítrico. Tem sido sugerida como uma via importante para a formação de G3P, em situações de baixa disponibilidade de glicose<sup>97,98,99</sup>, como o jejum, reduzindo a liberação de AGs provenientes do aumento da lipólise no tecido, na circulação sanguínea. Através da reesterificação de 30-60% dos AGs, os estoques de gordura dos adipócitos são parcialmente mantidos, mesmo no jejum<sup>99,100</sup>. A importância fisiológica da PEPCK na homeostase e estocagem de AGs foi definitivamente confirmada pelo fenótipo de camundongos alimentados com dieta rica em lipídeo, nos quais a expressão da PEPCK foi anulada ou superexpressa. A deleção do gene da PEPCK nestes animais resultou em redução dos depósitos de TAB, lipodistrofia e predisposição a resistência à insulina<sup>101</sup>. Por outro lado, a superexpressão da enzima levou os animais a se tornarem obesos, com aumento dos estoques de TAG, sem exibirem aumento nos níveis de AG plasmáticos<sup>102,103</sup>. A forma citosólica da PEPCK que catalisa a descarboxilação do oxalacetato (dependente de GTP) formando fosfoenolpiruvato é a enzima chave da gliceroneogênese. Segundo Forest et al (2003)<sup>104</sup> a expressão PEPCK no TAB reflete a gliceroneogênese no tecido. A expressão gênica da PEPCK só ocorre em células no estado diferenciado e a sua transcrição no tecido adiposo requer alguns fatores que incluem o PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ . Há também uma regulação hormonal da sua transcrição no tecido adiposo com uma indução sendo observada pelo AMPc e uma inibição por glicocorticóides e insulina<sup>101,104</sup>. A regulação da PEPCK pelos

glicocorticóides no TAB é antagônica à encontrada no fígado, visto que ele induz a expressão da enzima no fígado e inibe no TAB. A redução na taxa de transcrição do gene se dá através de um mecanismo que envolve o receptor dos glicocorticóides. Estudos mostraram que o tratamento de ratos com dexametasona, não apenas reduziu a expressão basal da PEPCK, mas também reprimiu a indução por outros agentes como isoproterenol ou AMPc, ácido retinóico, fibrastos, AGs e tiazolinedionas, estabelecendo a ação dominante dos glicocorticóides na expressão do gene<sup>105,106</sup>.

Uma vez que a via de aumento na expressão da PEPCK é ativada durante o jejum, foi observado, ainda, que agonistas  $\beta$ -adrenérgicos como noradrenalina e isoproterenol estimulam a expressão do gene da PEPCK-C. A ação do AMPc, gerado na cascata estimulada, por exemplo, pelos agonistas acima citados, bem como pelo ácido retinóico, sobre a expressão da enzima é direta (não requer a síntese protéica) e são exercidas a nível transcricional do gene, embora um mecanismo pós-transcricional tenha sido observada com isoproterenol<sup>104</sup>.

A expressão gênica da PEPCK também é controlada por nutrientes: a glicose, por exemplo, inibe a expressão do gene da PEPCK em fragmentos de cultura de tecido adiposo. Além disso, o tratamento, por 15 dias com dieta cafeteria, rica em carboidrato, diminuiu a atividade da PEPCK no TAB<sup>107</sup>, provavelmente por atuar sobre a transcrição do gene<sup>97</sup>, com uma redução de 70-80% nos níveis de RNAm no período de 3h. Já os AG insaturados, tanto mono como poliinsaturados, induzem fortemente e rapidamente a transcrição do gene da PEPCK-C em adipócitos 3T3-F442A.

Ratos adultos que receberam dieta hiperprotéica, livre de carboidratos, por 15 dias, mostraram um aumento na ativação da via gliceroneogênica, avaliada pela

atividade da PEPCK, incorporação de piruvato e lactato em GLI-TAG. O aumento desta via foi fundamental para o maior aproveitamento dos AG derivados da dieta, para que estes animais mantivessem seus estoques de gordura corporal<sup>108</sup>.

Por outro lado, os efeitos da restrição moderada de proteína, sobre as vias de geração de G3P, em ratos na fase de crescimento e desenvolvimento, ainda não foram investigados por nenhum trabalho da literatura. Entretanto, as alterações metabólicas provocadas pela ingestão desse tipo de dieta, necessitam serem melhores entendidas, uma vez que podem determinar o desenvolvimento da obesidade na vida adulta.



### **3. OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da dieta hipoproteica sobre as vias de geração de glicerol-3-fosfato, a proliferação celular e atividade lipolítica, no tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos machos em crescimento.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ❖ Realizar o estudo morfológico do TABR, pela avaliação do número e da área dos adipócitos;
- ❖ Avaliar, *in vitro*, a atividade lipolítica basal e estimulada com noradrenalina;
- ❖ Determinar a concentração de ácidos graxos livres na circulação sanguínea, de animais em jejum, ao final de 15 dias de experimento;
- ❖ Avaliar as vias de geração de glicerol-3-fosfato:
  - A partir da glicose, pela avaliação da incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol-TAG, em adipócitos isolados;
  - Pela gliceroneogênese, através da determinação do conteúdo protéico total da PEPCK;
  - Pela reciclagem do glicerol endógeno proveniente da hidrólise dos TAG, mediante a avaliação da atividade da enzima gliceroquinase;
- ❖ Determinar o conteúdo total das proteínas da via de sinalização da insulina (IR<sub>β</sub>, IRS-1, p85<sub>α</sub> e AKT).

## **4. MÉTODOS**

---

## 4. MÉTODOS

Todos os experimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá - Brasil. Os procedimentos experimentais foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFMT sob protocolo nº 23108.033936/08-3.

### 4.1 Animais e dieta

Os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso. Foram utilizados ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, pesando entre 90-100 g no início dos experimentos. Antes da realização dos experimentos os animais foram mantidos por um período de adaptação ao ambiente, de pelo menos 48 h, em caixas de polipropileno e tratados com água e ração Purina<sup>®</sup> (LÁBINA) *ad libitum*. Em seguida, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas e mantidos à temperatura controlada de  $23^{\circ} \pm 1$  °C, umidade relativa de 55%, ciclo claro/ escuro de 12 h, passando a receber dieta normoproteica (N) com 17% de proteína ou hipoproteica (H) com 6% de proteína, durante 15 dias.

A diferença em calorias resultante da redução de proteína na dieta H foi compensada com o equivalente em carboidratos, mantendo-as isocalóricas (15,74 kJ/g) e contendo a mesma quantidade de vitaminas e minerais. A composição da

dieta normoproteica seguiu as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93G) para roedores nas fases de crescimento, gravidez e lactação (Tabela 1).

Todas as dietas foram elaboradas na forma de pó, sendo os ingredientes secos pesados em balança marca Marte (modelo A500), peneirados (malha 20) e homogeneizados. As dietas foram preparadas em quantidade suficiente para atender toda a fase experimental sendo acondicionadas em recipientes de polipropileno, hermeticamente fechados e armazenadas a 5° C, para serem oferecidas aos animais gradualmente.

Tabela 2: Composição das dietas normoproteica e hipoproteica (g/Kg), utilizada durante 15 dias de tratamento dos grupos N e H.

Ingredientes	Dieta Normoproteica	Dieta Hipoproteica
	(17% proteína) (g/Kg)	(6% proteína) (g/Kg)
Caseína (84% proteína)*	202,0	71,5
Amido de milho	397,0	480,0
Amido de milho dextrinizado §	130,5	159,0
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de minerais (AIN-93G)**	35,0	35,0
Mistura de vitaminas (AIN-93G)**	10,0	10,0
L-cistina	3,0	1,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5

\* Valores corrigidos em função do conteúdo de proteína desejada.

\*\* Composição detalhada dada por Reeves, Nielsen & Fahey (1993)<sup>109</sup>.

§ Fornecidos por Corn Products of Brazil.

A reprodutibilidade do modelo experimental caracterizado anteriormente por França (2008)<sup>06</sup>, foi acompanhada através do monitoramento da evolução do peso

corporal e do consumo de dieta e água ingerida durante 15 dias de tratamento em todos os experimentos. Para cada um dos parâmetros avaliados foram utilizados grupo específico de animais.

#### **4.2 Histologia do TABR**

Após laparotomia mediana o TABR foi removido, pesado, fragmentado e fixado por imersão em uma solução 10 % de formaldeído (PBS).

A avaliação histológica foi realizada segundo método descrito por Prophet et al (1992)<sup>110</sup>, por análise microscópica. Inicialmente, o tecido foi fixado em parafina, cortado em porções de 6  $\mu\text{m}$  e montados em lâmina de vidro. Todas as porções foram coradas com a solução de hematoxilina-eosina. A área dos adipócitos foi medida por planimetria e os dados apresentado como média de 20 campos microscópicos sucessivos, utilizando-se o software UTHSCSA Image Tool 3.0, em aumento de 20 vezes.

A definição do número de intervalo de classes foi obtida a partir da aplicação da regra de Sturges<sup>111</sup>. Em seguida, foi calculada a amplitude de cada classe e construída a tabela de freqüências. Foram classificados como pequenos os adipócitos com área  $\leq 2930 \mu\text{m}^2$ , médios aqueles com área entre  $2930-7550 \mu\text{m}^2$  e grandes os que apresentaram área  $>7550 \mu\text{m}^2$ . As freqüências relativas correspondente a cada classe foram apresentadas em gráfico de histograma.

