

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NO CONTROLE DAS  
VIAS DE GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO NO TECIDO  
ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATOS**

Danúbia Frasson

Ribeirão Preto

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NO CONTROLE DAS  
VIAS DE GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO NO TECIDO  
ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Fisiologia.

Danúbia Frasson

Orientadores: Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut

Prof. Dr. Renato Hélios Migliorini (*in memoriam*)

Ribeirão Preto

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Frasson, Danúbia

PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NO CONTROLE DAS VIAS DE GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO NO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL DE RATOS. Ribeirão Preto, 2010.

135 p. 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Departamento de Fisiologia – Área de Concentração: Fisiologia.

Orientadora: Kettelhut, Isis do Carmo.

1. Tecido adiposo epididimal
2. Sistema nervoso simpático
3. Gliceroneogênese
4. Captação de glicose
5. Gliceroquinase

*“A mente que se abre para uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”*

*Albert Einstein*

Ao **Dr. Renato Hélios Migliorini**, mestre, professor e pai científico, pelo exemplo de pesquisador sempre dedicado à ciência, com admiração, respeito, gratidão e saudades dedico.

Ao meu pai **Odilon Frasson**, à minha mãe **Maria Abadia Prudêncio Frasson** e ao meu irmão **João Paulo Frasson**, pelo Amor verdadeiro e incondicional dedicado, pelo Apoio constante e revigorante, por Sonharem os meus sonhos e pelo exemplo de Fé e Luta, eu dedico.

Ao meu noivo **Fábio Lennon Furtado** pelo amor, incentivo e apoio a minha carreira científica, por estar sempre presente mesmo com a distância física, por acreditar nos meus sonhos e torná-los seus, eu dedico.

*Ao Querido Mestre,*



*“ ...eu não precisava ter*

*vocação*

*sapiência*

*dedicação ou*

*inteligência*

*nem precisava do Senhor captar*

*o exemplo*

*a humildade*

*o respeito*

*a competência*

*Bastaria simplesmente...*

*apenas um dia, sua aluna, ter sido!!!”*

*Vera Lúcia Teixeira*

## **Agradecimentos**

A **DEUS**, pelo dom da vida e saúde, por sua infinita bondade, pela presença marcante que fortalece e conforta.

À **Dra. Isis do Carmo Kettelhut**, por ter me recebido de braços abertos como aluna, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos e conselhos, pelo incentivo constante, pela admirável competência em tudo que faz, pela simpatia que contagia e pelo exemplo de vida e fé.

Ao **Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho, pelo apoio e incentivo à carreira acadêmica, pelos conselhos, pela amizade e agradável convívio.

À Dra. **Nair Honda Kawashita**, pela amizade, pelo apoio indispensável para a realização deste trabalho, pelos conselhos, pelas conversas científicas e não científicas e pela agradável companhia.

À **Dra. Hei Sook Sul**, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e pelos ensinamentos.

À **Maria Antonieta Rissato Garófalo**, pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos e ensinamentos que levarei para sempre comigo, pelo apoio técnico de extrema qualidade, pela paciência em ensinar e também de ouvir, por transmitir serenidade e confiança.

À **Valéria Ernestânia Chaves**, pela amizade, pelo apoio incansável e incentivo constante, pelos conselhos, pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelas sugestões, pelo carinho, pelo respeito e honestidade, pela franqueza, pelas conversas agradáveis, pela convivência e confidências. À **Maria Emília Soares Martins dos Santos**, pela amizade, exemplo de dedicação e concentração no trabalho, pelo agradável convívio. À **Renata Polessi Boschini** pela amizade, pelo exemplo de coragem e maturidade, pelo apoio dedicado e conselhos. A todas agradeço por permitir a existência do “**REVADAMI**”, apelido carinhoso dado pelo Dr. Renato para nós. Para sempre serão minhas irmãs gliceroneogênicas!



À **Neusa Maria Zanon**, pela amizade, pelos conselhos, pelo apoio técnico, pelas dicas de saúde e bem estar, pelo exemplo de determinação, pela energia e alegria contagiante. À **Elza Aparecida Filippin**, pela amizade, pelo apoio técnico, pela disponibilidade em ajudar, pelas agradáveis e sinceras conversas. Ao **Victor Diaz Galban**, pela amizade, pela disponibilidade em ajudar, pelos conselhos computacionais e auxílio dedicado.

À **Amanda Martins Baviera**, pela amizade, pelo exemplo de determinação e competência, pelos conselhos, pelas conversas sinceras, pelo incentivo e apoio. Ao **Walter Dias Júnior**, pela amizade, pelo incentivo, apoio e agradável convivência. À **Andreza Bonifácio**, pela amizade, pela disponibilidade em ajudar e agradável convivência.

Aos amigos proteolíticos **Sílvia de Paula Gomes, Luciana Carvalho, Lidiany Góis, Eduardo Carvalho Lira, Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, Wilian Silveira, Flávia Aparecida Graça, Priscila Cassolla, Leandro Henrique Manfredi, Thiago de Lorena Fábio** e lipogênico **Rafael Rossi Valentin**, pela amizade, pelo apoio e incentivo, pelo convívio harmonioso e agradável e por manter o espírito de alegria e trabalho no LCM (Laboratório de Controle do Metabolismo). Ao **Michael Douglas, Adriano Duran e Leandro Garcia** pela amizade e auxílio técnico.

Aos professores **Dr. Ithamar Vugman e Dr. Célio Raimundo Machado** pelo incentivo, pelos conselhos e adoráveis conversas. Aos professores **Dr. José Antunes Rodrigues, Dr. Benedito Honório Machado, Dra. Lucila Leico K. Elias** e aos demais professores do Departamento de Fisiologia e Bioquímica, pelos ensinamentos, pelo incentivo e apoio dedicado.

Às professoras **Ms. Ana Carla Marques da Silva, Dra. Sandra Lucinei Balbo e Dra. Maria Lúcia Bonfleur**, por terem despertado em mim o interesse pela ciência, pelo apoio e incentivo e exemplo de dedicação.

À **Maryam Ahmadian e Robin Duncan**, pelos ensinamentos e por proporcionarem um ambiente agradável no laboratório durante meu estágio na University of California Berkeley.

Às minhas amigas **Valéria Ferreira Garcez e Dayane Aparecida Gomes**, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas conversas sinceras e espírito familiar que

mantinham na república. Às amigas de república **Ligia Subitoni Antonio, Fabiana Lucio de Oliveira, Mirian Bassi, Milena Sobral, Andréia Lopes**, pela amizade, pelo incentivo, pelo apoio e agradáveis conversas.

Aos amigos **Mirela Barros Dias** e **Alberto**, pela amizade, carinho, apoio, incentivo e incansável torcida.

Aos amigos **Dr. Nelson Narata Filho** e **Geziéle Wittmann**, pela amizade, pelo apoio, incentivo e carinho dedicado.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia, **Lyz Angela Favaroni Mendes, Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Wagner Luis Reis, Karin Viana Weissheimer, Olagide Wagner de Castro, Ernane Torres Uchôa, Cristiane Mota Leite, André Luiz Andreotti Dagostin, Érica Granjeiro, Renata Maria Lataro, Domitila Augusta Huber, Marcelo Picinin Bernuci, Daniel Breseghello Zoccal, Daniel Penteado Martins Dias, Luis Felipe Souza da Silva, Julianna da Rocha Borges**, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, **Rosana, Sami, Adriana, Felipe, Ruither e Ricardo**, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia: **Elisa, Cláudia, Fernando e Carlos** e Bioquímica e Imunologia: **Ivone, Lúcia, Téia e Ronaldo**, pela dedicação e competência.

Aos meus **primos e primas, tios, tias e avós**, pela torcida e carinho, o meu obrigada.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmica.

À FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	<i>i</i>
<b>Summary</b> .....	<i>iii</i>
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	14
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>16</b>
3.1 Animais e seu Tratamento .....	16
3.1.1 Desnervação simpática unilateral do tecido adiposo branco epididimal.....	22
3.1.2 Desnervação simpática unilateral do tecido adiposo branco retroperitoneal .....	22
3.2 Concentração de noradrenalina tecidual.....	22
3.3 Velocidade de renovação de noradrenalina.....	23
3.4 Adipócitos isolados .....	25
3.5 Lipólise <i>in vitro</i> em adipócitos do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal.....	25
3.6 Índice de captação de glicose <i>in vivo</i> .....	26
3.7 Índice de captação de glicose <i>in vitro</i> .....	28
3.8 Incorporação de 1- <sup>14</sup> C-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) .....	29
3.9 Extração dos lipídios totais .....	29
3.10 Medida das atividades enzimáticas .....	30
3.10.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) .....	30
3.10.2 Gliceroquinase (GyK).....	31
3.11 Tratamento estatístico dos resultados.....	32
<b>4. Resultados</b> .....	<b>33</b>
4.1 Eficiência da desnervação simpática .....	34
4.2 Efeito do Jejum .....	36
4.2.1 Peso do tecido adiposo epididimal.....	36

4.2.2	Lipólise <i>in vitro</i> no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal .....	38
4.2.3	Índice de captação de glicose <i>in vivo</i> no tecido adiposo epididimal....	43
4.2.4	Índice de captação de glicose <i>in vitro</i> no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.....	46
4.2.5	Incorporação de 1- <sup>14</sup> C-piruvato na fração glicerol de TAG no tecido adiposo epididimal .....	48
4.2.6	Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal .....	50
4.2.7	Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.....	52
4.3	Efeito do diabetes .....	54
4.3.1	Peso do tecido adiposo epididimal.....	54
4.3.2	Índice de captação de glicose <i>in vitro</i> no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.....	56
4.3.3	Incorporação de 1-[ <sup>14</sup> C]-piruvato na fração glicerol de TAG <i>in vitro</i> no tecido adiposo epididimal.....	58
4.3.4	Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal .....	60
4.3.5	Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.....	62
4.4	Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos .....	64
4.4.1	Peso do tecido adiposo epididimal.....	64
4.4.2	Velocidade de renovação de noradrenalina no tecido adiposo epididimal.....	66
4.4.3	Índice de captação de glicose <i>in vivo</i> no tecido adiposo epididimal....	68
4.4.4	Incorporação de 1-[ <sup>14</sup> C]-piruvato na fração glicerol de TAG <i>in vitro</i> no tecido adiposo epididimal.....	71
4.4.5	Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal .....	73
4.4.6	Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo epididimal.....	75
4.5	Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica.....	77
4.5.1	Peso do tecido adiposo branco epididimal.....	77
4.5.2	Índice de captação de glicose <i>in vivo</i> no tecido adiposo branco epididimal.....	79

4.5.3	Incorporação de 1-[ <sup>14</sup> C]-piruvato na fração glicerol de TAG em adipócitos do tecido adiposo epididimal.....	82
4.5.4	Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal .....	84
4.5.5	Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo epididimal..	86
	<i>Resumo do resultados das 3 vias de geração de G3P nas diferentes situações experimentais e os efeitos obtidos com a desnervação .....</i>	<i>88</i>
	<i>Efeito do jejum .....</i>	<i>89</i>
	<i>Efeito do diabetes .....</i>	<i>91</i>
	<i>Efeito da dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP).....</i>	<i>93</i>
	<i>Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL)...</i>	<i>95</i>
	<i>Análise comparativa entre o tecido adiposo retroperitoneal e epididimal de animais alimentados com uma dieta balanceada.....</i>	<i>97</i>
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>98</b>
5.1	Peso do tecido adiposo epididimal e a lipólise.....	100
5.2	Vias de geração de glicerol-3-fosfato.....	107
5.2.1	A partir da <i>via</i> glicolítica .....	109
5.2.2	A partir da <i>via</i> gliceroneogênica.....	113
5.2.3	A partir da atividade da gliceroquinase .....	117
	<b>Conclusões .....</b>	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>124</b>

***Resumo***

---

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos do sistema nervoso simpático no tecido adiposo branco epididimal (EPI) nas três vias de geração de glicerol-3-fosfato (G3P): **a)** a partir da via glicolítica, estimada pela captação de glicose; **b)** a partir da gliceroneogênese, avaliada pela velocidade de incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) e pela atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK); **c)** a partir da fosforilação direta do glicerol, avaliada pela atividade da gliceroquinase (GyK). Os experimentos foram realizados no EPI de ratos nas seguintes situações experimentais: jejum de 48 horas, diabetes *mellitus*, adaptados a uma dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP) e adaptados a dieta hipercalórica, hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL). Foram utilizados animais alimentados com uma dieta comercial padrão de biotério como controle dos grupos estudados, com exceção do grupo HP, cujos controles foram alimentados com uma dieta purificada balanceada.

O peso do EPI mostrou-se reduzido no jejum de 48 horas, no diabetes e nos animais que receberam a dieta HP em relação aos seus controles. A desnervação promoveu uma menor redução no peso do EPI nos grupos diabéticos e HP quando comparado aos tecidos inervados. A desnervação no jejum impediu a redução do peso do tecido, o qual se manteve semelhante ao peso dos tecidos dos animais alimentados. A dieta HCHL aumentou o peso do EPI e a desnervação não alterou este parâmetro.

O índice de captação de glicose *in vivo* e *in vitro* foi menor nos animais jejuados, diabéticos e alimentados com a dieta HP em relação aos seus controles. A desnervação não alterou este parâmetro nos animais jejuados e alimentados com a dieta HP, porém causou uma redução adicional na captação da hexose nos animais

diabéticos. A dieta HCHL aumentou este parâmetro e a desnervação simpática não alterou a captação de glicose no tecido dos animais HCHL.

A incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol-TAG e a atividade da PEPCK mostraram-se aumentada no EPI dos animais jejuados, diabéticos e alimentados com a dieta HP. A desnervação diminuiu estes parâmetros nos animais jejuados e diabéticos. Embora reduzida, esta via se manteve predominante na geração de G3P nestas situações. Nos animais HP, a pequena redução da atividade da PEPCK com a desnervação, não comprometeu a estimulada incorporação de piruvato em glicerol-TAG. A dieta HCHL reduziu a incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol-TAG e a atividade da PEPCK. A desnervação causou uma redução adicional nestes parâmetros no EPI dos animais HCHL.

A atividade da GyK foi reduzida no jejum e na dieta HP, não foi alterada no estado diabético, mas foi aumentada pela dieta HCHL. A desnervação reduziu a atividade da enzima em todos os grupos experimentais.

Os dados deste trabalho corroboram a hipótese que existe um controle recíproco entre as vias de geração de G3P, principalmente entre a via glicolítica e a gliceroneogênese, independente da atividade da gliceroquinase.

A formação de G3P no TAB epididimal a partir da: a) *via* glicolítica é estimulada pela insulina. A ação estimulatória do SNS se torna evidente apenas em situações de deficiência insulínica, como no diabetes; b) *via* gliceroneogênica é inibida pela insulina e ativada pelo SNS; c) *via* de fosforilação direta do glicerol (GyK) parece depender principalmente da inervação simpática no tecido adiposo, além de fatores hormonais e/ou metabólicos.

Desta forma, podemos sugerir que existe uma interação entre a atividade do SNS e os níveis de insulina no controle das *vias* de geração de G3P no EPI de ratos, entretanto não podemos excluir a possibilidade de outros fatores hormonais e/ou metabólicos também interferirem nestes processos.