#### **4.3 Dosagem ácidos graxos séricos**

Após jejum de 14 h, os animais foram previamente anestesiados e eutanasiados por decapitação para coleta do sangue. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria à 37°C por 1 h e imediatamente centrifugadas a

700 rpm/15min. O soro obtido foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem dos ácidos graxos utilizando Kit comercialmente disponível da Wako (NEFA C). A concentração de AGLs foi determinada por extrapolação da reta da curva de calibração traçada com padrão de ácido oléico e os resultados expressos como mEq/L.

#### **4.4 Avaliação da atividade lipolítica**

##### **4.4.1 Isolamento e contagem de adipócitos.**

Os adipócitos do TABR foram isolados de acordo com o método de Rodbell (1964)<sup>112</sup>. Os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e, em seguida, o TABR de vários animais, do mesmo grupo experimental, foi removido até a obtenção de aproximadamente 5g de tecido. Após a fragmentação do tecido, os adipócitos foram isolados com colagenase (Worthing 128 U/mg), em tampão Krebs-Henseleit livre de cálcio, contendo 137 mM de NaCl; 4,2 mM de  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,4 mM de  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 mM de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5,4 mM de KCl, acrescido de 1% de albumina bovina livre de ácido graxo, 27 mM de Hepes e 5,0 mM de glicose, pH 7,4. A colagenase foi adicionada na proporção de 1,5 mg para 1,5 mL de tampão para cada 1g de tecido. Após incubação de 40 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante ( $60 \text{ ciclos min}^{-1}$ ), os adipócitos foram filtrados em meia de “nylon” (mesh 400  $\mu\text{m}$ ) e em seguida lavados 3 vezes com 10 mL do tampão Krebs-Henseleit-Hepes para remoção da colagenase e da fração de estromas vasculares. Posteriormente as células foram empacotadas por centrifugação por 3 minutos a baixa rotação.

O número de adipócitos foi determinado por contagem em câmaras de Neubauer, em microscópio usando objetiva 10x.

#### **4.4.2 Lipólise *in vitro*.**

A atividade lipolítica, na presença e na ausência de noradrenalina ( $10^{-7}$  M), foi avaliada utilizando uma suspensão contendo  $10^6$  adipócitos, incubados em tubos contendo 1 mL do tampão Krebs-Henseleit acrescido de 1% de albumina bovina livre de ácido graxo, 27 mM de HEPES e 5,0 mM de glicose, pH 7,4, com agitação orbital constante ( $40 \text{ ciclos min}^{-1}$ ), a  $37^\circ\text{C}$  e aeração prévia (95 % de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ), em um volume final ajustado para 2 mL.

Após 60 minutos, a reação foi interrompida colocando-se os tubos de incubação no gelo. O infranadante foi cuidadosamente removido com auxílio de seringa e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ , para determinação posterior do conteúdo de glicerol no meio de incubação, (liberado pelas células), que foi utilizado como índice da taxa lipolítica. A dosagem do glicerol foi realizada por método enzimático utilizando Kit da Labtest para dosagem de triglicerídeos. A concentração de glicerol das amostras foi determinada por extrapolação da reta da curva de calibração, traçada com concentrações crescentes de glicerol e expresso como  $\mu\text{moles de glicerol}/10^6 \text{ células.h}$ .

Cada ensaio foi realizado em sextuplicata, utilizando pool de adipócitos de ratos N ou H.

#### **4.5 Avaliação das vias de geração de glicerol-3-fosfato**

Os materiais radioativos utilizados nos ensaios descritos, abaixo, foram provenientes da Amersham Biosciences. Os experimentos foram realizados no



período da manhã entre as 8 e 10 horas. Todos os ratos utilizados encontravam-se no estado alimentado.

#### **4.5.1 Medida da atividade da gliceroquinase**

Para a medida da atividade da gliceroquinase, 1g do TABR foi homogeneizado em 2 mL de tampão KCl 1% e EDTA 1mM. Os homogenados obtidos foram centrifugados a 5000rpm por 10 minutos à 4 °C. A atividade da enzima foi determinada no sobrenadante, segundo o método descrito por Newsholme et al (1967)<sup>113</sup> com algumas modificações. O meio de reação (100µL/tubo) foram pré-incubados separadamente, à 37 °C durante 5 minutos. A mistura de reação continha Tris 100 mM (pH 7,5); ATP 6 mM; MgCl<sub>2</sub> 4 mM; EDTA 1 mM; NaF 25 mM; 2-β-mercaptoetanol 20 mM; U-<sup>14</sup>C glicerol (10 µCi/mL); glicerol 1 mM; fosfocreatina 10 mM; creatina quinase (26,4 U/mL) e albumina 1%. Aos tubos de reação pré-incubados, contendo 100 µL da mistura, foram adicionados 20 µL de amostra. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de etanol 98%. Em cada ensaio corriam-se dois brancos, nos quais etanol 98% era colocado nos tubos de reação, antes do homogenado, para inativação da enzima. A separação do glicerol-<sup>14</sup>C do glicerol-3-fosfato-<sup>14</sup>C foi feita através de cromatografia ascendente aplicando-se 20 µL, da amostra em papel Whatman nº1, utilizando como solvente etanol:NH<sub>3</sub> (Hidróxido de amônio):H<sub>2</sub>O (80:4:16). Neste sistema, o glicerol não fosforilado move-se à frente do solvente e o glicerol-3-fosfato permanece entre a origem e 5 cm em direção ascendente quando o solvente se encontra à aproximadamente 30 cm da origem (cerca de 12 horas de corrida). Após secagem do papel, ele foi cortado em tiras de 5 cm a partir do ponto onde a amostra foi aplicada (correspondendo ao glicerol fosforilado). As tiras de papel foram colocadas

em líquido de cintilação para contagem da radioatividade em contador Tri Carb 2100 TR (Parckard). O conteúdo de proteína total do homogenado foi determinado pelo método de Lowry et al (1951)<sup>114</sup>.

#### **4.5.2 Determinação do conteúdo protéico da PEPCK**

Após ser removido e lavado com salina, 1 g do TABR foi transferido para tubo de plástico e homogeneizado com 2 mL de tampão RIPA, contendo 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 10 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de NaF, 5 µg/mL de aprotinina, 1% de triton X-100 e 0,1% de SDS com pH ajustado para 7,4.

Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 50 minutos à 4 °C. Foram transferidos 400 µl do infranadante para Eppendorfs e adicionados a cada um deles, 100 µl de tampão de Laemmli (0,1% de azul de bromofenol, 1 M de fosfato de sódio pH 7,0, 50% de glicerol, 10% de SDS) contendo 0,015 g de DTT. O conteúdo total de proteínas do homogenado, sem tampão Laemmli, foi determinado pelo método de Bradford (1976)<sup>115</sup>.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio duodecil sulfato (SDS) foi realizada de acordo com método descrito por Laemmli (1970)<sup>116</sup>. Após o aquecimento das amostras a 100 °C por 5 minutos, 100 µg de proteínas foram aplicadas em sistema de mini-gel (modelo mini protean III cell – Bio Rad®) de acrilamida-bisacrilamida (40:1) com 1,5 mm de espessura, gel de separação 10% e empilhamento de 4%. Foram utilizados os padrões de peso molecular da Bio-Rad® (Kaleidoscop Prestained Standards: 6,6-201 kDa).

As corridas eletroforeticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão Trisma base 200 mM pH 8,3, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM, SDS 0,4% sob

30 V até a passagem das proteínas pelo gel de empilhamento e, posteriormente, sob 60 e 120 V, no gel de separação. A corrida foi interrompida quando faltava cerca de 3 mm para as bandas do corante deixarem o gel. Findada a eletroforese, o gel foi retirado das placas de vidro e preparado para a transferência de acordo com o método descrito por Towbin et al (1979)<sup>117</sup>. Inicialmente o gel foi colocado na solução de transferência (Trisma base 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20% e SDS 0,02%), juntamente com as esponjas, os papéis 3 mm de prensagem e a membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF; Amersham Hybond-P Biosciences UK England HP7 9NA), previamente tratada com a solução de transferência por 10 segundos. As proteínas presentes no gel foram transferidas (direção pólo negativo para o pólo positivo) para a membrana de PVDF em um sistema de acrílico montado na seguinte seqüência: esponja, 1 folha de papel 3mm, gel, membrana de PVDF, 1 folha de papel e esponja. A transferência ocorreu sob voltagem de 120 V, durante 2 horas à temperatura ambiente. Para a manutenção da temperatura, o resfriamento do tampão foi feito com gelo, sendo renovado a cada 30 minutos. Após o término da transferência, a membrana de PVDF foi corada por 5 minutos, com Ponceau S diluído 1X para visualização das bandas. Posteriormente, a membrana foi fotografada, descorada com solução basal (Trisma base 10 mM pH 8,3; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%) e incubada por 2 horas à temperatura ambiente com solução bloqueadora (leite desnatado molico 5% diluído em 10 mL da solução basal). Terminado o bloqueio, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes durante 5 minutos com solução basal e incubada *overnight*, em geladeira, com o anticorpo primário: PEPCK (H-300 policlonal):sc-32879 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA) na diluição de 1:3000. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido e a membrana lavada 3 vezes, durante 5 minutos, com solução basal para remoção do excesso de

anticorpo primário. A membrana foi então, incubada por 2 h com o anticorpo secundário (cabra anti -IgG de coelho) conjugado à peroxidase (Zymed), na diluição 1:5000 à temperatura ambiente, e novamente lavado 3 vezes, durante 5 minutos, com solução basal. Em seguida, a membrana foi incubada por 5 minutos com a mistura de reagente (1:1) do kit quimiluminescência amplificada (ECL, Amersham Biosciences UK England HP7 9NA), após o qual, o excesso de reagente foi removido. A revelação foi realizada em filme autorradiográfico RX (Kodak XAR-Rochester) na ausência de luz, durante 3 minutos.