***Summary***

---

## Summary

The purpose of the present work was to investigate the role of sympathetic nervous system on epididymal white adipose tissue (EPI) on the three pathways of glycerol-3-phosphate (G3P) generation: **a)** glycolysis, estimated by glucose uptake; **b)** glyceroneogenesis, evaluated by the rates of 1-[<sup>14</sup>C]-pyruvate incorporation into glycerol-triacylglycerol (TAG) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity; **c)** direct phosphorylation of glycerol, evaluated by glycerokinase (GyK) activity. For these experiments we have used fasted (48h), diabetic rats, as well as fed a high-protein, carbohydrate-free diet (HP) or a hypercaloric cafeteria type diet (HCHL). For most experiments animals fed a standard commercial diet were used as control. Rats fed a purified balanced diet were used as control of HP rats.

EPI weight was reduced in fasted, diabetic and HP animals as compared to control pad. The denervation promoted a smaller reduction of EPI weight in diabetic and HP groups and completely prevented the fasting-induced loss of tissue weight. The cafeteria diet increased EPI weight gain in innervated and denervated tissue similarly.

The rate of glucose uptake *in vivo* and *in vitro* were lower in fasted, diabetic, and HP animals in relation to their controls. The denervation did not change this parameter in fasted and HP rats, but induced a further reduction in hexose uptake in diabetic rats. The cafeteria diet increased the rate of glucose uptake, but denervation did not alter this parameter.

The incorporation of 1-[<sup>14</sup>C]-pyruvate into glycerol-TAG and PEPCK activity increased in EPI from fasted, diabetic and HP animals and denervation decreased these parameters in fasted and diabetic rats. Even reduced, the glyceroneogenesis pathway was still high under these situations. In HP animals, even a small reduction

in PEPCK activity induced by denervation did not modify the stimulated pyruvate incorporation into glycerol-TAG. The cafeteria diet reduced the PEPCK and glyceroneogenesis activities and denervation caused further reduction in these parameters.

The GyK activity was reduced by fasting and HP diet, was not altered by diabetes and was increased by HCHL diet. EPI denervation reduced the activity of this enzyme in all experimental groups.

These data are in agreement with the hypothesis that there is a reciprocal control between the pathways of G3P generation, independently of GyK activity.

The generation of G3P from: a) glycolysis is stimulated mainly by insulin and seems to be regulated by SNS only under insulin deficiency situations, like diabetes; b) glyceroneogenesis is inhibited by insulin and activated by SNS; c) the direct phosphorylation of glycerol seems to be directly stimulated by SNS.

Therefore, we suggest that there is an interaction between SNS and insulin effects on the control of G3P generation in EPI from rats, however we can not exclude the possibility that other hormones and/or metabolic factors could also regulate this metabolic process.

## ***Introdução***

---

## **1. Introdução**

O papel do tecido adiposo branco (TAB) é de contribuir para o controle do metabolismo energético mobilizando ácidos graxos (AGs) ou estocando energia na forma de triacilglicerol (TAG), composto estruturalmente formado pela união de uma molécula de glicerol e três moléculas de AGs por meio de ligações ésteres. Uma reserva adequada de TAG é necessária para o tecido adiposo exercer sua função de mobilizar AGs de acordo com a demanda energética dos outros tecidos. Para o TAB atender às necessidades energéticas dos tecidos periféricos nas diversas situações fisiológicas, os TAGs são continuamente hidrolisados. Essa lipólise ocorre em grau variável de acordo com a demanda, liberando os AGs que serão transportados na circulação (na forma livre, não esterificado) ligados à albumina, onde poderão ser utilizados e oxidados pelos tecidos periféricos.

Os ácidos graxos livres (AGL) e a glicose constituem os principais substratos utilizados pelos tecidos periféricos para a produção de energia. Tanto a produção hepática de glicose quanto sua utilização pelos tecidos são controladas. Os AGL, no entanto, parecem ser controlados apenas ao nível de produção, não sendo conhecido nenhum fator responsável pela regulação de sua utilização. Portanto, um aumento nos níveis plasmáticos de AGL ocorre por um aumento da sua liberação (mobilização de AGs decorrentes da hidrólise de TAG armazenado).

O conteúdo de TAG armazenado no TAB é dependente do balanço entre sua velocidade de síntese (lipogênese) e sua velocidade de degradação (lipólise). Em períodos de balanço energético negativo, como durante o jejum, a lipólise é estimulada e aumenta a liberação de AGs e glicerol que serão utilizados como fonte de energia em diversos tecidos corporais como fígado, músculo esquelético e

cardíaco. Em contraste, em períodos de balanço energético positivo, como por exemplo, após a ingestão alimentar, a lipogênese e o armazenamento de TAG no TAB estão estimulados.

O controle da lipólise no TAB é bastante complexo e envolve a interação de diversos fatores hormonais e neurais. As catecolaminas são as ativadoras primárias da mobilização de AGs do TAB induzida pelo jejum. A noradrenalina, neurotransmissor do SNS, ao se ligar aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, os quais são acoplados às proteínas Gs na membrana plasmática dos adipócitos, transmitem o sinal estimulatório à enzima adenilato ciclase, a qual catalisa a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O AMPc gerado se liga as subunidades regulatórias da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) ocorrendo a dissociação das subunidades catalíticas e a ativação da PKA. Uma vez estimulada, a PKA fosforila e ativa a lipase hormônio sensível (LHS) e subsequentemente, sua translocação do citosol para o glóbulo de gordura desencadeando a hidrólise dos TAG estocados (BELFRAGE *et al.*, 1981; MORIMOTO *et al.*, 2001; HOLM 2003; SU *et al.*, 2003). Além da LHS, as perilipinas, proteínas que recobrem a superfície do glóbulo de lipídios protegendo-os da hidrólise, também são fosforiladas pela PKA durante o estímulo lipolítico. Estas proteínas, quando fosforiladas, sofrem modificação conformacional permitindo assim o acesso da LHS ao glóbulo de gordura (CLIFFORD *et al.*, 2000; SZTALRYD *et al.*, 2003) e subsequente hidrólise do TAG.

Estudos recentemente realizados em camundongos com ausência do gene que codifica a LHS sugerem que outras lipases podem participar da mobilização de AGs do TAB. O tratamento de adipócitos isolados destes animais nocautes com isoproterenol promove um aumento moderado na taxa lipolítica quando comparado à

estimulação lipolítica induzida nos adipócitos dos animais controles (OKAZAKI *et al.*, 2002). Além disto, os camundongos com ausência da LHS apresentam acúmulo de diacilglicerol (DAG) no TAB, sugerindo que a LHS é uma enzima limitante para a hidrólise apenas do DAG (HAEMMERLE *et al.*, 2002). De fato, experimentos realizados *in vitro* têm demonstrado que a LHS é mais ativa na hidrólise de DAG e ésteres de colesterol se comparado à hidrólise de TAG e monoacilglicerol (KRAEMER *et al.*, 2002). A superexpressão da lipase recentemente descrita, denominada lipase do triacilglicerol do adipócito (ATGL, PNPLA2, iPLA2 ou TTS2.2), promove um aumento na quebra de TAG e liberação de AGs do TAB (ZIMMERMANN *et al.*, 2004; JAWORSKI *et al.*, 2007).

Ao contrário das catecolaminas, a insulina inibe a mobilização de AGs do TAB. A regulação da lipólise pela insulina pode envolver dois mecanismos distintos, sendo um deles dependente e o outro independente de AMPc. A inibição da lipólise dependente de AMPc induzida pela insulina envolve a ativação da fosfodiesterase do AMPc do tipo 3B (STRALFORS *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 2005; LANGIN 2006). Este processo se inicia pela ligação da insulina ao seu receptor tirosina quinase causando a autofosforilação deste e, subsequentemente, a fosforilação dos substratos do receptor de insulina, permitindo sua interação com a subunidade p85 da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K). Em seguida, PI3K fosforila o fosfatidil inositol (4,5) bifosfato na membrana celular formando o fosfatidil-inositol (3,4,5) trifosfato (PI3,4,5P<sub>3</sub>), molécula que permite a ancoragem da proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinositídeos (PDK1). A PDK1 ainda ancorada em PI3,4,5P<sub>3</sub> irá fosforilar e ativar a proteína quinase B / Akt (PKB/Akt). PKB/Akt, por sua vez, fosforila e ativa a fosfodiesterase 3B, enzima responsável pela degradação do AMPc no adipócito. A diminuição dos níveis de AMPc prejudica a ativação da PKA e, conseqüentemente, a

fosforilação da LHS e perilipinas, bloqueando a mobilização de AGs do TAB. A regulação da lipólise independente de AMPc pela insulina envolve a estimulação da proteína fosfatase-1 pela fosforilação de sua subunidade regulatória. A proteína fosfatase-1 ativada, rapidamente defosforila e desativa a LHS, causando uma queda na taxa lipolítica do tecido (LONDOS *et al.*, 1985; OLSSON *et al.*, 1987; RAGOLIA *et al.*, 1998).

O aumento da atividade lipolítica do TAB combinado com a diminuição da lipogênese conduz à diminuição do conteúdo de TAG dos adipócitos durante o jejum. Após uma alimentação rica em carboidratos, a atividade lipogênica, tanto no TAB quanto no fígado, encontra-se estimulada, levando à elevação dos níveis plasmáticos de TAG. Embora os fatores nutricionais sejam a causa primária das alterações na taxa de lipogênese no TAB, eles controlam a síntese de AGs não apenas diretamente, pelas alterações do fluxo de metabólitos, como também pela ativação da secreção de hormônios reguladores da síntese de AGs (HILLGARTNER *et al.*, 1995; KERSTEN 2001).

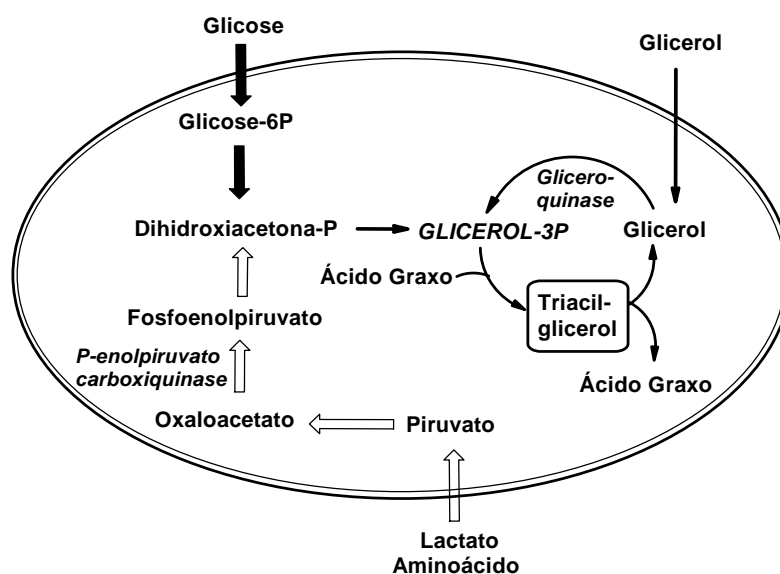
A insulina é, provavelmente, o mais importante fator hormonal envolvido na regulação da lipogênese. Os efeitos da insulina são iniciados pela ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular, ativando a atividade tirosina quinase do receptor e iniciando a cascata de transdução do sinal, que culminará com a estimulação da lipogênese por mais de um mecanismo: **a)** aumento da captação de glicose pelos adipócitos *via* recrutamento dos transportadores de glicose (GLUT-4) para a membrana plasmática; **b)** ativação das enzimas glicolíticas e lipogênicas por modificação covalente e/ou estimulação da expressão gênica (FORETZ *et al.*, 1999; KERSTEN 2001; GRIFFIN *et al.*, 2004).



Durante o processo de lipogênese, além dos AGs sintetizados *de novo* a partir da glicose ou de outros compostos produtores de acetil-CoA (como alguns aminoácidos), os AGs esterificados pelo tecido, podem ser também provenientes da hidrólise dos próprios TAGs endógenos ou captados dos quilomicrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), por meio da hidrólise dos TAG contidos nestas lipoproteínas pela lipase lipoprotéica.

Experimentos realizados neste laboratório com a técnica de dupla marcação (administração simultânea de  $^3\text{H}_2\text{O}$  e de glicose-U- $^{14}\text{C}$ ) indicam que os AGs provenientes da síntese *de novo* constituem a menor fração do total de AGs utilizados pelo TAB para a síntese de TAG (BOTION *et al.*, 1998).

No entanto, independente da origem dos AGs, o fornecimento de glicerol-3-fosfato (G3P) é essencial para o funcionamento adequado do TAB e formação de TAG. A via clássica de obtenção de G3P pelo TAB é a sua síntese a partir de carbonos de glicose, pela conversão de dihidroxicetona fosfato, um intermediário da *via glicolítica*, a G3P, uma reação catalisada pela enzima G3P desidrogenase. Além desta via, o TAB possui duas outras formas de obtenção de G3P: **a)** fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase (GyK) e **b)** *via gliceroneogênica* que consiste na formação de G3P a partir de compostos não glicídicos, como aminoácidos, lactato e piruvato, envolvendo a carboxilação do piruvato a oxaloacetato, descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e a formação de G3P por uma reversão parcial da *via glicolítica* (Figura 01).



**Figura 01** – Fontes de glicerol-3-fosfato nos adipócitos do tecido adiposo branco.

O conteúdo e a atividade da GyK no TAB são relativamente baixos e considerados desprezíveis quando comparados ao tecido adiposo marrom (TAM) ou ao fígado. Esta informação tem permitido a utilização do glicerol liberado para o meio de incubação por fragmentos do TAB ou por adipócitos como índice da atividade lipolítica.

Em experimentos realizados *in vitro* foi verificado que o TAB é capaz de converter lactato, piruvato e aminoácidos glicogênicos em glicerol de TAG pela gliceroneogênese, sendo que a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é a enzima chave desse processo (BALLARD *et al.*, 1967; GORIN *et al.*, 1969; RESHEF *et al.*, 1970; HOPGOOD *et al.*, 1973). Nesses estudos ainda foi observado que a atividade gliceroneogênica, estimada pela incorporação de piruvato em glicerol de TAG por fragmentos de tecido, encontrava-se aumentada no tecido adiposo branco epididimal (EPI) de animais jejuados ou diabéticos (BALLARD *et al.*, 1967; GORIN *et al.*, 1969). Como nessas duas situações a atividade lipolítica do TAB e os níveis de

---

AG livres do plasma encontram-se aumentados, a ativação da gliceroneogênese foi originalmente interpretada como um mecanismo de restrição à lipólise (pelo aumento da formação de G3P haveria aumento na esterificação dos AG, diminuindo sua mobilização), moderando a formação de corpos cetônicos e a acidose (RESHEF *et al.*, 1970).