A análise densitométrica foi realizada utilizando o programa Scion Image e os resultados expressos em unidades arbitrárias. O termo unidade arbitrária refere-se, portanto, ao valor densitométrico da banda referente à PEPCK na membrana.

#### **4.5.3 Incorporação de U-<sup>14</sup>C- glicose em glicerol de TAG**

Para medida da incorporação basal de U-<sup>14</sup>C- glicose na fração GLI-TAG, suspensão contendo 10<sup>6</sup> adipócitos, foram incubados em tubos contendo o tampão Krebs-Henseleit acrescido de 0,5 µCi de U-<sup>14</sup>C-glicose e 5,0 mM de glicose, por 1 hora com agitação orbital contínua e aeração prévia (95 % de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). A incorporação estimulada pela insulina (1mU/mL) foi estudada utilizando a mesma quantidade de adipócitos e reagentes descritos anteriormente. Cada ensaio foi realizado, em sextuplicata, utilizando adipócitos de ratos N e H.

Ao final do período de incubação, a reação foi interrompida colocando-se os frascos de reação no gelo. As células adiposas foram lavadas com salina e destinadas para a extração de lipídeos como descrito a seguir.

#### **4.5.4. Extração dos lipídeos totais e isolamento dos ácidos graxos e fração GLI-TAG.**

Para extração dos lipídeos totais foi utilizado o método de Folch et al (1957)<sup>118</sup>, onde os adipócitos isolados, após lavagem, foram homogeneizados em 10 mL de clorofórmio:metanol (proporção de 2:1). As amostras foram deixadas em repouso *overnight* e no dia seguinte centrifugadas à baixa rotação, por alguns minutos, para separação das fases. A fase aquosa superior foi aspirada e a fase clorofórmica inferior lavada 3 vezes com 3 mL da mistura da fase superior preparada com clorofórmio, metanol e mistura salina na proporção 21,1:337:330 (mL). A mistura salina era composta de 0,528 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,732 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5,8 g de NaCl e 940 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Após a lavagem, 2,5 mL do extrato clorofórmico, contendo os lipídeos totais foi evaporado, ressuspenso em coquetel de cintilação e destinado para contagem em aparelho de cintilação líquida. Para isolamento dos ácidos graxos-TAG uma alíquota de 4 mL do extrato clorofórmico foi evaporado e os lipídeos saponificados com 2 mL de KOH etanólico (1 mL de KOH saturado 14,5 M para 20 mL de etanol). Os tubos foram fechados com tampas de vidro e submetidos a aquecimento em banho-maria à temperatura constante de 70-80 °C por duas horas. Posteriormente, a temperatura do banho foi reduzida para 50 °C e as amostras acrescidas de 4 mL de água milli-Q e mantidas à mesma temperatura até evaporação de todo o álcool. O material saponificado foi então lavado 3 vezes com 8 mL de éter de petróleo, para a remoção dos lipídeos não-saponificáveis. Em seguida, o material foi acidificado com  $\text{HClO}_4$  6% e os ácidos graxos extraídos com éter de petróleo. Todo o material etéreo foi evaporado e o resíduo dissolvido em 10 mL do coquetel de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem dos AG-

TAG. A radioatividade incorporada era medida em cintilador Tri Carb 2100 TR (Packard).

A incorporação do GLI-TAG foi determinada pela diferença entre a incorporação do radioisótopo nos lipídeos totais (extrato clorofórmico) e na fração AG-TAG.

#### **4.6 Determinação do conteúdo protéico de intermediários da via de sinalização de insulina.**

O conteúdo de proteínas da via de sinalização da insulina (IR<sub>β</sub>, IRS-1, AKT1 e PI3-kinase: p<sub>85α</sub>) foi avaliado utilizando o mesmo procedimento empregado para determinação da PEPCK, exceto para a concentração de proteína aplicada no gel (125 µg) e diluições dos anticorpos primários: IR<sub>β</sub> (H-70, policlonal):sc-20739; IRS-1 (C-20, policlonal):sc-559; AKt1 (G-5, monoclonal):sc-55523 e PI3-Kinase P<sub>85α</sub> (B-9, monoclonal):sc-1637 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA), que foram 1:500.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), junto com o valor da probabilidade absoluta (P) quando apropriado. Em todos os testes, adotou-se um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Statistic for Windows*, versão 4.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A comparação das médias dos grupos foi realizada pelo teste “*t de Student*” nos seguintes experimentos: distribuição relativa por classe do tamanho e número de adipócitos, na determinação da expressão total das proteínas da via de sinalização da insulina e da enzima PEPCK, na atividade da GK e na determinação

de ácidos graxos livres séricos. Para análise do efeito da dieta sobre a atividade lipolítica, *in vitro*, e incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol-TAG, foi utilizada análise da variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e estímulo). Todas as análises foram realizadas após confirmação de que os dados apresentavam distribuição normal.

## **5. RESULTADOS**

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Morfologia do TABR e número de adipócitos.

Para avaliar a natureza hipertrófica e/ou hiperplásica do aumento do TABR pela dieta hipoproteica, foram contados o número de adipócitos presentes em 4 campos da câmara de Neubauer, de uma suspensão de células isoladas, diluída 5 vezes. A média das contagens foi multiplicada por  $10^4$  e, em seguida, por 5 para corrigir a diluição. Os valores apresentados foram expressos em nº de células/mL.

Na figura 03, podemos observar que houve um aumento significativo de 26% no número de adipócitos no TABR de animais H ( $1,31 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^4$ ) em comparação com os animais N ( $1,04 \times 10^6 \pm 5,0 \times 10^4$ ).

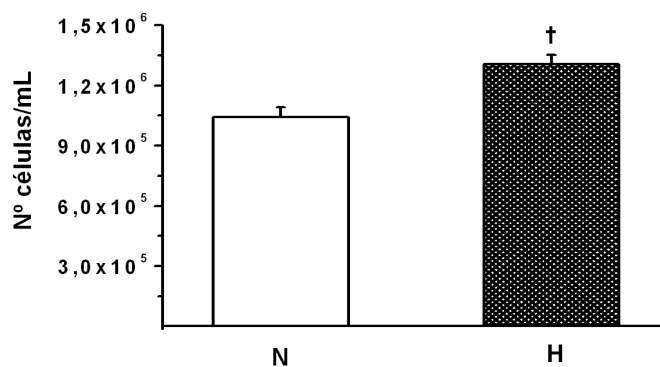


Figura 03: Número de adipócitos (nº células/mL) do TABR de ratos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média e o erro padrão de um pool de adipócitos de 7 animais. †Diferença estatística em relação ao grupo N (*t-Student*;  $p < 0,001$ ).

A frequência relativa dos adipócitos por área (tamanho) foi determinada com o intuito de confirmar ou não, a natureza hiperplásica do aumento do TABR, uma vez que o aumento na frequência de adipócitos de pequeno tamanho configura uma

situação de proliferação celular<sup>89</sup>. Na figura 04 podemos observar que os animais submetidos à restrição protéica apresentaram freqüência de adipócitos de área pequena (<2930  $\mu\text{m}^2$ ), cerca de 170% maior do que o grupo N. Por outro lado, o grupo H exibiu uma menor freqüência relativa de adipócitos classificados como grandes (5240-7550  $\mu\text{m}^2$ ). A freqüência relativa dos adipócitos médios não foi alterada. Estes resultados confirmam um processo inicial de hiperplasia nos animais H.

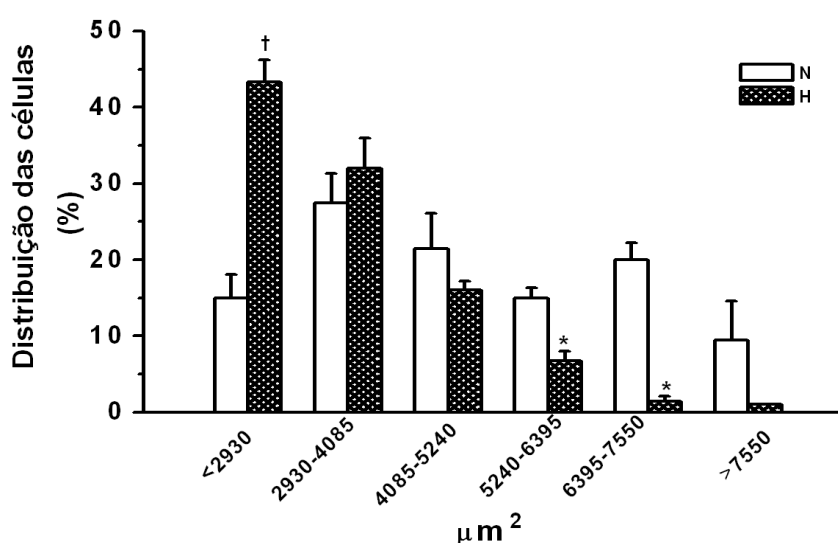


Figura 04: Distribuição relativa de adipócitos do TABR por área, provenientes de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias tratamento. Os valores representam a média e o erro padrão de 5 animais. Diferença estatística em relação ao grupo N (*t-Student*; <sup>†</sup> $p < 0,001$ ; \* $p < 0,01$ ).

Os cortes histológicos da área seccional do TABR de animal do grupo N e H (Fig. 05) reforçam os dados obtidos anteriormente, uma vez que podemos constatar uma predominância de células de tamanho pequeno na histologia dos animais H.

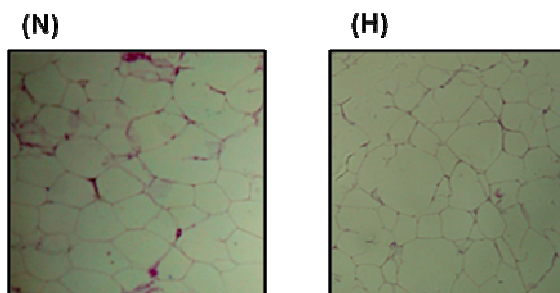


Figura 05: Corte histológico seccional do TABR (20x), de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento.

## 5.2 Avaliação da lipólise

### 5.2.1 Lipólise *in vitro*

Com o objetivo de avaliar o efeito da dieta sobre a lipólise basal, a quantidade de glicerol liberado no meio de incubação por adipócitos isolados foi usada como parâmetro da atividade lipolítica, uma vez que este tecido apresenta baixa atividade da gliceroquinase<sup>21,24</sup>. Ainda neste experimento, a sensibilidade dos adipócitos à agentes lipolíticos foi avaliada pela incubação dos adipócitos com noradrenalina na concentração de  $10^{-7}$  M. A escolha deste indutor lipolítico foi baseada na premissa de que a lipólise induzida por catecolaminas em roedores é predominantemente mediada via receptor  $\beta_3$ -adrenérgico<sup>30</sup>. A partir da análise de vários dados da curva dose-efeito (noradrenalina x lipólise) disponível na literatura, foi escolhida a concentração de  $10^{-7}$  M, de noradrenalina, uma vez que esta dose tem se mostrado suficiente para a percepção das variações na resposta dos adipócitos ao estímulo. A lipólise basal foi definida como a concentração de glicerol liberado na ausência de noradrenalina.

Os adipócitos de animais tratados com dieta hipoproteica apresentaram uma liberação basal de glicerol 51% menor do que os adipócitos provenientes de ratos

controles (Tabela 02). O estímulo com  $10^{-7}$ M de noradrenalina aumentou em torno de 27% a liberação de glicerol nos adipócitos de animais N, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os valores de glicerol liberado com e sem estimulação. Os adipócitos de animais H apresentaram resposta à noradrenalina, semelhante aos adipócitos dos animais N (Figura 06).

Concluimos com isto, que a dieta H reduziu a lipólise basal, mas não alterou a sensibilidade dos adipócitos ao estímulo lipolítico da noradrenalina quando comparado ao adipócitos de animais N.

Tabela 02: Glicerol liberado ( $\mu\text{mol} \cdot 10^6 \cdot \text{células}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), no meio de incubação por adipócitos isolados do TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento, sem (basal) e com noradrenalina ( $10^{-7}$  M).

Parâmetros	Basal		Estimulada	
	Grupos			
	N (7)	H (7)	N (7)	H (7)
Glicerol ( $\mu\text{mol}/10^6 \text{ células.h}$ )	$0,35 \pm 0,03^a$	$0,17 \pm 0,02^b$	$0,44 \pm 0,04^a$	$0,22 \pm 0,01^b$

Valores representam a média  $\pm$  EMP do número de ensaios, entre parênteses, realizados com um pool de adipócitos de 7 animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2 vias;  $p < 0,05$ ).

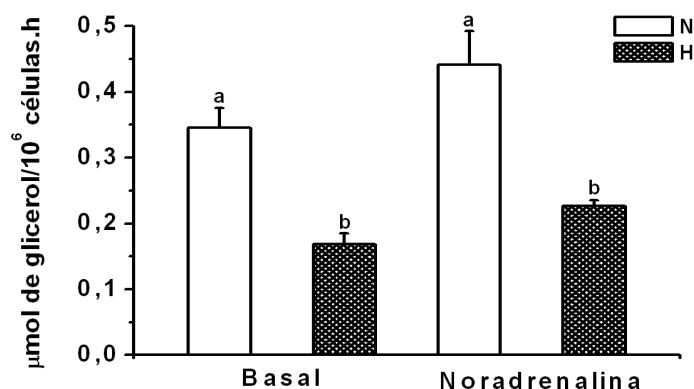


Figura 06: Liberação de glicerol ( $\mu\text{mol} \cdot 10^6 \cdot \text{células}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), no meio de incubação por adipócitos isolados do TABR de ratos N e H, ao final de 15 dias de tratamento, incubados sem (basal) e com noradrenalina ( $10^{-7}\text{M}$ ). Valores representam a média  $\pm$  EMP de 6 ensaios realizados com um pool de adipócitos de 7 animais. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA 2 vias;  $p < 0,05$ ).

### 5.3 Determinação de AG séricos

Os AGLs desempenham um importante papel na homeostase do organismo. Nos períodos de balanço energético negativo, como no jejum e no diabetes, os AGLs na circulação sanguínea se elevam, derivados do aumento da lipólise dos TAGs depositados no TAB<sup>17</sup>, com o objetivo de atender a demanda energética dos tecidos periféricos. A quantidade de AGs liberados a partir do TAB é resultado de dois processos que ocorrem simultaneamente nos adipócitos: lipólise e reesterificação, sendo que os níveis séricos de AGs liberados é reequilíbrio existente entre essas duas vias. Nos nossos experimentos, não houve diferença na concentração de ácidos graxos séricos entre os animais N e H (Tabela 03).

Tabela 03: Concentração sérica (mEq/L) de AGLs de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento.

Parâmetros	Grupos	
	N (5)	H (5)
AGLs (mEq/L )	0,74± 0,08	0,61±0,05

Valores representam a média ± EMP do número de animais entre parênteses.

#### 5.4 Vias de geração de glicerol-3-fosfato

As vias de geração de glicerol 3 fosfato foram avaliadas pela medida da atividade da gliceroquinase, pelo conteúdo protéico da PEPCK e pela medida da incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em GLI-TAG em adipócitos isolados.

##### 5.4.1 Atividade da gliceroquinase

A atividade da gliceroquinase foi utilizada para avaliar a formação de G3P por fosforilação direta do glicerol proveniente da hidrólise dos TAGs endógenos. Houve um aumento significativo de aproximadamente 60% a atividade desta enzima no grupo H em relação ao grupo N, ao final de 15 dias de tratamento com as dietas (Tabela 04 e Figura 07).

Tabela 04: Atividade da gliceroquinase no TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H, após 15 dias de tratamento.

Parâmetros	Grupos	
	N (5)	H (5)
Atividade da gliceroquinase (nmol. mg proteína <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	7,54 ± 1,25	12,10 ± 1,20*

Valores representam a média ± EMP do número de animais entre parênteses.

Diferenças estatísticas em relação aos controles (\*p<0,05).

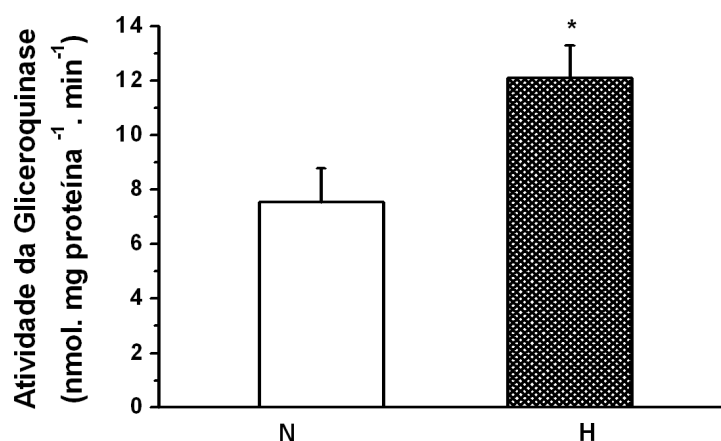


Figura 07: Atividade da gliceroquinase, no TABR, de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média e o erro padrão de 5 animais. \* Diferença estatística em relação ao grupo N (*t-Student*, p<0,05).

#### 5.4.2 Conteúdo protéico da PEPCK

O conteúdo da PEPCK foi utilizado para avaliar a formação de G3P pela via da gliceroneogênese. O grupo H apresentou redução de 27% na PEPCK quando comparada com os animais do grupo N (Figura 08).

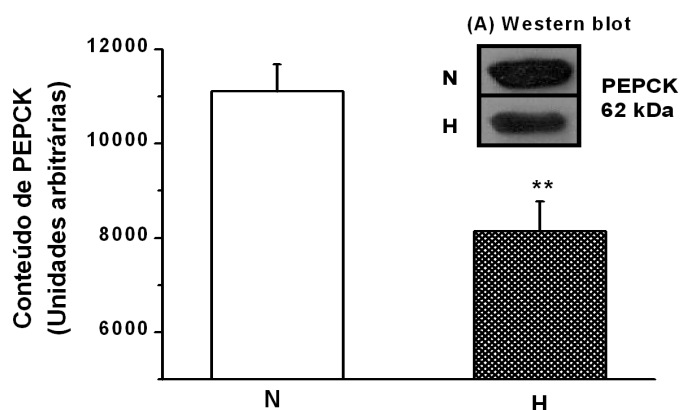


Figura 08: Efeito da dieta N e H sobre o conteúdo da PEPCK no TABR ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais. \*\*Diferença estatística em relação ao grupo N (*t-Student*;  $p < 0,01$ ). (A) Western blot representativo da PEPCK no TABR. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente a PEPCK na membrana.