A primeira confirmação clara da importância metabólica dessa via foi obtida há alguns anos em estudos deste laboratório que demonstraram ser a gliceroneogênese, estimada *in vivo* em ratos não anestesiados, alimentados com a dieta balanceada, uma das principais fontes de G3P tanto no TAB como no TAM e no fígado. A contribuição de carbonos glicídicos para síntese do glicerol total incorporado em TAG no TAB foi estimada em 44%, indicando uma participação importante (56%) da gliceroneogênese para a formação de G3P em animais alimentados com a dieta balanceada (BOTION *et al.*, 1998). A presença da via gliceroneogênica no fígado foi, posteriormente, confirmada em estudos no homem (KALHAN *et al.*, 2001).

Experimentos em animais geneticamente modificados estabeleceram definitivamente a PEPCK como a enzima chave da gliceroneogênese no TAB. Camundongos com deleção gênica da PEPCK apresentam redução da gordura corporal e aumento da mobilização de AG do TAB (OLSWANG *et al.*, 2002). Por outro lado, camundongos transgênicos que produzem PEPCK em excesso são obesos e apresentam alta atividade gliceroneogênica no TAB e baixos níveis de AG livres plasmáticos (FRANCKHAUSER *et al.*, 2002). Mais recentemente foi demonstrado que a redução da mobilização de AGs produzida por tiazolidinedionas (TZD), drogas usadas no tratamento do diabetes, é devida principalmente à indução da transcrição do gene da PEPCK no TAB, com conseqüente aumento da

gliceroneogênese e da esterificação de AGs (TORDJMAN *et al.*, 2003). Tais experimentos com animais geneticamente modificados ou que receberam TZD vieram comprovar a importância da gliceroneogênese e renovaram o interesse pelo esclarecimento de sua importância fisiológica.

O interesse do nosso laboratório no estudo da regulação da via gliceroneogênica iniciou-se com a observação de que ratos alimentados, por 30 dias, com a dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), apesar dos baixos níveis plasmáticos de insulina e altos de glucagon, mantinham consideráveis estoques de gordura corporal, representando 85-90% dos valores encontrados nos animais alimentados com a dieta balanceada. No entanto, estes animais apresentavam uma redução da capacidade lipogênica no TAB (EPI, retroperitônio (RETRO), subcutâneo e intermuscular), no tecido hepático e na carcaça, avaliada *in vivo* com  $^3\text{H}_2\text{O}$  (SCHMID *et al.*, 1984; BOTION *et al.*, 1992). Posteriormente, experimentos realizados *in vivo* pela administração simultânea de  $^3\text{H}_2\text{O}$  e  $^{14}\text{C}$ -glicose demonstraram um aumento na gliceroneogênese no RETRO e EPI dos ratos adaptados à dieta HP em relação aos animais controles, fornecendo o G3P necessário à manutenção das reservas lipídicas. Nestes mesmos experimentos foi verificado que a maioria do glicerol-TAG sintetizado pelo tecido é utilizado para esterificação de AGs pré-formados, que incluem os reciclados após a hidrólise dos estoques de TAG e aqueles provenientes da quebra do TAG presentes nas lipoproteínas circulantes (BOTION *et al.*, 1998). Mais recentemente dados do nosso laboratório demonstraram a importância dos AGs provenientes da dieta no controle da gliceroneogênese no tecido adiposo (BRITO *et al.*, 2006). Foi constatado que o RETRO e EPI de ratos adaptados à dieta HP apresentam um aumento na atividade da LPL, enzima que catalisa a hidrólise de TAG de quilomicrons e VLDL. Após

administração de Triton WR 1339 (um inibidor da LPL e, portanto, bloqueador da captação de AGs das lipoproteínas da circulação) a estes animais, a atividade da gliceroneogênese, avaliada pela atividade da PEPCK e incorporação de 1-[<sup>14</sup>C] piruvato em glicerol-TAG, foi reduzida. Desta forma, a preservação da gordura corporal em ratos adaptados à dieta HP é mantida devido à uma maior eficiência do tecido adiposo destes animais em utilizar AGs da dieta (BRITO *et al.*, 2006).

O RETRO e EPI dos animais adaptados à dieta HP apresentam uma redução na velocidade de utilização de glicose, evidenciada pela diminuição da captação de glicose *in vivo* e diminuição do fluxo glicolítico (estimado pela 5-[<sup>3</sup>H]-glicose) e da captação de glicose *in vitro* (estimada pela 2-desoxi-1-[<sup>3</sup>H]-D-glicose) pelos adipócitos isolados, bem como uma pronunciada redução da atividade das enzimas chaves da via glicolítica: hexoquinase, fosfofruto-1-quinase e piruvato quinase (BRITO *et al.*, 2001). Devido à reduzida geração de G3P pela via glicolítica e pelo processo de fosforilação direta do glicerol pela GyK no RETRO dos ratos alimentados com a dieta HP, o aumento na gliceroneogênese foi interpretado como um mecanismo compensatório para garantir o suprimento adequado e contínuo de G3P necessário para o armazenamento de TAG pelo tecido.

A atividade lipolítica basal e estimulada no EPI de ratos adaptados à dieta HP, avaliada tanto pela liberação de glicerol quanto pela liberação de AGs ao meio de incubação, apresenta-se reduzida quando comparada a de animais controles (KETTELHUT *et al.*, 1985). Mais recentemente foi demonstrado que o principal mecanismo responsável pela redução da atividade lipolítica tanto basal quanto estimulada com isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenérgico) no TAB de ratos adaptados à dieta HP parece ser uma menor capacidade de translocação da LHS para a gota de

---

gordura, no processo intracelular de ativação da lipólise (MARTINS-AFFÉRI *et al.*, 2004).

O aumento na gliceroneogênese no TAB dos ratos adaptados à dieta HP, apesar da reduzida atividade lipolítica, forneceu uma indicação de que esta via de geração de G3P tem uma importância fisiológica que não a da regulação da mobilização de ácidos graxos, moderando a formação de corpos cetônicos e a acidose, como proposto inicialmente (RESHEF *et al.*, 1970). Esta observação aumentou o interesse do nosso laboratório e de outros grupos internacionais, no esclarecimento da regulação desta via de geração de G3P e sua importância fisiológica.

Apesar do papel do sistema nervoso simpático (SNS) no controle da lipólise ser mais amplamente conhecido, recentemente tem sido demonstrada sua participação na diferenciação e proliferação dos adipócitos. Numerosos estudos demonstram que em situações de demanda de energia, a estimulação de neurônios de diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), conectados ao sistema simpático que inerva o TAB, produz um aumento do fluxo nessa via e liberação de noradrenalina nas terminações nervosas do tecido, com conseqüente ativação da lipólise como mencionado anteriormente. Uma outra função da inervação simpática do TAB que vem sendo investigada atualmente é sua influência na regulação da celularidade do tecido adiposo.

Tem sido verificado que após 7 dias de desnervação simpática unilateral do tecido adiposo retroperitoneal (RETRO) ocorre um aumento significativo no peso do tecido, no conteúdo de DNA e na expressão da A2COL6/pOb24, um marcador do primeiro estágio de diferenciação celular quando comparado ao lado intacto innervado. O aumento do período de desnervação simpática do RETRO, de uma

semana para um mês, promove um aumento significativo no número de células do lado desnervado em comparação ao lado intacto inervado (COUSIN *et al.*, 1993). Um aumento significativo no número de células do TAB inguinal também foi observado 11 semanas após desnervação simpática cirúrgica deste tecido (YOUNGSTROM *et al.*, 1998). Concordante com estes dados obtidos *in vivo*, foi verificado que a noradrenalina inibe a proliferação de pré-adipócitos *in vitro*, um efeito bloqueado pela adição do propranolol (JONES *et al.*, 1992). Desta forma, tem sido sugerida uma relação inversa entre a atividade simpática para um determinado depósito de TAB e a proliferação celular (HAUSMAN *et al.*, 2001).

Para estudarem o efeito simpático sobre o metabolismo lipídico, pesquisadores utilizaram a técnica de desnervação cirúrgica unilateral do RETRO. Essa técnica foi utilizada, pela primeira vez, por Cantu e Goodman (1967), que padronizaram o procedimento para a desnervação cirúrgica do RETRO em ratos. Embora o efeito da desnervação na proliferação de adipócitos não fosse o objetivo dos seus experimentos, Cantu e Goodman observaram que a desnervação unilateral do TAB induzia um aumento do peso do tecido, quando comparado ao do tecido contralateral, intacto. Esse efeito da desnervação vem sendo desde então confirmado por diversos pesquisadores, tanto em ratos como em hamsters. Os estudos mostram ainda que a desnervação do RETRO estimula a diferenciação e a proliferação de pré-adipócitos do TAB, com conseqüente aumento do número de células (YOUNGSTROM e BARTNESS, 1998). À medida que estas células aumentam de tamanho aumenta o conteúdo lipídico do tecido.

Teoricamente, os efeitos da desnervação poderiam decorrer da secção de outras fibras (não-simpáticas) como fibras sensoriais e/ou fibras parassimpáticas do TAB. No entanto, Jones e colaboradores (1992) demonstraram em estudos *in vivo*,

---

que a hiperplasia é abolida pela infusão de noradrenalina e recuperada pela adição de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos inespecíficos (*in vitro*), corroborando a hipótese de que o SNS exerce efeito inibitório sobre proliferação no TAB.

Alterações do fluxo sanguíneo, produzidos pela desnervação, poderiam também afetar o número e/ou o tamanho das células, aumentando o aporte de hormônios, peptídeos, metabólitos e outros fatores. No entanto, nenhuma correlação tem sido encontrada entre a vascularização dos diversos depósitos de TAB e os efeitos da inervação simpática (BARTNESS, 2002).

Cantu e Goodman (1967) verificaram *in vitro*, que contrariamente ao esperado, a desnervação do RETRO não afetava nem a lipólise basal, estimada pela liberação de glicerol e AG livres, nem o aumento da lipólise induzido pelo jejum ou pela adição de agente lipolítico como a noradrenalina.

Lefebvre *et al.* (1973) confirmaram os achados de Cantu e Goodman sobre o efeito da desnervação na lipólise basal no RETRO, além de constatarem que a estimulação desse processo pelo glucagon também não era afetada pela simpatectomia cirúrgica. Verificaram por outro lado, que a captação de glicose pelo RETRO *in vitro*, tanto em condições basais como sob estimulação com glucagon, estava aumentada no tecido desnervado. Observaram ainda que a desnervação não afetava o aumento da mobilização de glicerol induzido pelo hormônio, mas reduzia a mobilização de AGL. Estas observações levaram os autores a concluir, que o aumento do peso do tecido era devido a um aumento da velocidade de reesterificação dos AG resultantes da hidrólise dos TAG endógenos (LEFEBVRE *et al.*, 1973).

Estudos conduzidos por Cousin *et al.* (1993), mostraram que a expressão de GLUT4, a captação *in vitro* e *in vivo* de glicose, a atividade de enzimas da via de



---

síntese de AG, da lipase lipoprotéica e da lipase hormônio-sensível, não foram afetadas pela desnervação. Esses autores confirmaram ainda os resultados negativos obtidos por Cantu e Goodman (em seus experimentos com lipólise basal e estimulada pela noradrenalina). O único efeito da desnervação observado por esses autores foi um aumento da diferenciação e da proliferação de pré-adipócitos do RETRO (COUSIN *et al.*, 1993).

A grande maioria dos trabalhos que tratam dos efeitos da desnervação sobre o metabolismo lipídico no tecido adiposo branco foi realizada no RETRO, sendo raros os relatos na literatura sobre os efeitos da desnervação simpática no EPI.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a importância do sistema nervoso simpático no metabolismo lipídico, principalmente nas vias de geração de G3P no EPI, em animais submetidos a situações experimentais que apresentam aumento ou diminuição da atividade simpática, bem como alterações quantitativas no armazenamento de TAG.

***Objetivos***

---

## 2. Objetivos

O principal interesse deste trabalho é contribuir para o esclarecimento do papel do sistema nervoso simpático (SNS) no controle das vias de geração de glicerol-3-fosfato (G3P), no tecido adiposo branco epididimal (EPI) em ratos submetidos a diferentes situações experimentais.

Os *objetivos específicos* deste trabalho foram os seguintes:

1) Investigar o efeito da desnervação simpática no EPI em situações experimentais em que o armazenamento de TAG no TAB e os níveis de insulina encontram-se reduzidos (como no jejum de 48 horas, diabetes mellitus e nos animais alimentados com a dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP)) e em situação em que o armazenamento de TAG no TAB e os níveis de insulina encontram-se aumentados (como nos animais alimentados com a dieta hipercalórica, hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL)):

- ✓ no conteúdo de noradrenalina tecidual;
- ✓ no peso do tecido;
- ✓ em processos metabólicos envolvidos na síntese do glicerol-3-

fosfato e armazenamento de TAG:

- índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo*, com exceção do grupo diabetes que foi realizado *in vitro*;
- velocidade de incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato na fração glicerol de triacilgliceróis *in vitro*;
- atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da atividade da gliceroquinase (GyK);

---

Foram realizados experimentos adicionais no grupo de ratos jejuados para verificar o efeito da desnervação simpática:

- ✓ na lipólise do EPI e do RETRO;

Tanto nos animais jejuados como nos ratos diabéticos foram avaliados os efeitos da desnervação também no tecido adiposo retroperitoneal, que ainda não havia sido investigado:

- no índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vitro*;
- na atividade da gliceroquinase (GyK);

Foi realizado também um experimento adicional para investigar o papel da dieta HP:

- ✓ na velocidade de renovação de noradrenalina;

## ***Materials e Métodos***

---

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Animais e seu Tratamento

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos durante o período de tratamento com as dietas, individualmente ou aos pares, em ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura de  $25\pm 2$  °C no Biotério do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os experimentos foram conduzidos sempre entre 8 e 10 horas da manhã e os animais pesavam entre 210-230g.

Foram utilizados animais submetidos à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), animais submetidos à dieta balanceada (N), animais submetidos à dieta comercial para roedores (NUVILAB CR1-NUVITAL<sup>®</sup>) e animais submetidos à dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) do tipo cafeteria. A dieta cafeteria constava de dieta comercial (NUVILAB CR1-NUVITAL<sup>®</sup>) suplementada com diversos ingredientes palatáveis. Os animais jejuados e diabéticos, assim como os animais controles do grupo HCHL foram mantidos sob dieta comercial. Todos os animais receberam água e alimento *ad libitum* até o momento da avaliação, com exceção dos animais jejuados que foram privados de alimento nas últimas 48 horas que precederam os experimentos.

Os animais diabéticos foram obtidos pela administração de estreptozotocina em tampão citrato 0,01M, pH 4,5, pela veia jugular, na dose de 45mg/Kg de peso, após jejum de 14 horas. A reposição do alimento foi realizada 2 horas após a administração de STZ. Apenas animais que apresentaram valores glicêmicos

maiores de 350 mg/dL foram utilizados nos experimentos 3 dias após a indução do diabetes.

As dietas N e HP, cujas composições estão apresentadas na Tabela I, eram dietas purificadas, aproximadamente isocalóricas e elaboradas no próprio Laboratório. A dieta N continha 66% de carboidratos, 16% de proteínas e 8% de lipídios e a dieta HP continha 70% de proteínas e 8% de lipídios, sem carboidratos. Nos experimentos com a dieta HP e N, os pesos iniciais dos animais foram de 120 e 100g respectivamente, e os mesmos foram mantidos na suas respectivas dietas por 15 dias.