#### 5.4.3 Incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em glicerol

A formação de G3P a partir de glicose foi avaliada pela incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em GLI-TAG, em adipócitos isolados, do TABR de animais do Grupo H e N. A incorporação foi avaliada em 2 situações: sem estímulo e com estímulo da insulina (1mU/mL). Pelos dados apresentados na Tabela 05, podemos constatar que não houve diferença na incorporação basal da glicose em GLI-TAG entre os animais H e N. A presença da insulina no meio de incubação dos adipócitos de animais N aumentou em 124% a incorporação; no entanto, a insulina não estimulou a incorporação de glicose nos adipócitos H (Figura 09).



Tabela 05: Incorporação basal e estimulada (1 mU/mL de insulina), de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol-TAG (nmol/10<sup>6</sup> células.h), por adipócitos isolados do TABR de ratos machos tratados com dieta N ou H, ao final de 15 dias de tratamento.

Parâmetros	Basal		Estimulada	
	Grupos			
	N (6)	H (6)	N (6)	H (6)
Incorporação de glicose (nmol/10 <sup>6</sup> células.h)	3,4±0,5 <sup>b</sup>	2,8±0,5 <sup>b</sup>	7,6±1,2 <sup>a</sup>	2,1±0,9 <sup>b</sup>

Valores representam a média ± EMP do número de ensaios, entre parênteses, realizados com um pool de adipócitos de 6 animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2 vias; p<0,05).

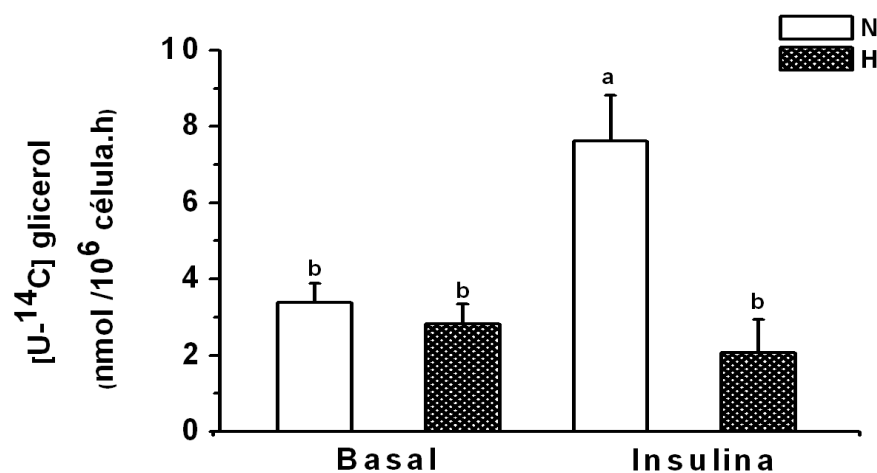


Figura 09: Efeito da dieta N e H na incorporação basal e estimulada, de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol-TAG (nmol/10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>.h), por adipócitos isolados do TABR de ratos machos ao final de 15 dias de tratamento. Valores representam a média ± EMP de 6 ensaios, realizados com um pool de adipócitos de 6 animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2 vias; p<0,05).

### 5.5 Determinação do conteúdo protéico de intermediários da via de sinalização da insulina.

Tendo a insulina importante papel no metabolismo de lipídeos, quer estimulando a lipogênese como inibindo a lipólise, analisamos o conteúdo total das proteínas da via de sinalização da insulina:  $IR_{\beta}$ , IRS-1, PI3-K( $p85_{\alpha}$ ) e AKT1 no TABR, após 15 dias de tratamento com a dieta.

Não houve diferença significativa no conteúdo protéico do receptor de insulina ( $IR_{\beta}$ ) e da subunidade regulatória da proteína PI3-K ( $p85_{\alpha}$ ) entre os grupos H e N (Figuras 10 e 12). Entretanto, o conteúdo do IRS-1 e da AKT1 foram 40% e 14% respectivamente, menores, nos animais do grupo que recebeu dieta com restrição protéica (Figuras 11 e 13).

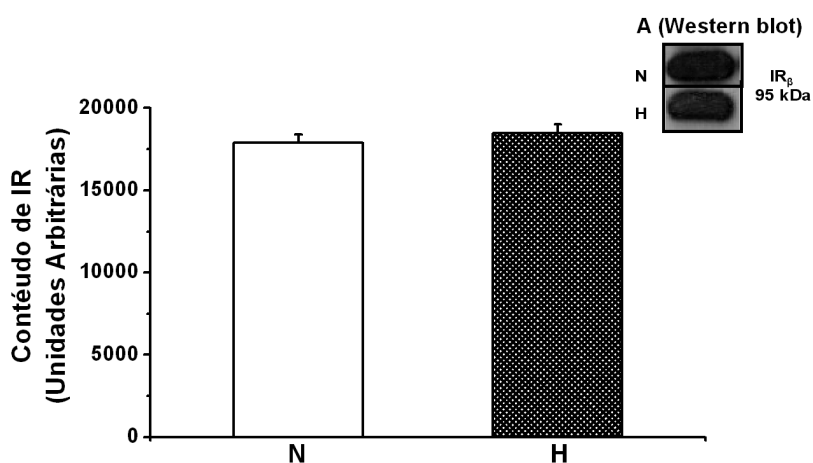


Figura 10: Efeito da dieta N ou H no conteúdo da proteína  $IR_{\beta}$  do TABR de ratos machos, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais. (A) Western blot representativo do  $IR_{\beta}$  no TABR. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente ao  $IR_{\beta}$  na membrana.

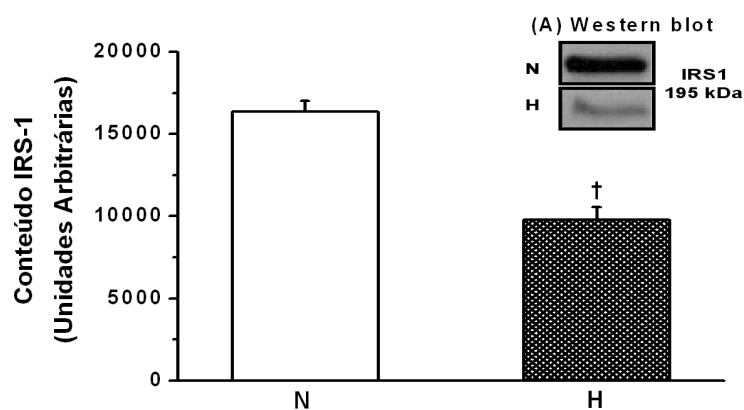


Figura 11: Efeito da dieta N e H no conteúdo da proteína IRS-1 do TABR de ratos machos, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais. <sup>†</sup>Diferença estatística em relação ao grupo N (*t-Student*;  $p < 0,001$ ). (A) Western blot representativo do IRS-1 no TABR. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente ao IRS-1 na membrana.

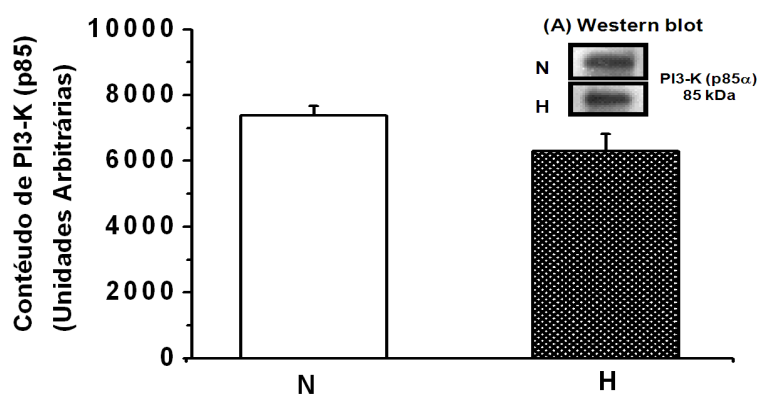


Figura 12: Efeito da dieta N e H no conteúdo da proteína PI3-K ( $p85\alpha$ ) do TABR de ratos machos, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais. (A) Western blot representativo da PI3-K ( $p85\alpha$ ) no TABR. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente ao PI3-K ( $p85\alpha$ ) na membrana.

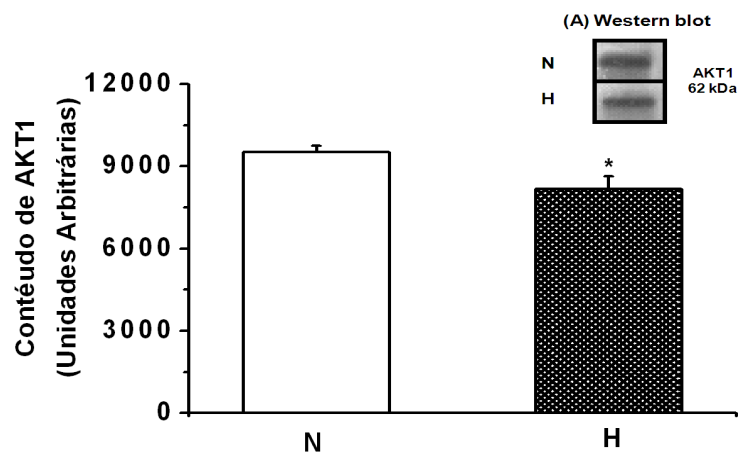


Figura 13: Efeito da dieta N ou H no conteúdo da proteína AKT1 do TABR de ratos machos, ao final de 15 dias de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais. \*Diferenças estatísticas em relação aos controles (*t-Student*; \* $p < 0,05$ ). (A) Western blot representativo da AKT1 no TABR. O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda referente a AKT na membrana.

## **6. DISCUSSÃO**

---

## 6. DISCUSSÃO

Nosso Laboratório tem se dedicado nos últimos anos, ao estudo das alterações metabólicas induzidas por uma dieta restrita em proteínas em ratos machos na fase de crescimento. Observações iniciais mostraram que ao final de 15 dias de administração da dieta H, eles apresentavam profundas alterações na composição química corporal, quando comparado aos animais que receberam dieta N na mesma fase de desenvolvimento.

O aumento do ganho energético com concomitante perda de peso observado nos animais H, só foi possível pelo acúmulo de lipídeos (carcaça, nos tecidos adiposos brancos, TAM e fígado) e redução das proteínas corporais (carcaça, TAM, músculos e fígado)<sup>06</sup>. Ao final de 15 dias de dieta H, os animais apresentaram adiposidade, mas não obesidade, tendo em vista que o aumento de lipídeos ocorreu com redução do peso corporal. No entanto, o TABR destes animais, objeto de nosso estudo, teve um aumento de 30% no peso em comparação aos animais submetidos à dieta N.

A partir destas observações iniciais, o nosso primeiro ponto de investigação foi quanto à contribuição da proliferação celular no aumento deste depósito. Este fato é de extrema relevância, pois pode determinar a natureza dos processos adaptativos que podem evoluir, ou não, para a obesidade. A contagem de células e a análise histológica do TABR apresentado às Figs 3-5, mostram um processo de hiper celularidade nesta etapa inicial de adaptação, sinalizando para um futuro quadro de obesidade na fase adulta. Esta constatação vai de encontro à premissa de que nos estágios iniciais de crescimento, a adiposidade é decorrente

principalmente de hiperplasia; enquanto na vida adulta, a capacidade dos pré-adipócitos se tornarem adipócitos, declina<sup>119</sup>.

O SNS é um importante sistema no controle dos aspectos metabólicos, morfológicos e funcionais do TAB. Os animais H, conforme observado anteriormente por Funabashi et al (2008)<sup>08</sup>, apresentaram um aumento da estimulação simpática no TABR, avaliado pela determinação do turnover de noradrenalina. Dados da literatura mostram, no entanto, uma relação inversa entre a estimulação simpática e a proliferação celular. Bowers et al (2004)<sup>120</sup> através de desnervação unilateral do TABR (com redução em 65% do teor de noradrenalina) constataram um aumento de 34% no peso e de 42% no número de células, em todas as faixas de tamanho (41% no número de células de 25 a 50 $\mu\text{m}^2$ , 39% em células de 50 a 75  $\mu\text{m}^2$  e 55% no número de células de 75-100 $\mu\text{m}^2$  de diâmetro) em relação ao lado contralateral (inervado), sugerindo uma relação inversa do SNS com a hiperplasia dos adipócitos. Estudos mostram ainda, que a inibição da proliferação de pré-adipócitos, *in vitro*, promovido pela noradrenalina é revertida com propanolol, um antagonista  $\beta_3$ -adrenérgico<sup>121</sup>. Estes achados vêm de encontro às observações de Cantu & Goodman (1967)<sup>122</sup> e Cousin et al (1993)<sup>123</sup>, que constataram aumento de DNA e proliferação celular em TABR desnervados.

Todas estas evidências bem estabelecidas na literatura deixam clara a relação inversa, entre a hipertrofia/hiperplasia e atividade simpática. Desta forma, a proliferação celular observada nos animais H não pode ser atribuída ao SNS no TABR, uma vez que os animais H apresentam aumento da atividade simpática neste tecido<sup>08</sup>.

Além do SNS, outro fator importante relacionado com a proliferação celular é o receptor nuclear PPAR $\gamma$  expresso principalmente no Tecido Adiposo e considerado

o principal regulador da proliferação<sup>76</sup>. Ativadores e ligantes de PPAR $\gamma$  convertem pré-adipócitos, mioblastos e linhagens celulares pluripotentes em fenótipo adiposo, podendo desencadear isoladamente o processo de acúmulo de gordura, embora a manifestação de outras características destas células, como por exemplo o transporte de glicose, necessitam de outros fatores de transcrição do grupo C/EBP $\alpha$ <sup>124</sup>. Segundo Gregoire et al (1998)<sup>84</sup>, os glicocorticóides, cujos níveis séricos nos animais H se encontram em torno de 100% mais elevados em relação aos animais do grupo N<sup>08</sup>, promovem a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos em modelos de cultura de células primárias. Farmer (2006)<sup>76</sup> constatou que os glicocorticóides aumentam também a proliferação de adipócitos por ativarem fatores de transcrição que convergem em aumento de PPAR $\gamma$  por indução da expressão de C/EBP $\alpha$ <sup>125</sup>. Os PPAR $\gamma$  são também importantes na lipogênese<sup>126</sup>, visto que, entre os genes que estão sobre controle transcricional do PPAR $\gamma$  no Tecido adiposo, incluem os genes da LPL, Acil-CoA ácido graxo sintase, ácido graxo translocase e proteína transportadora de AG, sugerindo que o mesmo possa ter papel importante na captação de ácidos graxos nos adipócitos<sup>127</sup>. Outro dado relevante (além dos elevados níveis de GC) observado neste trabalho, e que poderia sugerir a hipótese da participação do PPAR $\gamma$  nas adaptações à dieta H, é a reduzida expressão de IRS1 e AKT1 constatada no TABR destes animais em nossos experimentos, onde foram avaliadas a expressão de proteínas intermediárias da vias de sinalização da insulina. Araujo et al (2005)<sup>128</sup>, utilizando um oligonucleotídeo *antisense* (IRS-1AS), inibidor de IRS1, constataram redução de 85% da fosforilação de AKT no Tecido adiposo e Fígado e de 45% de inibição no músculo. A inibição da AKT levou a uma redução da fosforilação de ERK no fígado (20%) e músculo (30%), e um aumento de 50% na fosforilação de ERK no T. Adiposo com aumento da expressão de PPAR $\gamma$ .



A redução na expressão de IRS1 observada nos animais H, por outro lado, poderia ser uma consequência dos elevados níveis de corticosterona sérica no grupo experimental H. Alguns trabalhos mostram uma reduzida expressão das proteínas da via de sinalização da insulina<sup>129,130</sup>, em quadro de resistência à insulina apresentado por animais com níveis elevados de GCs. Os mecanismos pelos quais os GC causam obesidade e resistência à insulina não são completamente esclarecidos, mas em linhagens de células 3T3L1 os glicocorticóides induzem resistência à insulina através da reduzida expressão da proteína IRS1<sup>131</sup>. Diferentemente dos adipócitos de animais N que aumentaram a incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em GLI-TAG em 124% na presença de insulina, os adipócitos provenientes dos animais H não se mostraram sensíveis à presença de insulina, corroborando o quadro de resistência à insulina nos adipócitos do TABR de animais H, sugerido pela menor expressão de IRS1 e AKT1.

Os glicocorticóides tem ainda importante papel na transcrição do gene da PEPCK; enquanto este hormônio promove a ativação da expressão da enzima no fígado, induz uma redução da expressão no T. Adiposo. Tal regulação está de acordo com o papel dos GCs no stress, onde existe necessidade de suprimento energético disponível no sangue. No fígado, o aumento da PEPCK leva a um aumento da glicose circulante. Ao contrário, no T. Adiposo, a inibição de PEPCK é que poderia contribuir para o aumento nos níveis de combustíveis no sangue (AG circulantes) pela redução do ciclo de reesterificação dos AG. Apesar dos GC aumentarem a transcrição de PPAR $\gamma$ , que estimula a expressão da PEPCK no T. Adiposo, a ativação do PPAR $\gamma$  pelos GC é mediada por membros da família C/EBP, que por sua vez, reprime o gene da PEPCK, o que explicaria a redução da PEPCK quando a ativação do PPAR $\gamma$  é consequência do aumento da ligação dos GC aos

seus receptores<sup>132</sup>. Glorian et al (1998)<sup>133</sup> afirmam que os GCs exercem um potente efeito inibitório sobre a transcrição gênica da PEPCK, ativada pelo PPAR $\gamma$  e por baixos níveis de insulina, nos adipócitos. Outro fato que poderia contribuir para o menor conteúdo da PEPCK no TABR de animais H é o fato já mencionado anteriormente<sup>80</sup>, de que a expressão da PEPCK só ocorre em adipócitos maduros. As células nos estágios iniciais liberam lactato no espaço intersticial que são captados pelos adipócitos maduros e utilizados como substratos para a síntese de G3P nestas células<sup>134</sup>. O fato do TABR dos animais H apresentarem grande número de células em estágios iniciais de diferenciação poderia colaborar com esta redução no conteúdo total da enzima.

Na avaliação das vias de geração de G3P partimos dos dados obtidos por Funabashi (2008)<sup>08</sup>, onde a geração de G3P proveniente do conjunto das vias da gliceroneogênese e glicose nos animais H não foi alterada. Entretanto, a metodologia utilizada pelo autor não permite avaliar se uma das vias foi ativada e a outra reduzida ou se as duas permaneceram inalteradas; como também não inclui o G3P gerado pela gliceroquinase. O fato dos nossos dados mostrarem uma redução de 27% na expressão da PEPCK (que poderíamos inferir como uma proporcional redução na gliceroneogênese), sem alteração na geração de G3P a partir da glicose, pode aparentemente ser contraditório ao achado de Funabashi (2008)<sup>08</sup> que não encontrou diferença estatística entre os dois grupos. No entanto, analisando os dados obtidos pelo autor, pudemos constatar uma diferença de 25% (a menor), do grupo H em relação à N, no conjunto da síntese de G3P pelas duas vias. Este fato, poderia ser decorrente do número insuficiente de animais nos grupos, tendo em vista, a grande variabilidade dos dados ou que a redução da gliceroneogênese não foi o suficiente para uma diferença estatística entre os grupos, tendo em vista, a

manutenção do glicerol sintetizado a partir da glicose. A geração de G3P a partir da glicose, avaliada através da incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol em adipócitos, não foi alterada pela dieta hipoproteica em condições basais, mas a resposta ao estímulo da insulina foi totalmente bloqueada nos adipócitos destes animais. Este fato pode ser decorrente do prejuízo na estimulação da captação da glicose, uma vez que a sinalização da insulina, como colocado anteriormente, parece estar comprometida pela redução de IRS1 que poderia reduzir a fosforilação de AKT1 com prejuízo na mobilização dos transportadores de glicose para a membrana plasmática<sup>128</sup>, impedindo a maior captação da glicose apesar da maior disponibilidade de glicose na dieta.