Nos experimentos com animais submetidos à dieta HCHL por 21 dias, os ratos apresentavam peso inicial de 50 a 60g. Os animais controles deste grupo receberam somente a dieta comercial por igual período. A suplementação diária da dieta comercial dos animais HCHL constava de quatro ingredientes diferentes, entre doze itens previamente selecionados (Tabela IV). Assim estes animais recebiam 3 combinações de alimentos, no primeiro dia era oferecida a dieta 1: Bis, Torrada, Torrone, Snacks e dieta comercial, no segundo dia era oferecida a dieta 2: Chocolate, Batata frita, Chococky, Castanha do Pará e dieta comercial, no terceiro dia era oferecida a dieta 3: Bolacha Maizena, Pé de Moleque, Bala de Caramelo, Bacon e dieta comercial, no quarto dia reiniciávamos com a dieta 1. Todos os ingredientes da dieta apresentavam densidade calórica superior à da dieta comercial (ROTHWELL *et al.*, 1982). A água oferecida a este grupo foi acrescida de sacarose 20%.

**Tabela I – Composição básica das dietas: dieta balanceada (N) e dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP).**

<b>Componentes (em gramas)</b>	<b>N</b>	<b>HP</b>
Caseína*	20	86
Sacarose	33	---
Amido	33	---
Óleo de milho	8	8
Mistura salina <sup>#</sup>	5	5
Mistura de vitaminas <sup>*</sup>	1	1

\*82% de proteínas e 8% de umidade; <sup>#</sup> os componentes da mistura salina estão descritos na tabela II; <sup>\*</sup> os componentes da mistura de vitaminas estão descritos na tabela III.



**Tabela II – Composição da mistura salina (em gramas) nas dietas N e HP.**

<b>Sais</b>	<b>Gramas</b>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	389,0
$\text{CaCO}_3$	381,4
$\text{NaCl}$	139,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	57,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,01
$\text{KI}$	0,790
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,548
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,477
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,023
<b>Total</b>	<b>1000</b>

**Tabela III – Composição da mistura de vitaminas acrescida nas dietas N e HP.**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Vitamina A	200 UI
Vitamina E	1UI
Vitamina D	20UI
Colina	20,0g
Ácido-p-aminobenzóico	1,0g
Inositol	1,0g
Niacina	0,4g
Pantotenato de cálcio	0,4g
Riboflavina	0,08g
Tiamina	0,05g
Piridoxina	0,005g
Menadiona	0,05g
Ácido fólico	0,02g
Biotina	0,004g
Vitamina B12	0,003g
Dextrose q.s.p.	100g

As informações sobre a composição de macronutrientes e a densidade calórica de cada um dos itens do suplemento alimentar oferecido aos animais alimentados com a dieta HCHL foram obtidas no rótulo das embalagens dos respectivos alimentos. As informações da ração comercial Nuvital<sup>®</sup> foram fornecidas pelo produtor. Estas informações são apresentadas na Tabela IV. Contudo,

resumidamente a dieta controle contém 19% de proteínas, 54% de carboidratos e 2,7% de lipídios e a dieta HCHL contém 15% de proteínas, 64% de carboidratos e 9% de lipídios.

**Tabela IV - Distribuição dos macronutrientes e densidade calórica dos alimentos oferecidos aos animais alimentados com a dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL)**

	<b>Carboidrato (g/100g)</b>	<b>Lipídio (g/100g)</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Densidade Calórica (kcal/g)</b>
<b>Bala de Caramelo</b>	72,70	9,09	18,18	4,45
<b>Bacon</b>	00,00	58,00	9,00	5,69
<b>Batata Frita</b>	45,00	35,00	5,00	5,15
<b>Bis<sup>®</sup></b>	63,10	23,30	8,10	4,95
<b>Bolacha Maizena</b>	62,50	12,50	7,50	4,02
<b>Castanha-do-Pará</b>	7,00	67,00	17,00	6,99
<b>Chocolate</b>	50,00	33,30	10,00	5,40
<b>Chocooky<sup>®</sup></b>	63,33	23,33	3,33	5,00
<b>Pé de Moleque</b>	58,82	26,47	11,76	5,29
<b>Snacks<sup>®</sup></b>	65,00	17,50	7,50	4,50
<b>Torrada</b>	73,33	6,67	13,33	4,00
<b>Torrone</b>	80,00	7,50	10,00	3,80
<b>Ração Nuvital<sup>®</sup></b>	55,00	4,50	22,00	2,85

Os ratos do grupo *cafeteria* receberam água *ad libitum* acrescida de sacarose 20%.

### **3.1.1 Desnervação simpática unilateral do EPI**

A desnervação simpática unilateral do EPI foi realizada quimicamente em animais anestesiados com éter etílico, através de uma incisão lateral na parede abdominal inferior. O testículo esquerdo foi retirado do saco escrotal, externalizado da cavidade abdominal e colocado sobre uma gaze embebida em salina 0.9%, facilitando assim, a visualização da veia que irriga o tecido e percorre caminho similar à inervação simpática. A veia foi cuidadosamente dissecada e uma solução aquosa de Fenol 95% foi aplicada ao seu redor na região entre o tecido adiposo e o testículo. O EPI do lado direito foi mantido intacto e utilizado como controle. A cirurgia foi realizada 7 dias antes da avaliação experimental.

### **3.1.2 Desnervação simpática unilateral RETRO**

A desnervação simpática unilateral do RETRO foi realizada cirurgicamente, em animais anestesiados com éter etílico, através de incisão ventral na parede abdominal seguido de afastamento do rim e órgãos adjacentes para melhor visualização dos nervos que chegam ao RETRO esquerdo. Estes foram seccionados antes e depois de atravessarem o tecido e a porção intermediária foi removida (modificado de CANTU & GOODMAN, 1967). O tecido retroperitoneal direito foi mantido intacto e utilizado como controle. A cirurgia foi realizada 7 dias antes das avaliações experimentais.

## **3.2 Determinação da eficiência da desnervação simpática: medida da concentração de noradrenalina nos tecidos**

O EPI retirado dos animais foi homogeneizado em ácido perclórico 1,72% contendo metabissulfito de sódio 1% e EDTA 0,04%. O homogenado foi centrifugado

sob refrigeração a 6000 g durante 10 minutos e o sobrenadante transferido para um outro tubo, contendo tampão Tris 24,2% (pH 8,9), 0,5% de metabissulfito de sódio, 2,5% de EDTA, 50 mg alumina previamente ativada a 100°C durante 30 minutos e diidroxibenzilamina (padrão interno). As amostras foram agitadas durante 20 minutos, centrifugadas e após aspiração do sobrenadante, a alumina foi lavada repetidamente com uma solução contendo EDTA 0,004%, metabissulfito de sódio 0,02% e Tris 0,06%. As catecolaminas foram eluídas da alumina pela adição de solução contendo ácido perclórico 0,86N, metabissulfito de sódio 0,019% e EDTA-Na<sub>2</sub> 0,02%, por meio de agitação por 10 minutos (KRSTULOVIC, 1982). O conteúdo de noradrenalina foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em um cromatógrafo modelo LC-7A, equipado com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-II (Sigma-Aldrich), acoplado a um detector eletroquímico modelo L-ESD-6A e um polígrafo modelo C-R5A, todos da marca Shimadzu.

### 3.3 Velocidade de renovação de noradrenalina

A velocidade de renovação de noradrenalina foi determinada no EPI de ratos alimentados com a dieta N e HP. O método se baseia na determinação da queda na concentração de noradrenalina no tecido, após administração de  $\alpha$ -metil-éster-tirosina dissolvida em salina (300mg. Kg<sup>-1</sup>, i.p. Sigma<sup>®</sup> Chemical). Esta substância inibe a tirosina hidroxilase, primeira enzima da via de formação de noradrenalina, bloqueando a sua síntese. Para o cálculo da velocidade foram determinadas as concentrações de noradrenalina no tecido epididimal de ratos que não receberam  $\alpha$ -metil-éster-tirosina (grupo 0) e em tecidos de animais após 6 e 12 horas da sua administração (grupo 6 e grupo 12 horas). Os animais do grupo 12 horas receberam uma segunda dose da droga (150 mg. Kg de peso<sup>-1</sup>), 6 horas após a administração da primeira dose.

A concentração de noradrenalina tecidual foi avaliada segundo método descrito em 3.2.

A velocidade de renovação (VR) da noradrenalina é o produto da concentração de noradrenalina no tempo 0  $[NOR_0]$  pela velocidade de renovação fracional ( $k$ ):

$$VR = k \cdot [NOR_0]$$

Após o bloqueio da síntese pela  $\alpha$ -metil tirosina, o declínio na concentração de noradrenalina foi dado pela seguinte equação:

$$[NOR] = [NOR_0] e^{-kt}$$

O valor de  $k$  foi determinado pelo cálculo da regressão linear dos logaritmos naturais da concentração de noradrenalina *versus* o tempo (COSTA *et al.*, 1966).

O intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina foi determinado da seguinte maneira:

a) o intervalo de confiança do valor médio da velocidade de renovação fracional ( $k$ ) e da concentração de noradrenalina no tempo 0  $[NOR_0]$  foi estabelecido utilizando o erro padrão da média de cada um dos fatores;

b) Os limites inferiores da velocidade de  $k$  e da  $[NOR_0]$  foram multiplicados para determinação do limite inferior do intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina.

c) Os limites superiores de  $k$  e da  $[NOR_0]$  foram multiplicados para determinação do limite superior do intervalo de 95% de confiança da velocidade de renovação (VR) da noradrenalina.

d) O  $t_{1/2}$ , tempo em que a concentração de noradrenalina cai à metade da inicial é calculado dividindo-se 0,693 pela inclinação da curva (K) (TAUBIN *et al.*, 1972).

### 3.4 Adipócitos isolados

Para isolamento dos adipócitos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, o RETRO ou EPI foi retirado até a obtenção de aproximadamente 5g de tecido. Após a fragmentação do tecido, os adipócitos foram isolados com colagenase (Worthington 128U/mg), de acordo com o método de Rodbell (1964). O tecido foi incubado em um tampão Krebs-Henseleit livre de cálcio, contendo 137mM de NaCl; 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,4mM de MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O; 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O; 0,4mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,4mM de KCl, acrescido de 1% de albumina bovina livre de ácidos graxos, 27mM de HEPES e 0,55mM de glicose, pH 7,4. A colagenase foi adicionada na proporção de 1,5 mg para 1,5 mL do tampão para cada grama de tecido. Após incubação de 60 minutos a 37°C, sob agitação constante, os adipócitos foram filtrados em meia de “nylon” e em seguida lavados repetidamente com tampão Krebs-Henseleit-Hepes sem glicose para remoção da colagenase. Os adipócitos foram separados do tampão por flotação. O número de células foi determinado por contagem em câmaras de Neubauer em microscópio.

### 3.5 Lipólise *in vitro* em adipócitos do RETRO e do EPI

Adipócitos foram incubados (~600.000 adipócitos por frasco) em tampão Krebs-Henseleit-Hepes pH 7,4, acrescido de 1% de albumina e 5 mM de glicose a 37°C, com exceção do grupo jejuado por 48 horas, no qual a concentração de glicose no meio foi de 2,5 mM. A lipólise foi interrompida após 1 hora submetendo o

tubo de reação a choque térmico (~ 2°C). A lipólise basal (não estimulada) foi estimada pela concentração de glicerol e de ácidos graxos livres liberados para o meio de incubação. As concentrações de glicerol e ácidos graxos livres foram determinadas por espectrofotometria modificada para leitura em placas de ELISA, utilizando o Kit enzimático comercial para glicerol Bioclin da Quibasa<sup>®</sup> e a concentração dos ácidos graxos livres foi determinada pelo Kit NEFA da Randox<sup>®</sup>.

### 3.6 Índice de captação de glicose *in vivo*

O índice de captação de glicose *in vivo* foi estimado usando a 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose, como descrito por Ferré *et al.* 1985, que se baseia no modelo descrito por Sokoloff *et al.* 1977. A 2-desoxiglicose é transportada para dentro das células pelos mesmos transportadores de glicose (BIDDER, 1968; BACHELARD *et al.* 1971; HORTON *et al.* 1973) e com ela compete pelo sítio ativo da hexoquinase, sendo posteriormente fosforilada a 2-desoxiglicose-6-fosfato, que, no entanto, não é isomerizada a frutose-6-fosfato pela fosfoglicoisomerase pela ausência do grupo hidroxil no segundo carbono (WICK *et al.* 1967; HORTON *et al.* 1973). O fato da 2-desoxiglicose-6-fosfato também não ser substrato da glicose-6-fosfato desidrogenase faz com que a quantificação de 2-desoxiglicose-6-fosfato nestes tecidos, possa ser utilizado como índice de captação de glicose. Este método não é utilizado em tecidos com atividade apreciável de glicose-6-fosfatase (como, por exemplo, o fígado) uma vez que a 2-desoxiglicose-6-fosfato pode ser defosforilada por esta enzima (SOLS *et al.* 1954; HORTON *et al.* 1973; FERRÉ *et al.* 1985).

Dose traço de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose (30 µCi dissolvidos em 0,5 mL de salina 0,9%) foi administrada através da veia jugular direita, em animais canulados (HARMS & OJEDA, 1974) dois dias antes do experimento e amostras de sangue



(0,2mL) foram coletadas nos tempos 1, 3, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Após a última coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

O plasma foi utilizado para a determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase e para a determinação da radioatividade da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose pela contagem de uma alíquota em espectrômetro de cintilação líquida. A atividade específica da glicose foi calculada em cada um dos tempos coletados e a porcentagem de queda da atividade específica *versus* tempo representada em gráfico (curva exponencial de 1ª ordem) para o cálculo da integral.

O método para a separação e posterior determinação do conteúdo de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose-6-fosfato no tecido se baseia na solubilidade da 2-desoxiglicose e da 2-desoxiglicose-6-fosfato em HClO<sub>4</sub> 6% e no reagente de Somogy (Ba(OH)<sub>2</sub>/ZnSO<sub>4</sub>). As duas substâncias são solúveis em HClO<sub>4</sub> 6% e somente a 2-desoxiglicose no reagente de Somogy. Assim sendo, a 2-desoxiglicose-6-fosfato é adsorvida e precipitada neste reagente (KIPNIS *et al.* 1959).

Após o sacrifício dos animais, os tecidos foram extraídos, pesados e lavados em solução fisiológica e colocados em tubos de polietileno contendo NaOH 1M. As amostras foram digeridas a 60°C e neutralizadas posteriormente com HCl 1M. Foram separadas duas alíquotas de cada homogenado. Em uma das alíquotas foi adicionado HClO<sub>4</sub> 6% e em outra, o Ba(OH)<sub>2</sub>/ZnSO<sub>4</sub>. As duas alíquotas foram centrifugadas a 1.500 g por 20 minutos e o sobrenadante separado para contagem da radioatividade. O conteúdo de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose-6-fosfato foi determinado pela diferença entre a contagem da radioatividade no sobrenadante proveniente da alíquota onde foi adicionado o HClO<sub>4</sub> 6% menos o sobrenadante proveniente da adição de Ba(OH)<sub>2</sub>/ZnSO<sub>4</sub>.

O índice de captação de glicose foi expresso em ng de glicose. mg de tecido<sup>-1</sup> . min<sup>-1</sup> e calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de captação de glicose} = \frac{2DG6P}{\int_1^{60} \frac{2DG}{\text{glicose}} \times dt}$$

Sendo que *2DG6P* refere-se à radioatividade da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose-6-fosfato,

corrigida por mg de tecido;  $\int_1^{60} \frac{2-DG}{\text{glicose}} \times dt$  refere-se à integral da atividade específica

da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose entre intervalo de 1 a 60 minutos.

### 3.7 Índice de captação de glicose *in vitro*

Os adipócitos foram incubados (~600.000 adipócitos por frasco) em tampão Krebs-Henseleit-Hepes pH 7,4, contendo 1% de albumina e acrescido de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose (0,5 µCi) e glicose 1mM (FOLEY, 1980). Após incubação de 3 minutos a 37° C sob agitação constante, a captação da hexose foi interrompida pela retirada de uma alíquota e colocada em um tubo de microcentrifuga contendo o óleo dinonilftalato (0,98 g/L). Como o óleo apresenta densidade intermediária entre as células e o meio de incubação, obteve-se após uma rápida centrifugação (30 segundos), uma solução trifásica; onde na parte inferior do tubo se encontrava o meio de incubação contendo a 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose não captada pelos adipócitos, na fase intermediária o óleo e na fase superior os adipócitos. O tubo foi cortado no meio da fase oleosa e a parte contendo os adipócitos foi dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade em cintilador Packard Tri-Carb 2100 TR.

### 3.8 Incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG)

Os adipócitos foram incubados (~600.000 adipócitos por frasco) em tampão Krebs-Henseleit-Hepes pH 7,4 sem glicose e contendo 1% de albumina, acrescido de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato (1 mM, 0.5 µCi). Após incubação de 1 hora à 37°C sob agitação constante, a incorporação foi interrompida por choque térmico (~ 2°C). As células foram lavadas com salina para retirar o restante de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato não utilizado pelas células e posteriormente colocadas em clorofórmio:metanol (2:1). A extração dos lipídios totais foi realizada conforme detalhado no item 3.9.

### 3.9 Extração dos lipídios totais

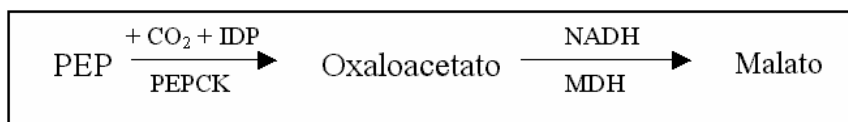
A extração dos lipídios totais foi realizada segundo o método de Folch *et al.* (1957). Após incubação e colocação das células em clorofórmio:metanol (2:1), as amostras foram mantidas em repouso. Após este período, a fase superior foi aspirada, deixando um pequeno filme que foi lavado 3 vezes com uma mistura semelhante a fase superior, preparada com clorofórmio, metanol e mistura salina na proporção 21,1:337:330 . A mistura salina continha CaCl<sub>2</sub> 0,04%; MgCl<sub>2</sub> 0,034% e NaCl 0,58%. Para determinação da incorporação do <sup>14</sup>C em lipídios totais, uma alíquota do extrato clorofórmico foi evaporado e o resíduo dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC). Para a determinação dos ácidos graxos uma alíquota do extrato clorofórmico foi evaporada e os lipídios saponificados com KOH etanólico (KOH saturada 14,5M : etanol (1:20)). Os tubos foram fechados com bolas de vidro e submetidos a aquecimento em banho-maria à temperatura de 70-80° C por duas horas. Após adição de água deionizada, os tubos foram mantidos à temperatura de 40-50°C até evaporação de todo o álcool. A seguir, o material saponificado foi lavado três vezes com éter de petróleo para a retirada dos lipídios

não saponificáveis. Posteriormente o material foi acidificado com ácido perclórico 6% e os ácidos graxos extraídos com éter de petróleo. Todo o material etéreo contendo os ácidos graxos foi evaporado e o resíduo dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade em cintilador Packard Tri-Carb 2100 TR. A incorporação de  $^{14}\text{C}$  em glicerol foi determinada pela diferença entre a incorporação em lipídios totais e a incorporação em ácidos graxos.

### 3.10 Medida das atividades enzimáticas

#### 3.10.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

O tecido foi homogeneizado em tampão contendo sacarose 0,2M, trietanolamina 20mM, 2- $\beta$ -mercaptoetanol 5mM e EDTA 1mM (pH 7,5). O homogenado foi centrifugado a 10.000g durante 10 minutos à 4° C. A camada lipídica superior foi descartada e o sobrenadante novamente centrifugado a 100.000g (4° C) durante 30 minutos para obtenção da fração citosólica. A atividade da enzima foi determinada pela formação do malato, conforme descrito por Ballard & Hanson, 1967:



O meio de reação, contendo tampão imidazol pH 6,6 (100 $\mu\text{mol}$ );  $\text{MnCl}_2$  (2 $\mu\text{mol}$ ); GSH (1 $\mu\text{mol}$ ); IDP (1,25 $\mu\text{mol}$ ); NADH (2,5 $\mu\text{mol}$ ); PEP (1,5 $\mu\text{mol}$ ); MDH (2U);  $\text{KHCO}_3$  (50 $\mu\text{mol}$ ) e  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (2  $\mu\text{Ci}$ ), e os homogenados foram pré-incubados durante 5 minutos a 37° C. Os brancos da reação continham todos os componentes

da mistura com exceção do IDP. A reação foi iniciada pela adição do homogenado e interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% após 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000g, transferidas para tubos de cintilação contendo HCl 2N. Estes tubos foram colocados em dessecador até completa evaporação do líquido. O malato formado foi dissolvido em água e, posteriormente, adicionado líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade. O resultado foi expresso por nmol. mg de proteína<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>, sendo a dosagem protéica realizada pelo método BCA – Bicinchoninic acid – Pierce, USA (SMITH *et al.*,1985).

### 3.10.2 Gliceroquinase (GyK)

Os tecidos foram homogeneizados em tampão contendo KCl 1% e EDTA 1mM. Os homogenados foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. A atividade da enzima foi determinada conforme descrito por Newsholme *et al.* (1967). A mistura da reação continha ATP 6mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, EDTA 1mM, NaF 25mM, 2-β-mercaptoetanol 20mM, TRIS 100mM pH 7,5, albumina 1%, glicerol-U-<sup>14</sup>C 1mM (1μCi/tubo), fosfocreatina 10mM e creatina quinase (26,4U/mL). O infranadante e a mistura de reação foram pré-incubados à 37° C durante 5 minutos. O ensaio foi iniciado pela adição do homogenado à mistura de reação sendo interrompido após 30 minutos pela adição de etanol 98%. Nos tubos “brancos” o etanol foi colocado antes do homogenado. A separação do glicerol-<sup>14</sup>C do glicerofosfato-<sup>14</sup>C foi realizada por cromatografia de papel ascendente, aplicando-se o sobrenadante da mistura de reação em papel de cromatografia Whatman nº 1, utilizando como solvente etanol : amônia : água (80:4:16). Após o solvente atingir a marca de 30 cm, o papel foi recortado na faixa da origem até 5 cm acima deste ponto e colocado em

---

liquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade em cintilador Packard Tri-Carb 2100 TR. Neste sistema, o glicerol não fosforilado move-se à frente do solvente e o glicerofosfato-<sup>14</sup>C se mantem próximo à origem. O resultado foi expresso em nmol.mg de proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry *et al.*, 1951.

### **3.11 Tratamento estatístico dos resultados**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste Two Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls e/ou test *t* de Student, com  $P < 0,05$  para nível de significância.

***Resultados***

---

#### 4. Resultados

Após a apresentação dos dados que mostram a eficiência da técnica da desnervação do EPI utilizada ao longo deste trabalho, são apresentados os resultados dos parâmetros gerais e sobre as vias de geração de G3P nas diferentes situações experimentais, na seguinte ordem: jejum, animais diabéticos, animais adaptados à dieta hiperprotéica (HP) e por último, os dados obtidos nos animais submetidos à dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCLC). Para finalizar apresentamos um resumo dos resultados dos parâmetros de avaliação das 3 vias de geração de G3P de maneira conjunta, nas situações experimentais estudadas e frente à desnervação. Os parâmetros utilizados para avaliar a formação de G3P pelas diferentes vias foram: a) Índice de captação da glicose *in vivo* e/ou *in vitro* para avaliar a via de síntese a partir da glicose; b) Incorporação de piruvato em glicerol de TAG *in vitro* e atividade da PEPCK para avaliar a via da gliceroneogênese; c) Atividade da gliceroquinase para avaliar a via de fosforilação do glicerol.

Alguns dados do RETRO, aqui apresentados, foram transcritos da nossa dissertação de mestrado concluída em 2005, que teve como objetivo investigar o papel do sistema nervoso simpático na *via* de formação de glicerol 3P a partir de glicose e da via gliceroneogênica. Os parâmetros avaliados à época foram: o índice de captação de glicose *in vivo*, a incorporação de piruvato em glicerol de TAG, a atividade da PEPCK e o peso do tecido. Estes dados, obtidos em ratos, utilizando o jejum e o diabetes como situações experimentais, são apresentados na forma de gráfico, identificados nas figuras por linha tracejada, ao lado dos resultados obtidos no EPI, com o objetivo de comparar as respostas do EPI e RETRO frente a estas situações metabólicas.



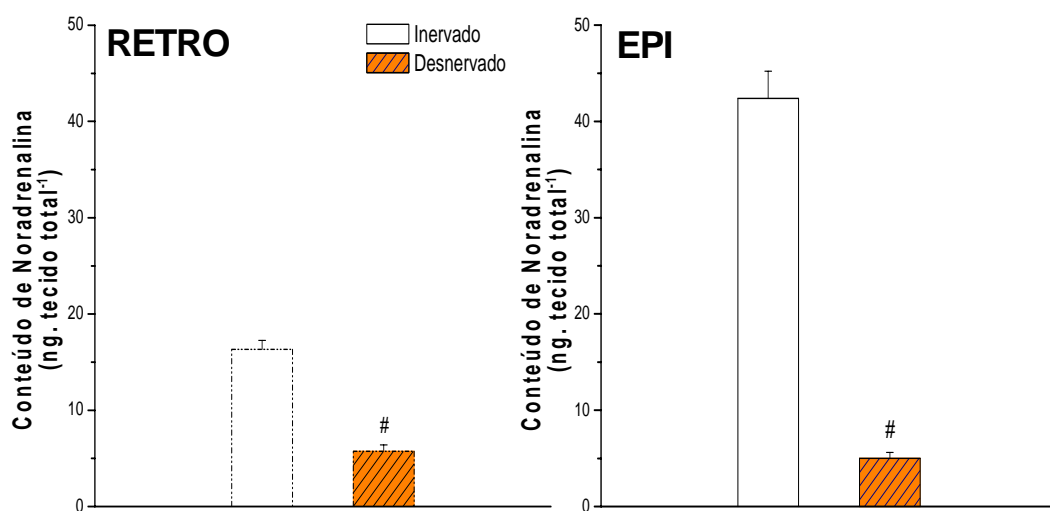
#### 4.1 Eficiência da desnervação simpática

A eficiência da desnervação simpática foi avaliada pela medida do conteúdo de noradrenalina tecidual. A desnervação química no EPI reduziu 88% o conteúdo desta catecolamina em animais alimentados, quando comparado ao tecido inervado contralateral (Tabela V e Figura 02). O conteúdo de noradrenalina no lado cirurgicamente desnervado do RETRO em animais alimentados foi reduzido em torno de 66% em relação ao lado inervado (Tabela V e Figura 02).

**Tabela V** - Conteúdo de noradrenalina (ng. tecido total<sup>-1</sup>) nos tecidos adiposos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RETRO), inervado e desnervado, de ratos normalmente alimentados.

	Inervado	Desnervado
<b>EPI</b>	42,40 ± 2,82	5,01 ± 0,63 <sup>#</sup>
<b>RETRO</b>	16,33 ± 0,92	5,72 ± 0,69 <sup>#</sup>

Os valores de cada grupo representam a média ± erro padrão de 10 animais.  
<sup>#</sup>P<0,05 em relação ao tecido inervado. Os dados do *RETRO* foram obtidos no mestrado.



**Figura 02** – Efeito da desnervação simpática no conteúdo de noradrenalina dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI) de ratos normalmente alimentados. As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 10 amostras. <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao tecido inervado.

## 4.2 Efeito do jejum

Os dados obtidos neste trabalho na situação de jejum foram:

- No tecido adiposo epididimal
  - Peso;
  - Lipólise (EPI e RETRO);
  - Índice de captação de glicose *in vivo*;
  - Índice de captação de glicose *in vitro* (EPI e RETRO);
  - incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG;
  - Atividade da PEPCK;
  - Atividade da GyK (EPI e RETRO);

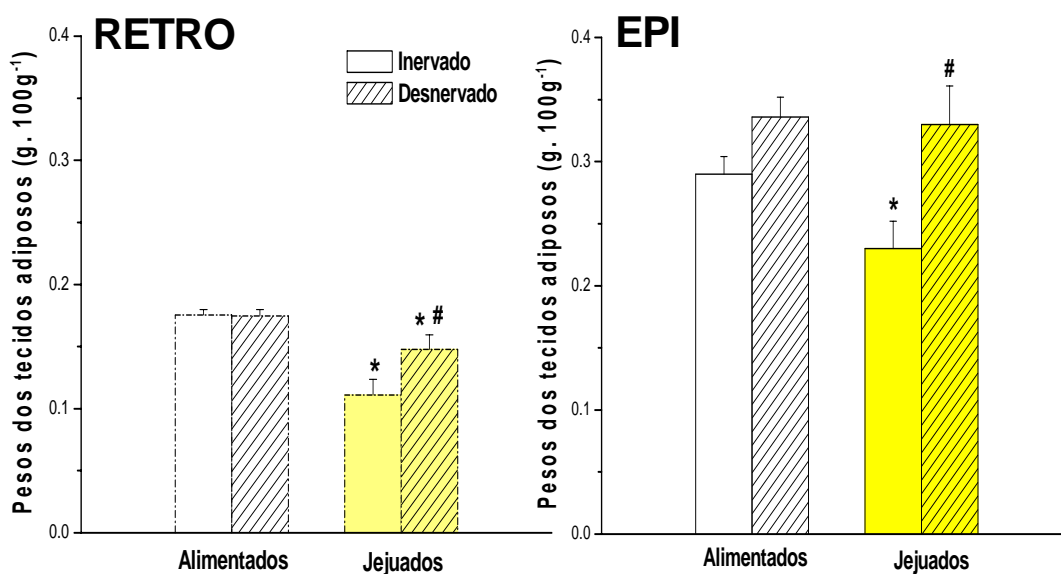
### 4.2.1 Peso do tecido adiposo epididimal

O peso do EPI (g/100g de peso corporal) foi reduzido com o jejum de 48h. A desnervação diminuiu essa perda, embora não tenha alterado o peso do tecido nos animais alimentados (Tabela VI e Figura 03). Resposta semelhante ao jejum e à desnervação foi obtida no RETRO (Figura 03), embora proporcionalmente o efeito da desnervação no jejum foi mais intenso no EPI (43%) do que no RETRO (30%).