O aumento da atividade da GK em 60% nos animais H, constatado neste trabalho, é corroborado pela redução de 51% na liberação do glicerol pelos adipócitos de animais H, quando da avaliação da lipólise basal, em relação dos adipócitos provenientes dos animais N. O fato dos AG plasmáticos em animais H terem se mantido nos mesmos níveis dos animais N, indicam que não houve alteração na taxa lipolítica pela dieta com restrição protéica ou o aumento da taxa lipolítica é compensada pelo aumento da formação de G3P reesterificando mais AG. Os experimentos conduzidos até o momento não nos permite esta conclusão. Se analisarmos, no entanto, que dois importantes fatores lipolíticos estão presentes nos animais H (aumento da estimulação simpática e o aumento dos GC) e ausência do fator anti-lipolítico (resistência à insulina), poderíamos supor que a GK foi responsável pelo fornecimento de G3P que permitiu maior reesterificação de AG mesmo com a redução da gliceroneogênese (expressão da PEPCK).

Apesar da afirmação encontrada em muitos livros-textos que a perda da GK no TAB evita um ciclo fútil no metabolismo dos triglicerídeos, devemos lembrar que

os efeitos benéficos das tiazolidinedionas utilizados no tratamento do Diabetes tipo 2, se deve em parte por estimular a incorporação de glicerol em TAG e reduzir a secreção de AG pelos adipócitos, melhorando a resistência à insulina<sup>135</sup>. A literatura deixa claro, a baixa produção de G3P pela GK no TAB em condições normais. No entanto, como já mencionado na introdução, em vários modelos experimentais a atividade da GK é fundamental para a manifestação da obesidade, como é o caso dos camundongos ob/ob e dos ratos Zucker<sup>89</sup>. O aumento da atividade da GK associado ao aumento dos depósitos de TAG no TAB são relatados, também, por efeito de alterações nas dietas. Chaves et al (2006)<sup>107</sup>, constatou aumento de 100% na atividade da GK em ratos submetidos à dieta cafeteria, com concomitante redução no conteúdo da PECK e incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em GLI-TAG, mesmo com aumento da geração de G3P pela glicose. Estes resultados parecem sugerir que a atividade da GK possa tornar-se significativa em determinadas condições, podendo nestes casos, contribuir de maneira significativa para o aumento dos depósitos de gordura.

## **7. CONCLUSÃO**

---

## 7. CONCLUSÃO

A partir do conjunto de dados do nosso trabalho e as condições expostas na discussão, podemos concluir que:

- ❖ O aumento dos depósitos de lipídeos do TABR ocorre por hipertrofia e hiperplasia;
- ❖ Houve uma redução da expressão da PEPCK provavelmente com redução de G3P a partir da gliceroneogênese que parece ser compensada pela geração de G3P a partir da fosforilação do glicerol (maior atividade da GK e menor liberação de glicerol no meio de incubação com adipócitos);
- ❖ A redução das proteínas de sinalização da insulina e a ausência de resposta à insulina nos experimentos de incorporação de U-<sup>14</sup>C-glicose em glicerol, nos sugere uma redução na sensibilidade à insulina no TABR destes animais.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rothwell NJ, Stock MJ. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diet. *J Nutr* 1987;117(10):1721-6.
2. OMS. Manejo da desnutrição grave: um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas e outros) e seus auxiliares. Genebra/Brasília:Organização Mundial da Saúde; 2000.
3. Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 2000;130(3):514-21.
4. White BD, Poter MH, Martin RJ. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol Behav* 2000;69(4-5):383-9.
5. White BD, Poter MH, Martin RJ. Effects of age on the feeding response to moderately low dietary protein in rats. *Physiol Behav* 2000;68(5):673-81.
6. De França SA. Balanço energético e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo marrom interescapular (TAMI) em ratos submetidos à restrição protéica [dissertação de mestrado]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2008.
7. Hales CN, Barker DLP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
8. Funabashi JTS. Alterações lipogênicas do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR) de ratos machos em crescimento submetidos à restrição



protéica moderada [dissertação de mestrado]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2008.

9. Stern JS, Hirsch J, Drewnowski A, Sullivan AC, Johnson PR, Cohn CK. Glycerol kinase activity in adipose tissue of obese rats and mice: effects of diet composition. *J Nutr* 1983;113:714-20.

10. Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:43-61.

11. Fruhbeck G, Gomes-Ambrosi J, Murazável FJ et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E827-47.

12. Languin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol* 2006, 329(8):598-607.

13. Wang S, Soni KG, Semache M, Casavant S, Fortier M, Pan L, et al. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab* 2008; 95:117–26.

14. Exton JH, Friedmann N, Wong EHA, Brineaux JP, Corbin JD, Park AR. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J Biol Chem* 1972;247(11):3579–88.

15. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 2000;130:3110S-15S.

16. Ahina RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;(11):327-32.

17. Vernon RG. Effect of diet on lipolysis and its regulation. *Proceedings of the Nutrition Society* 1992;51,397-408.

18. Steinberg D, Vaughan M, Margolis S. Studies of triglyceride biosynthesis in homogenates of adipose tissue. *J Biol Chem* 1961;236:1631-37.
19. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1120-4.
20. García-Escobar E, Soriguer F, García-Serrano S, Gómez-Zumaquero JM, Morcillo S, Haro J. et al. Dietary oleic acid and adipocyte lipolytic activity in culture. *J Nutr Biochem* 2008;19:727-31.
21. Vaughan MJ. The production and release of glycerol by adipose tissue incubates in vitro. *J Biol Chem* 1962;237:3354-58.
22. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC. et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 2003;278(33):30413-16.
23. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 2007;27:79-101.
24. Belfrange P, Fredrikson G, Nilsson NO, Stralfors P. Regulation adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int J Obes* 1981;5:631-641.
25. Tsujita T. Basal lipolysis in epididymal fat cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006;47(52):47-53.
26. Brito MN, Bottion LM, Brito NA, Kettelhut IC, Migliorini RH. Lipolysis and glycerokinase activity in brown adipose tissue of rat fed a high-protein, carbohydrate-free diet. *Horm Metab Res* 1994;26(1):51-2.
27. Treble DH, Mayer J. Glycerol Kinase activity in white adipose tissue in obese-hyperglycemic mice. *Nature* 1963;200:363-4.

28. Stern JS, Hirsch J, Drewnowski A, Sullivan AC, Johnson PR, Cohn CK. Glycerol Kinase activity in adipose tissue of obese rats and mice: effects of diet composition. *J Nutrition* 1983;113:714-20.
29. Nilsson LH, Furst P, Hultman E. Carbohydrate metabolism of the liver in normal man under varying dietary conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 1973;32:331-7.
30. Howe R.  $\alpha_3$ -adrenergic agonists. *Drugs Future* 1993;18:529-49.
31. Germa' ck R, Starzec AB, Vassy R, Perret GY.  $\alpha$ -Adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br J Pharmacol* 1997;120:201-10.
32. Richter EA, Kiens B, Galbo H, Saltin B. Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes. In: Carey GB editor. *Mechanisms regulating adipocyte lipolysis*. New York: Plenum Press; 1998. p.157–70.
33. Giudicelli Y, Lacasa D, De Mazancourt P, Pasquier YN, Pecquery R. Steroid hormone and lipolysis regulation. In: Bjorntorp P, Rossner S editors. *Obesity in Europe*. London: John Libbey; 1989. p.185-94.
34. Ros M, Northrup JK, Malbon CC. Adipocyte G-protein and adenylate cyclase: effects of adrenalectomy. *Biochem J* 1989;257:737-44.
35. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306:1383–86.
36. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate lipolysis and reesterification. *Am J Physiol* 2000;275:38486-93.
37. Langin D, Lucas S, Lanfontan M. Lillennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks. *Hum Metab Res* 2000;32:443-52.

38. Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* 2003;44:2089-99.

39. Villena JA, Roy D, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin and adipocyte gene encoding a novel patation domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids:ectopic expression of desnutrin increases trygliceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2004;279:47066-75.

40. Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem* 1988; 263:14544–51.

41. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 1999;40:967–72.

42. Reynisdottir S, Dazats M, Thorne A, Langin D. Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4162–6.

43. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 2008;39(8)715-28.

44. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997;100:270–78.