**Tabela VI** – Peso (g. 100g<sup>-1</sup>) do tecido adiposo branco epididimal, innervado e desnervado, de ratos alimentados e ratos submetidos ao jejum de 48horas.

	Inervado	Desnervado
<b>Alimentados</b>	0,294 ± 0,01	0,34 ± 0,02
<b>Jejuados</b>	0,23 ± 0,02 *	0,33 ± 0,03 #

Os valores de cada grupo representam a média ± erro padrão de 12 amostras.  
 \*  $P < 0,05$  em relação ao alimentado. #  $P < 0,05$  em relação ao innervado.



**Figura 03** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática sobre o peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

#### **4.2.2 Lipólise *in vitro* no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal**

A avaliação da lipólise *in vitro* foi realizada pela determinação do glicerol e ácidos graxos livres, liberados pelos adipócitos no meio de incubação.

Como podemos constatar, tanto a liberação de ácidos graxos como a de glicerol pelos adipócitos do EPI e do RETRO de animais em jejum aumentou em relação aos adipócitos de animais controles (Figuras 04 e 05). No meio de incubação contendo adipócitos do EPI de animais jejuados, foi observado um aumento de 53% na liberação de glicerol e de 173% na liberação de AG; enquanto no meio de incubação contendo adipócitos do RETRO de animais jejuados foi constatado um aumento de aproximadamente 30% na liberação de glicerol e de 126% na liberação de AG em relação à liberação dos adipócitos provenientes dos animais alimentados.

A desnervação induziu uma redução na liberação de glicerol e de AGs no RETRO tanto nos animais alimentados como nos animais jejuados (Tabelas VII e VIII; Figuras 04 e 05). A desnervação não causou alteração na liberação de AG e glicerol no EPI tanto de ratos alimentados como jejuados (Tabelas VII e VIII; Figuras 04 e 05).

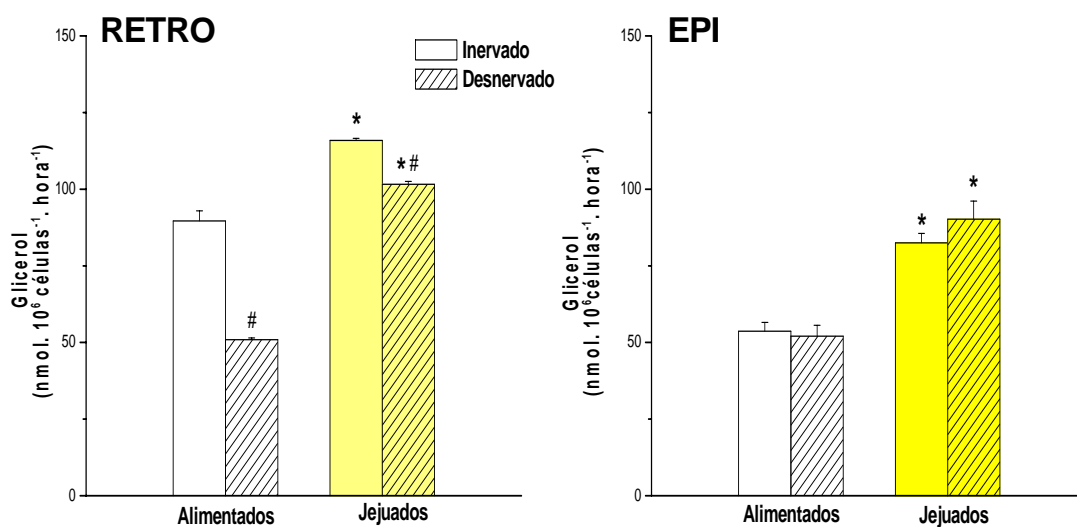
**Tabela VII** – Glicerol liberado no meio de incubação, por adipócitos isolados (nmol de glicerol.  $10^6$  células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>) do tecido adiposo branco retroperitoneal e do tecido adiposo branco epididimal, inervado e desnervado, de ratos alimentados e de ratos submetidos ao jejum de 48 horas.

<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	89,60 ± 0,33	50,86 ± 0,60 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	115,90 ± 0,70 *	101,60 ± 3,50 * <sup>#</sup>

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	53,69 ± 2,80	52,04 ± 3,58
<b>Jejuados</b>	82,45 ± 3,16 *	90,22 ± 5,88 *

Os valores representam média ± erro padrão de 6 amostras. \* $P < 0,05$  em ao alimentado. <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao inervado.



**Figura 04** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática na liberação de glicerol no meio de incubação por adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 6 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

**Tabela VIII** – Ácidos graxos livres liberados no meio de incubação (nmol de ácido graxo livre.  $10^6$  células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>) por adipócitos isolados dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, inervado e desnervado, de ratos alimentados e ratos submetidos ao jejum de 48 horas.

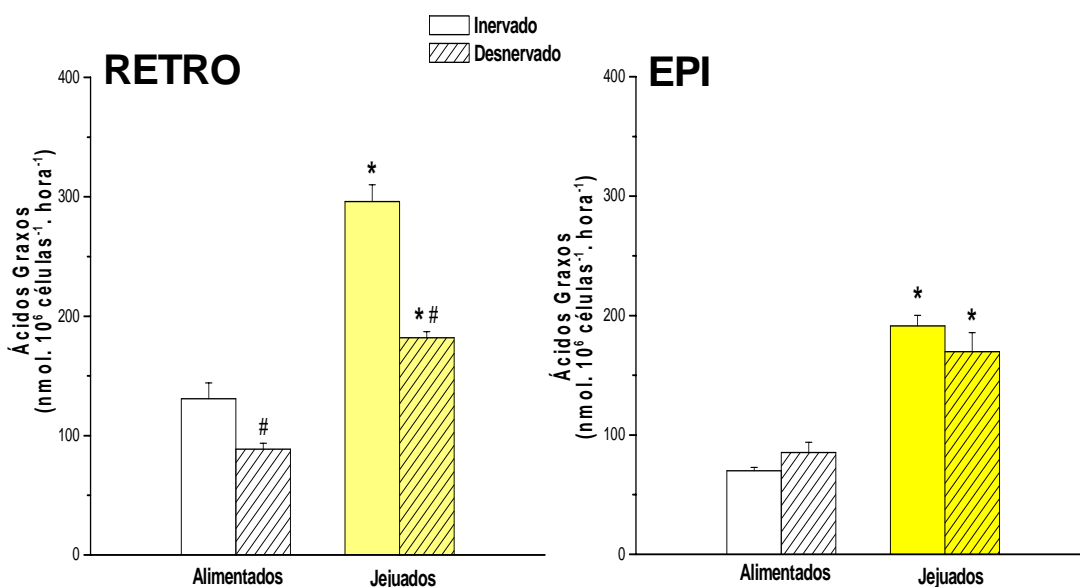
<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	130,92 ± 13,30	88,80 ± 4,80 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	295,98 ± 14,20 *	182,02 ± 5,01 * <sup>#</sup>

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	70,05 ± 2,61	85,29 ± 8,68
<b>Jejuados</b>	191,40 ± 8,80 *	169,70 ± 15,93 *

Os valores representam média ± erro padrão de 6 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao inervado.





**Figura 05** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática na liberação de ácidos graxos no meio de incubação por adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 6 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. # $P < 0,05$  em relação ao inervado

#### 4.2.3. Índice de captação de glicose *in vivo* no tecido adiposo epididimal

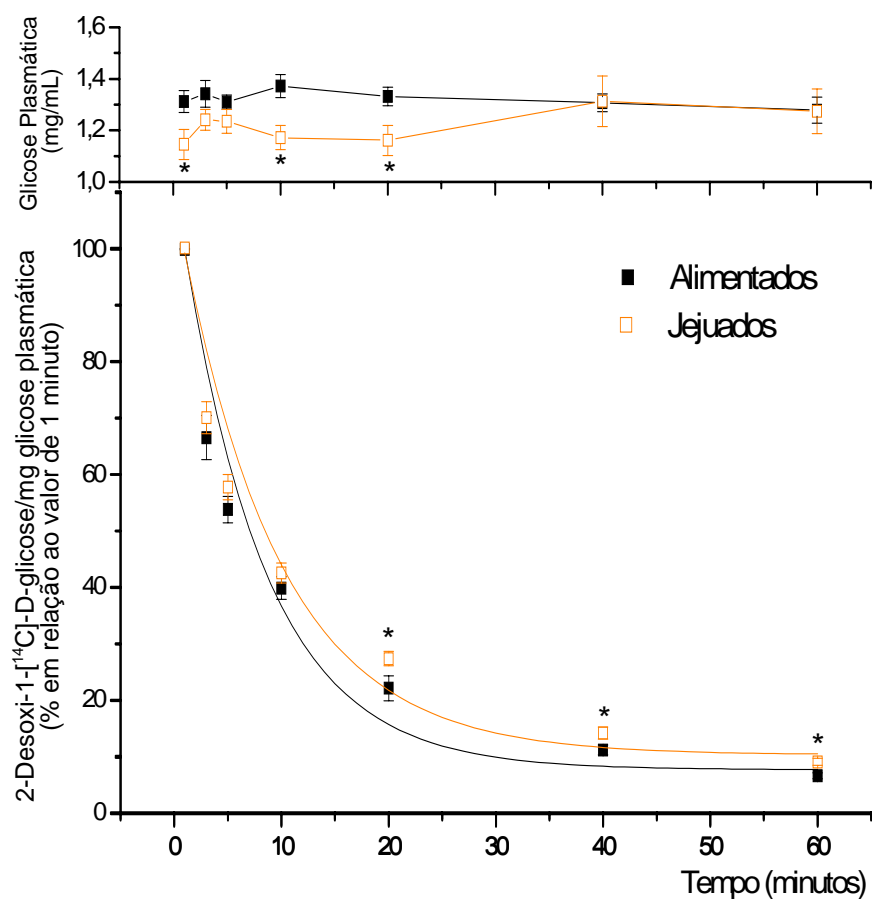
Os ratos em jejum apresentaram no tempo de 1 minuto uma menor glicemia como esperado, contudo as curvas glicêmicas dos animais alimentados e submetidos ao jejum não sofreram grandes alterações (Figura 06). O índice de captação de glicose no EPI foi cerca de 30% menor nos animais jejuados (Tabela IX). Resultados obtidos anteriormente mostraram também uma redução na captação de glicose no RETRO de animais submetidos ao jejum de 48 horas, embora esta redução tenha ocorrido em maior percentagem do que no EPI (Figura 07).

A desnervação não alterou a captação de glicose no EPI em nenhuma das condições estudadas, enquanto no RETRO, conforme observado em estudos anteriores, a desnervação aumentou a captação de glicose tanto nos animais alimentados como nos animais submetidos ao jejum (Figura 07).

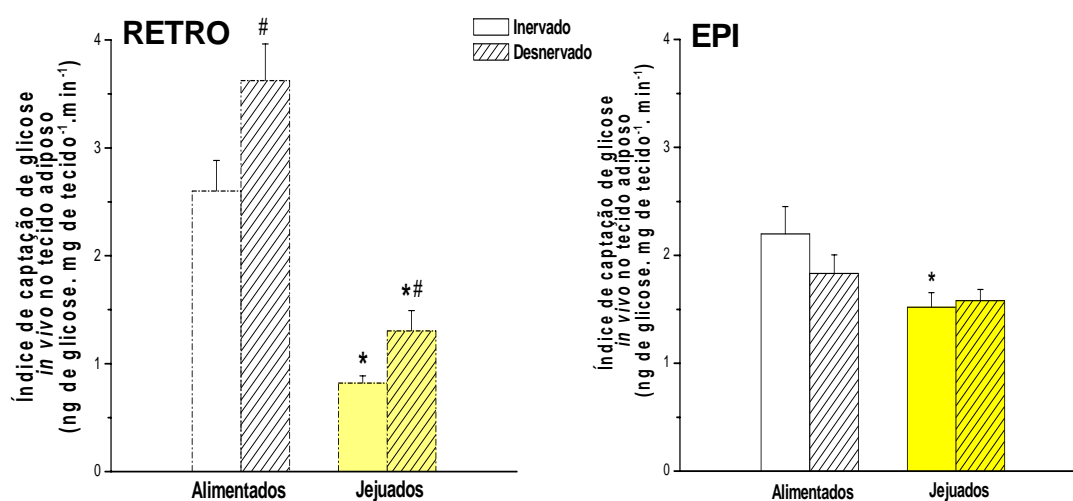
**Tabela IX** – Índice de captação de 2-desoxi-1- $^{14}\text{C}$ -D-glicose (ng de glicose. mg de tecido $^{-1}$ . min $^{-1}$ ) *in vivo* no tecido adiposo branco epididimal, innervado e desnervado, de animais alimentados e de animais submetidos ao jejum por 48 horas.

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	2,20 ± 0,25	1,83 ± 0,17
<b>Jejuados</b>	1,52 ± 0,13 *	1,58 ± 0,10

Os valores representam a média ± erro padrão de 10 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado.



**Figura 06** – Glicose plasmática e curva temporal da atividade específica da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose (% em relação ao valor de 1 min) em ratos controles e ratos submetidos ao jejum por 48 horas. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 10 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado.



**Figura 07** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática sobre o índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo* nos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam os valores de média ± erro padrão de 10 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

#### 4.2.4 Índice de captação de glicose *in vitro* no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal

Confirmando os achados *in vivo*, pudemos constatar que *in vitro*, houve uma redução no índice de captação de glicose nos adipócitos provenientes do EPI e do RETRO de animais submetidos ao jejum. O índice nos adipócitos provenientes do EPI contralateral desnervado não foi alterado quando comparado ao dos adipócitos provenientes do lado inervado. No entanto, embora tenhamos observado um aumento da captação de glicose *in vivo* no RETRO desnervado na situação de jejum e alimentado, não houve alteração na resposta *in vitro*, em adipócitos do tecido desnervado nas duas situações experimentais (Tabela X e Figura 08).

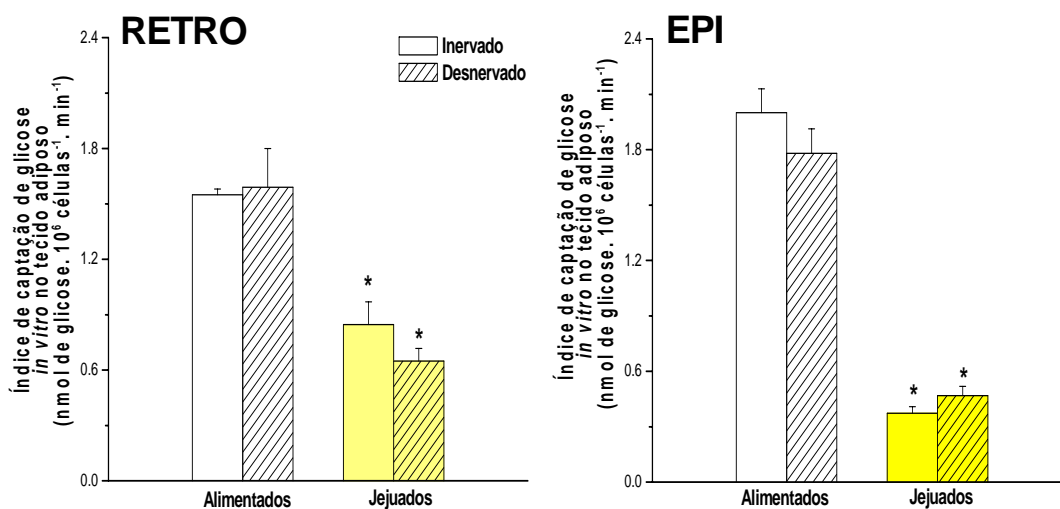
**Tabela X** – Índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose (nmol de glicose. 10<sup>6</sup> de células<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) *in vitro*, em adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, inervado e desnervado, de ratos alimentados e ratos submetidos ao jejum por 48 horas.

<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	1,55 ± 0,03	1,59 ± 0,21
<b>Jejuados</b>	0,85 ± 0,12 *	0,65 ± 0,07 *

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	2,00 ± 0,13	1,78 ± 0,13
<b>Jejuados</b>	0,37 ± 0,03 *	0,47 ± 0,05 *

Os valores representam a média ± erro padrão de 12 amostras de tecido retroperitoneal e 8 amostras de epididimal. \**P*<0,05 em relação ao alimentado.



**Figura 08** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática no índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vitro* nos adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 12 amostras de retroperitoneal e 8 amostras de epididimal. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado.

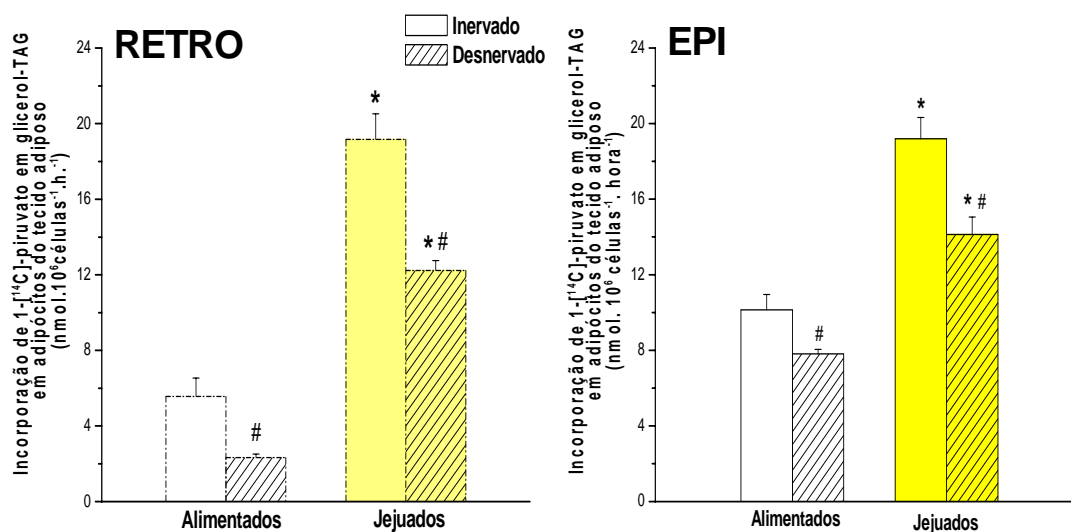
#### 4.2.5. Incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato na fração glicerol de TAG no tecido adiposo epididimal

A incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG aumentou em adipócitos do EPI de animais submetidos ao jejum. A desnervação reduziu a incorporação deste composto nos adipócitos de animais alimentados e jejuados. Os dados obtidos no mestrado (Figura 09) mostram que resultados semelhantes foram observados no RETRO. Comparando-se a incorporação de piruvato em glicerol nos animais alimentados nos dois tecidos, observamos que o EPI apresenta uma maior incorporação quando comparado ao RETRO (Tabela XI e Figura 09).

**Tabela XI** – Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (nmol [<sup>14</sup>C]-glicerol. 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>) em adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal, innervado e desnervado, de animais alimentados e de animais submetidos ao jejum por 48 horas.

	Innervado	Desnervado
<b>Alimentados</b>	10,15 ± 0,81	7,81 ± 0,24 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	19,19 ± 1,14 <sup>*</sup>	14,13 ± 0,93 <sup>* #</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão de 12 amostras. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao alimentado. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao innervado.



**Figura 09** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática na incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente a média ± erro padrão de 12 amostras. \*  $P < 0,05$  em relação ao alimentado. #  $P < 0,05$  em relação ao inervado.



#### 4.2.6 Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal

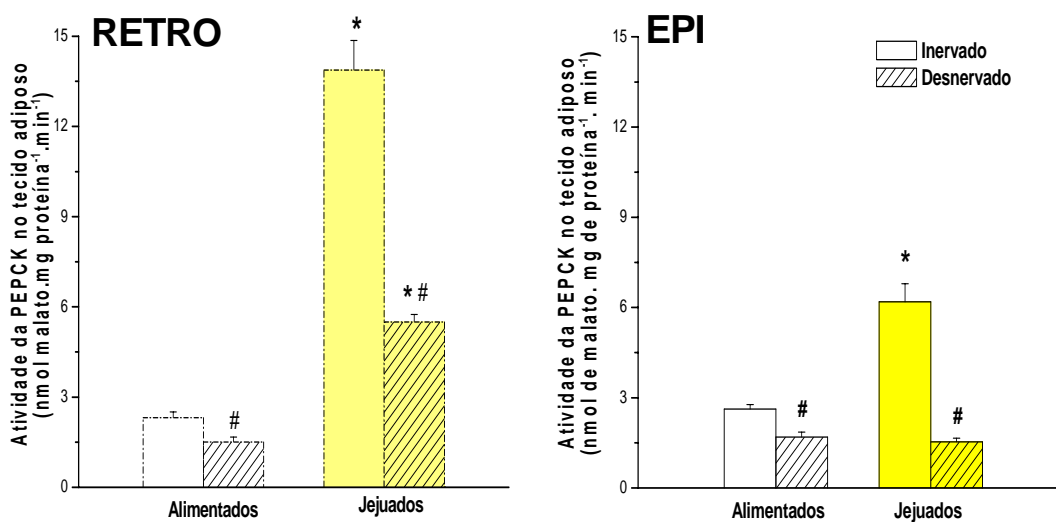
O jejum aumentou a atividade da PEPCK no EPI em relação aos animais alimentados. A desnervação reduziu a atividade da enzima nos animais alimentados e impediu o aumento da atividade da enzima observada no lado inervado de animais submetidos ao jejum. Resultados anteriores obtidos no RETRO (Figura 10), mostram um aumento de cerca de sete vezes na atividade da PEPCK na situação de jejum, bem maior que o aumento de cerca de 3 vezes observado no EPI. A desnervação reduziu a atividade desta enzima no RETRO nos dois grupos (Tabela XII e Figura 10).

Vale ressaltar que estes achados reforçam os dados já apresentados na tabela XI e figura 09, onde observamos um aumento na incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol-TAG no RETRO e EPI, na situação de jejum. Associação direta entre a incorporação de piruvato em glicerol de TAG e a atividade da PEPCK, foi observada também, com a desnervação.

**Tabela XII** - Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (nmol de malato. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo branco epididimal, inervado e desnervado, de animais alimentados e animais submetidos ao jejum de 48 horas.

	Inervado	Desnervado
<b>Alimentados</b>	2,62 ± 0,16	1,69 ± 0,17 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	6,19 ± 0,60 <sup>*</sup>	1,53 ± 0,13 <sup>#</sup>

Os valores representam média ± erro padrão de 12 amostras. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao alimentado. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao inervado.



**Figura 10** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática na atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente a média  $\pm$  erro padrão de 16 e 12 amostras respectivamente. \*  $P < 0,05$  em relação ao alimentado. #  $P < 0,05$  em relação ao inervado.

#### 4.2.7 Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal

O jejum reduziu a atividade da GyK no EPI e no RETRO. A desnervação causou uma diminuição na atividade desta enzima nos tecidos dos animais alimentados e uma redução adicional nos tecidos EPI e RETRO dos animais jejuados (Tabela XIII e Figura 11).

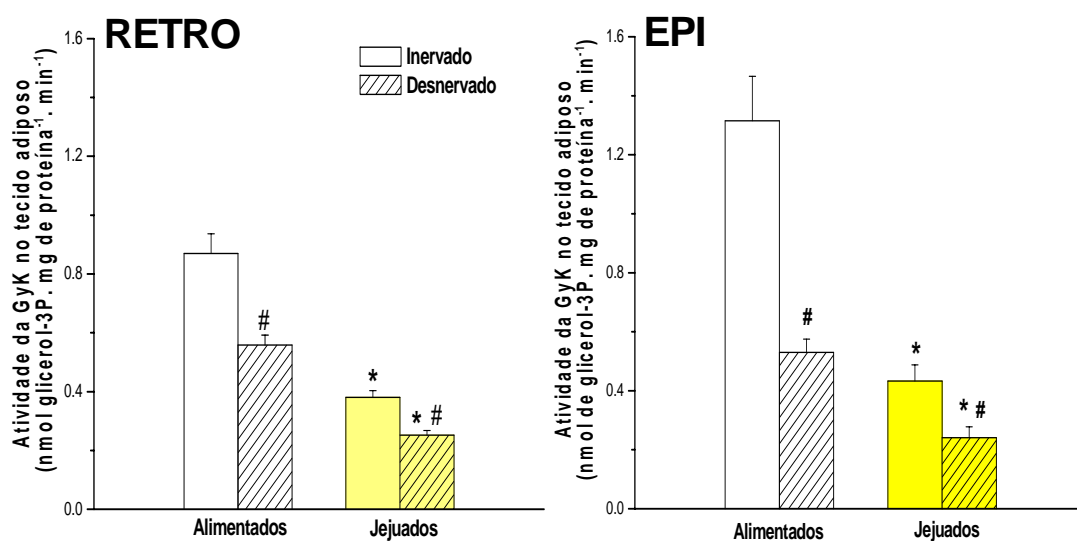
**Tabela XIII** - Atividade da gliceroquinase (nmol de glicerol-3P. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo retroperitoneal e no tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de animais alimentados e animais submetidos ao jejum de 48 horas.

<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	0,87 ± 0,07	0,56 ± 0,03 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	0,38 ± 0,02 <sup>*</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>* #</sup>

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Alimentados</b>	1,31 ± 0,15	0,53 ± 0,04 <sup>#</sup>
<b>Jejuados</b>	0,43 ± 0,05 <sup>*</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>* #</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão de 14 (RETRO) e 16 (EPI) amostras respectivamente. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao alimentado. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao innervado.



**Figura 11** – Efeito do jejum de 48 horas e da desnervação simpática na atividade da gliceroquinase (GyK) no tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente a média  $\pm$  erro padrão de 14 (RETRO) e 16 (EPI) amostras respectivamente. \* $P < 0,05$  em relação ao alimentado. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

### 4.3 Efeito do diabetes

Os dados obtidos neste trabalho, utilizando a situação experimental do diabetes, foram:

- No Tecido Adiposo Epididimal
  - Peso do tecido
  - Índice de captação de glicose *in vitro* (EPI e RETRO);
  - Velocidade de incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG;
  - Atividade da PEPCCK;
  - Atividade da gliceroquinase (GyK) (EPI e RETRO);

#### 4.3.1. Peso do tecido adiposo epididimal

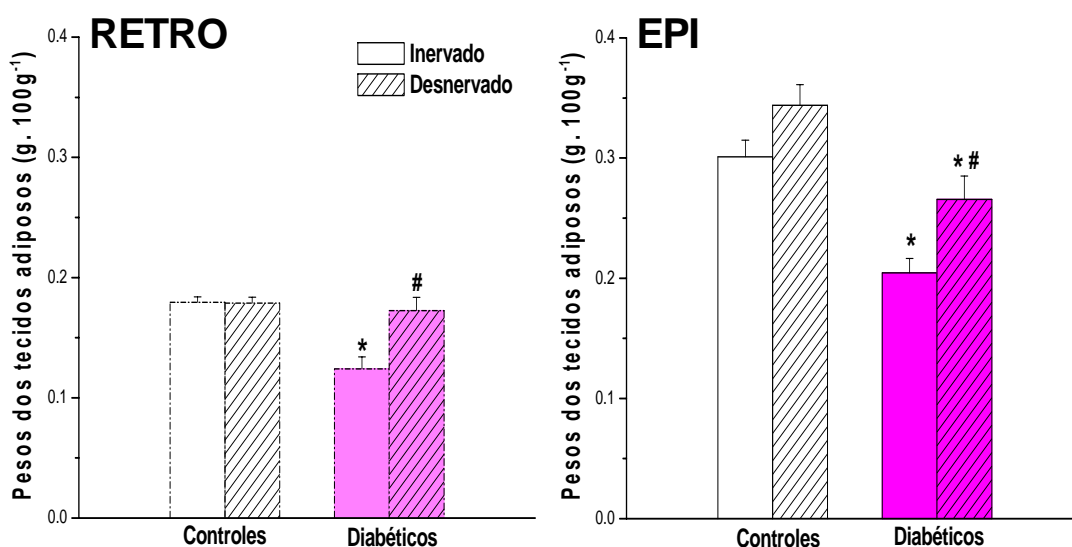
O diabetes reduziu em cerca de 30% o peso relativo do EPI. Nestes animais, a redução do peso do tecido provocada pelo diabetes foi parcialmente prevenida pela desnervação. Nos animais controles, a desnervação não causou alteração no peso do EPI (Tabela XIV e Figura 12).

Resultados anteriores obtidos no RETRO mostram resultados semelhantes aos observados no EPI, em relação ao efeito do diabetes e da desnervação sobre o peso relativo do tecido. O efeito da desnervação prevenindo a perda de peso provocado pelo estado diabético foi semelhante no RETRO e no EPI, 40% e 35% respectivamente (Figura 12).

**Tabela XIV** - Peso relativo do tecido adiposo branco epididimal ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), innervado e desnervado, de ratos controles e ratos diabéticos.

	Innervado	Desnervado
<b>Controles</b>	$0,30 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,02$
<b>Diabéticos</b>	$0,20 \pm 0,01$ *	$0,26 \pm 0,02$ * #

Os valores representam média  $\pm$  erro padrão de 14 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao innervado.



**Figura 12** – Efeito do diabetes e da desnervação simpática no peso do tecido adiposo retroperitoneal (RETRO) e tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 14 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao innervado.