45. Ke Y, Qiu J, Ogus S, Shen WJ, Kraemer FB, Chehab FF. *Bioch Biophys Res Comm* 2003;312(4):1165-70.

46. Widmaier EP, Rosen K, Abbot B. Free fatty acids activate the hypothalamic pituitary-adrenocortical axis in rats. *Endocrinology* 1992;131:2313-18.
47. Fain JN, Kovacev VP, Scow RO. Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J Biol Chem* 1965;240(9):3522-29.
48. Jeanrenaud B, Renold AE. Studies on rat adipose tissue in vitro. VII Effects of adrenal cortical hormones. *J Biol Chem* 1960;235:2217-23.
49. Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ). *J Biol Chem* 2004;279:27849–54.
50. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S. et al. PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996;15:5336–48.
51. Eisenstein A. Effect of adrenal cortical hormones on carbohydrate, protein, and fat metabolism. *Am J Clin Nutr* 1973;26(1):113-20.
52. Corbin JD, Park CR. Permissive effects of glucocorticoids on lipolysis in adipose tissue. *Fed Proc* 1969;28:702.
53. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res* 1994;35:1535–41.
54. Gaillard D, Wabitsch M, Pipy B, Negrel R. Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. *J Lipid Res* 1991;32:569–79.

55. Seck JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:359–93.

56. Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, Frayn KN. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:626–31.

57. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799–806.

58. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol* 2006;329:598–607.

59. Ragolia L, Begum N. Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998;182:49–58.

60. Londos C, Honnor RC, Dhillon GS. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *J Biol Chem* 1985;260:15139–45.

61. Olsson H, Belfrage P. The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem* 1987;68:399–405.

62. Stralfors P, Honnor RC. Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur J Biochem* 1989;182:379–85.

63. Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY. Insulin disrupts beta-adrenergic signaling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 2005;437:569–73.

64. Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Paternain L, Solomon A, Martinez JA. Ascorbic acid oral treatment modifies lipolytic response and behavioural activity but not glucocorticoid metabolism in cafeteria diet-fed rats. *Acta Physiol* 2008;195(4):449-57.
65. Arner P. Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:10–3.
66. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S. et al. Anti-lipolytic Action of AMP-activated Protein Kinase in Rodent Adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280(26):25250-7.
67. Awad AB, Chattopadhyay JP. Effect of Dietary Saturated Fatty Acids on Hormone-Sensitive Lipolysis in Rat Adipocytes. *J Nutr* 1986;116(6):1088-94.
68. Hardie DG. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* 1989;28(2):117-46.
69. Vernon RG, Clegg RA. The metabolism of white adipose tissue in vivo and in vitro. In: *New Perspectives in Adipose Tissue* [Cryer A. and Van RLR., editors] London: Butterworths; 2005. p. 65-86.
70. Martins-Afféri MP, Festuccia WT, Navegantes LC, Garófalo MA, Botion LM, Kettelhut IC. et al. Response to intra- and extracellular lipolytic agents and hormone-sensitive lipase translocation are impaired in adipocytes from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *J Nutr* 2004;134(11):2919-23.
71. Ozanne SE, Wang CL, Dorling MW, Petry CJ. Dissection of the metabolic actions of insulin in adipocytes from early growth-retarded male rats. *J Endocrinol* 1999;162(2):313-9.

72. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia* 2007; 50:625–33.

73. Molina JM, Ciaraldi TP, Brady D, Olefsky JM. Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 1989;38:991–5.

74. Wueest S, Rapold RA, Rytka JM, Schoenle EJ, Konrad D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia* 2008;52:541–46.

75. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006;50(2):216-29.

76. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabol* 2006;4:263-73.

77. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000;130:3122S-26S.

78. Ayala-Sumuano JT, Velez-Del Valle C, Beltrán-Langarica A, Hernández JM, Kuri-Harcuch W. Adipogenic genes on induction and stabilization of commitment to adipose conversion. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374(4):720-4.

79. Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 2000;275:32379-82.

80. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 1993;13:4753-9.



81. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:571-6.
82. Kletzien RF, Clarke SD, Urrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin- sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 1992;41:393-8.
83. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Ver* 2004;25:831–66.
84. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783–809.
85. Wiper-Bergeron N, Wu D, Pope L, Schild-Poulter C, Hache RJ, Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J* 2003;22:2135–45.
86. Floyd ZE, Stephens JM..STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes* 2003;52:308–14.
87. Paez-Espinosa EV, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Mol Cell Endocrinol* 1999;156:121-9.
88. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991;65:663-75.

89. Wueest S, Rapold RA, Rytka JM, Schoenle EJ, Konrad D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia* 2009;52(3):541-6.

90. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Brás Endocrinol Metab* 2001;45(3):219-27.

91. Holt SH, Miller JC, Petocz P. An insulin index of foods: the insulin demand generated by 1000-kj portions of common foods. *Am J Clin Nutr* 1997;66(5):1264-76.

92. DiGirolamo M, Newby FD, Lovejoy J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB J* 1992;6:2405-12.

93. Anghel SI, Bedu E, Vivier CD, Descombes P, Desvergne B, Wahli W. Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance: a critical role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2007;282:29946-57.

94. Mulder AH, Tack CJ, Olthaar AJ, Smits P, Sweep FCGJ, Bosch RR. Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol* 2005;289:E627-E33.

95. Festuccia, WTL. Controle do metabolismo lipídico no tecido adiposo marrom e branco [tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004.

96. Boschini RP. Controle da geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos. Papel do sistema nervoso simpático [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São

Paulo. Programa de Pós-graduação do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006.

97. Hanson RW, Reshef L. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 2003;85: 1199-1205.

98. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J* 2002;16(13):1695-6

99. Beale EG, Antoine B, Forest C. Glyceroneogenesis in adipocytes: another textbook case. *Trends Biochem Sci* 2003;28( 8):402–3.

100. Tordjman J, Khazen W, Antoine B, Chauvet G, Quette J, Fouque F. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie* 2003;85(12):1213-8.

101. Olswang Y, Cohen H, Papo O, Cassuto H, Croniger CM, Hakimi P. et al. A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma -binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sc USA* 2002;99: 625-30.

102. Franckhauser S, Muñoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P. et al. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 2002;51(3):624-30.

103. Franckhauser S, Muñoz S, Elias I, Ferre T, Bosch F. Adipose overexpression of phosphoenolpyruvate carboxykinase leads to high susceptibility to diet-induced insulin resistance and obesity. *Diabetes* 2006;55(2):273-80.

104. Forest C, Tordjman J, Glorian M, Duplus E, Chauvet G, Quette J. et al. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1125-9.

105. Franckhauser S, Antras-Ferry J, Robin P, Robin D, Granner DK, Forest C. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: opposite effects of dexamethasone and isoprenaline on transcription. *Biochem J* 1995;305(Pt 1):65-7.

106. Franckhauser S, Antras-Ferry J, Robin P, Robin D, Forest C. Glucocorticoids antagonize retinoic acid stimulation of PEPCK gene transcription in 3T3-F442A adipocytes. *Cell Mol Biol* 1994;40(5):723-9.

107. Chaves VE, Frasson D, Martins-Santos ME, Boschini RP, Garófalo MA, Festuccia WT, Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation.. *J Nutr* 2006;136(10):2475-80.

108. Brito SC, Festuccia WL, Kawashita NH, Moura MF, Xavier AR, Garófalo MA. Et al. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids. *Metabolism* 2006;55(1):84-9.

109. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(6):1939-51.

110. Prophet EB, Mills B, Arrington JB. Laboratory methods in histotechnology. Armed Forces Institut of Pathology Washington DC 1992;278p.

111. Sturges HA. The choice of a class-interval. *J Am Statist Assoc* 1926;21:65-6.

112. Rodbell M. Metabolism of isolated fatty cells: I-effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:735-80.

113. Newsholme EA, Robinson J, Taylor, K. A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 1967;132:338-46.

114. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;139:265-75.

115. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

116. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 1970;227:680-5.

117. Towbin H, Staehelin T, Gordon J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;79:4350-4.

118. Folch J, Less M, Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.

119. Karagiannides I, Tchkonja T, Dobson DE, Steppan CM, Cummins P, Chan G. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280: R1772-R80.

120. Bowers RR, Festuccia W, Song CK, Shi H, Migliorini, Bartness RH. Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(6):1167-75.

121. Jones DD, Ramsay TG, Hausman GJ, Martin RJ. Norepinephrine inhibits rat pre-adipocyte proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16(5):349-54.

122. Cantu RC, Goodman HM. Effects of denervation and fasting on white adipose tissue. *Am J Physiol Legacy Content* 1967; 212(1):207-12.

123. Cousi B, Casteilla L, Lafontan M, Ambid L, Langin D, Berthault MF et al. Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism *Endocrinology* 1993;133: 2255-62.

124. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *J Biol Chem* 1999;274:7946–51.

125. Arai K, Soga T, Ohata H, Otagiri A, Shibasaki T. Effects of food restriction on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and glucocorticoid receptor signaling in adipose tissues of normal rats. *Metabolism* 2004;53(1):28-36.

126. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K. et al. PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999(4):597-609.

127. Desvergne B, Wahli W. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20(5):649-88.

128. Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ. et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146(3):1428-37.

129. Burén J, Liu HX, Jensen J, Eriksson JW. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1,

phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol* 2002;146(3):419-29.

130. Burén J, Lai YC, Lundgren M, Eriksson JW, Jensen J. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 2008;474(1):91-101.

131. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 2000;49(10):1700-8.

132. Olswang Y, Blum B, Cassuto H, Cohen H, Biberman Y, Hanson RW. et al. Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem* 2003;278(15):12929-36.

133. Glorian M, Franckhauser-Vogel S, Robin D, Robin P, Forest C. Glucocorticoids repress induction by thiazolidinediones, fibrates, and fatty acids of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. *J Cell Biochem* 1998;68(3):298-308.

134. Nye CK, Hanson RW, Kalhan SC. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem* 2008;283(41):27565-74.

135. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 2002;8(10):1122-8.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)