#### 4.3.2. Índice de captação de glicose *in vitro* no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal

Os adipócitos do EPI e do RETRO de animais diabéticos apresentaram uma redução no índice de captação de glicose, de aproximadamente 50% e de 30% respectivamente, quando comparado aos controles (Tabela XV e Figura 13). A desnervação não causou alteração no índice de captação de glicose nos adipócitos provenientes de EPI e RETRO de animais controles. No entanto em adipócitos de EPI de ratos diabéticos e desnervado houve uma redução de 50% e no RETRO desses mesmos animais a desnervação provocou um aumento de 300% nesse índice, em relação ao lado inervado dos animais diabéticos.

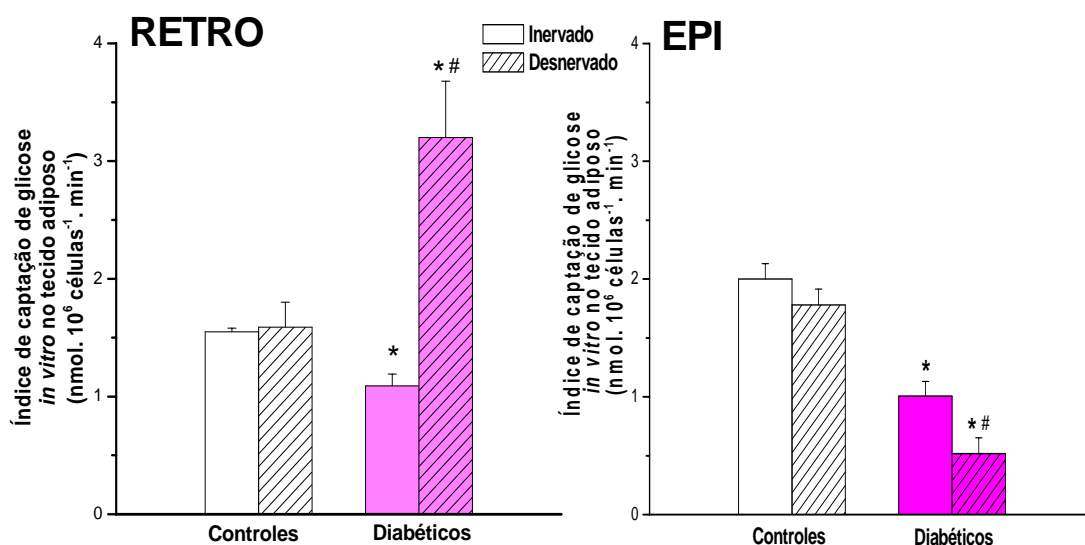
**Tabela XV** – Índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose (nmol de glicose. 10<sup>6</sup> de células<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) *in vitro* em adipócitos dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, inervado e desnervado, de ratos controles e ratos diabéticos.

<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Controles</b>	1,55 ± 0,03	1,60 ± 0,21
<b>Diabéticos</b>	1,09 ± 0,09 *	3,20 ± 0,48 * #

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Controles</b>	2,00 ± 0,13	1,78 ± 0,13
<b>Diabéticos</b>	1,00 ± 0,12 *	0,52 ± 0,13 * #

Os valores representam média ± erro padrão de 14 amostras. \**P*<0,05 em relação ao controle. #*P*<0,05 em relação ao inervado.



**Figura 13** – Efeito da desnervação simpática no índice de captação de 2-desoxi-1-<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vitro* nos adipócitos isolados dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores de média  $\pm$  erro padrão de 14 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.



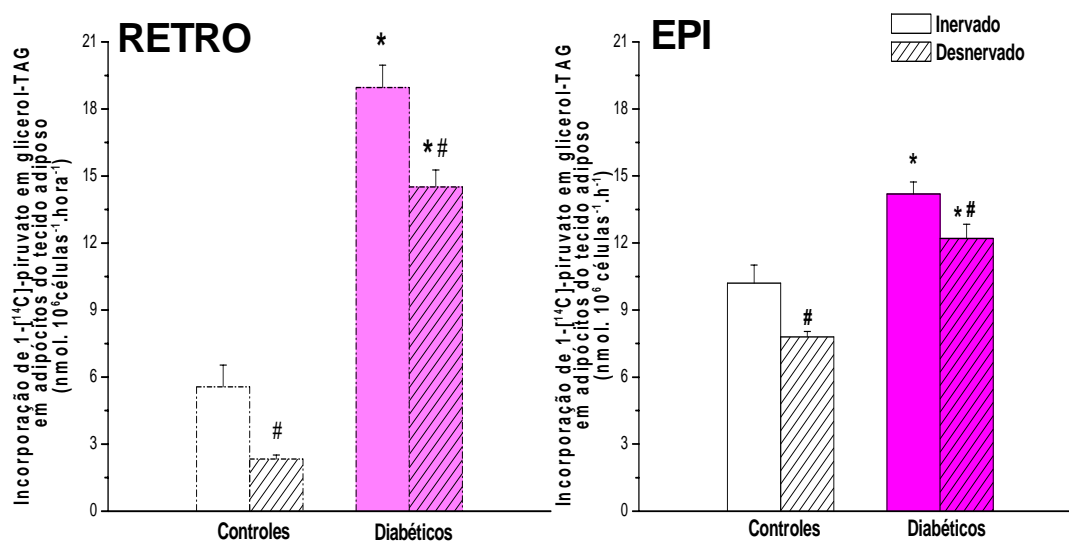
### 4.3.3. Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato na fração glicerol de TAG *in vitro* no tecido adiposo epididimal

A velocidade de incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG em adipócitos do EPI de animais diabéticos foi maior do que nos adipócitos de animais controles (40%). Este aumento foi menor do que o observado anteriormente, em adipócitos do tecido adiposo branco retroperitoneal (250%) A desnervação reduziu a incorporação do piruvato em glicerol-TAG no EPI e no RETRO, tanto nos adipócitos dos animais controles como nos animais diabéticos (Tabela XVI e Figura 14).

**Tabela XVI** - Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (nmol glicerol. 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>) em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de ratos controles e ratos diabéticos

	Inervado	Desnervado
<b>Controles</b>	10,20 ± 0,81	7,80 ± 0,24 <sup>#</sup>
<b>Diabéticos</b>	14,20 ± 0,54 <sup>*</sup>	12,20 ± 0,64 <sup>* #</sup>

Os valores representam média ± erro padrão de 14 amostras. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao controle. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao innervado.



**Figura 14** – Efeito do diabetes e da desnervação simpática na incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos isolados dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente a média  $\pm$  erro padrão de 14 amostras. \* $P < 0,05$  em ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

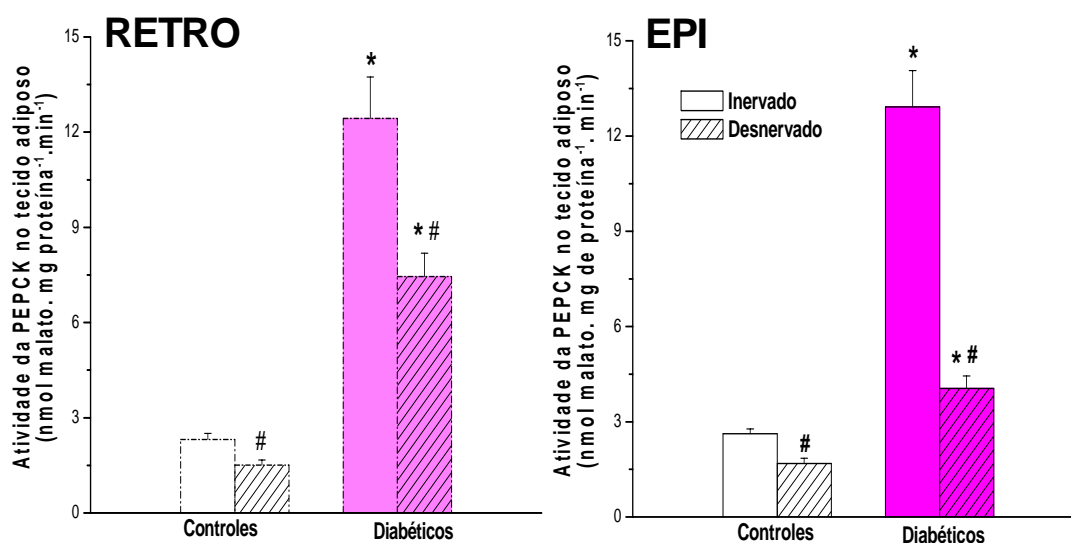
#### 4.3.4 Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal

Foi observado um aumento de cerca de 5 vezes na atividade da PEPCK no EPI de ratos diabéticos em relação ao dos controles. A desnervação reduziu 68% a atividade desta enzima nos animais diabéticos e em cerca de 35% nos animais controles (Tabela XVII e Figura 15). Resultados obtidos anteriormente mostram comportamento semelhante da PEPCK no RETRO.

**Tabela XVII** - Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (nmol de malato. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo branco epididimal, inervado e desnervado, de ratos controles e de ratos diabéticos.

	Inervado	Desnervado
<b>Controles</b>	2,62 ± 0,16	1,69 ± 0,17 <sup>#</sup>
<b>Diabéticos</b>	12,92 ± 1,14 <sup>*</sup>	4,05 ± 0,39 <sup>* #</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão de 14 amostras. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao controle. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao inervado.



**Figura 15** – Efeito do diabetes e da desnervação simpática na atividade (nmol de malato. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), nos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média ± erro padrão de 14 amostras. \**P*<0,05 em relação ao controle #*P*<0,05 em relação ao inervado.

#### 4.3.5 Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo retroperitoneal e epididimal

O diabetes não alterou a atividade da GyK no EPI, mas reduziu em cerca de 30% a atividade da enzima no RETRO. A desnervação reduziu a atividade da GyK no RETRO e EPI tanto dos animais controles como dos animais diabéticos (Tabela XVIII e Figura 16). A redução na atividade da GyK é mais pronunciada no EPI que no RETRO.

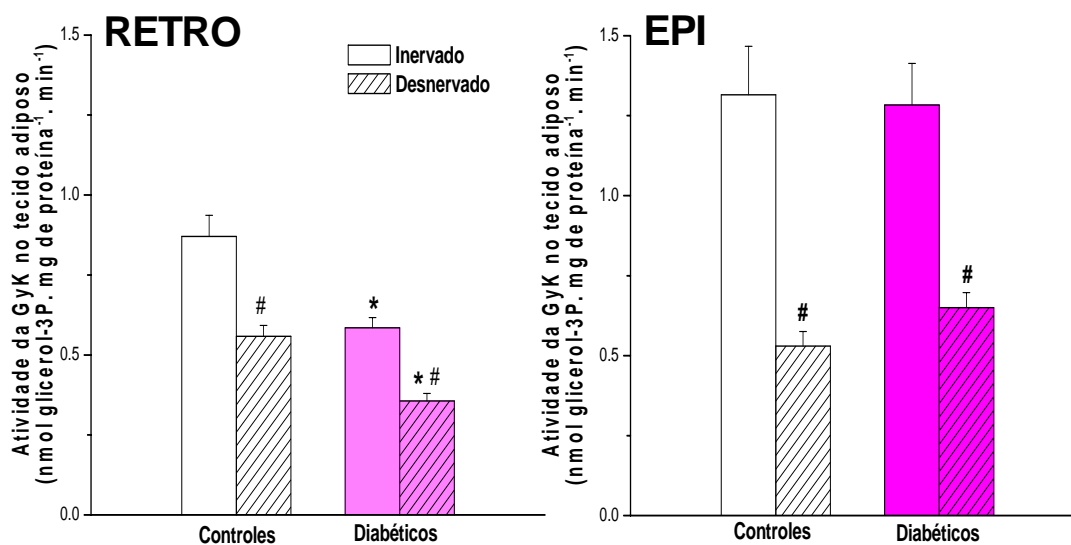
Tabela XVIII - Atividade da gliceroquinase (nmol de glicerol-3P. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) nos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, innervado e desnervado, de ratos controles e ratos diabéticos.

<b>Retroperitoneal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Controles</b>	0,87 ± 0,07	0,56 ± 0,03 <sup>#</sup>
<b>Diabéticos</b>	0,59 ± 0,03 <sup>*</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>*#</sup>

<b>Epididimal</b>	<b>Inervado</b>	<b>Desnervado</b>
<b>Controles</b>	1,32 ± 0,15	0,53 ± 0,06 <sup>#</sup>
<b>Diabéticos</b>	1,28 ± 0,13	0,65 ± 0,05 <sup>#</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão de 12 amostras. <sup>\*</sup>P<0,05 em relação ao controle. <sup>#</sup>P<0,05 em relação ao innervado.



**Figura 16** – Efeito do diabetes e da desnervação simpática na atividade da enzima gliceroquinase (GyK) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

#### 4.4 Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos

Foi avaliado o efeito da dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), no tecido adiposo epididimal (EPI) sobre os seguintes parâmetros:

- Peso do tecido;
- Velocidade de renovação de noradrenalina;
- Índice de captação de glicose *in vivo*;
- Velocidade de incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG;
- Atividade da PEPCCK;
- Atividade da gliceroquinase (GyK);

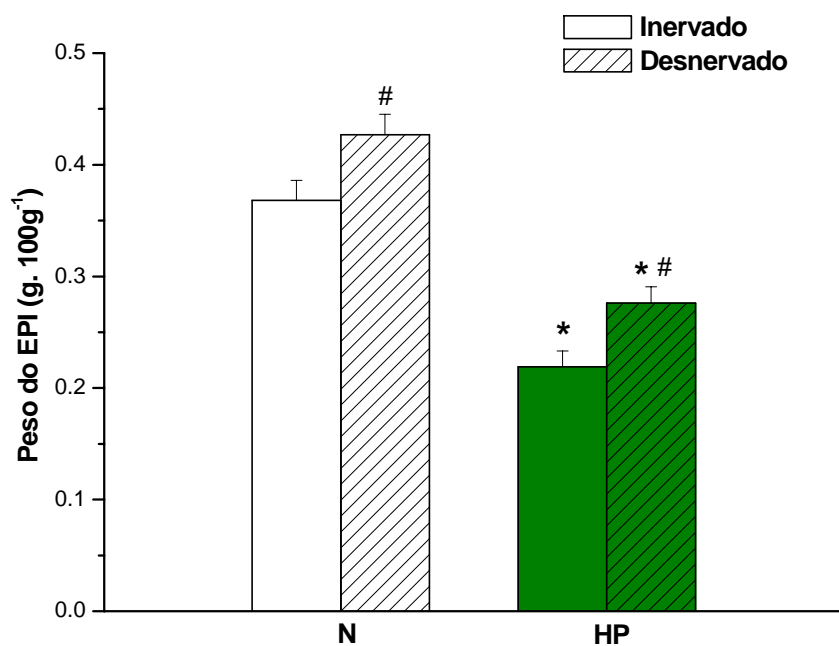
##### 4.4.1 Peso do tecido adiposo epididimal

O peso do EPI dos animais adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), apresentou uma redução, em comparação ao dos controles, após 15 dias de dieta. A desnervação simpática causou um aumento em torno de 20% no peso do EPI tanto do grupo N como do HP (Tabela XIX e Figura 17).

**Tabela XIX** – Peso do tecido adiposo epididimal (g. 100g<sup>-1</sup>), innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>N</b>	0,37 ± 0,02	0,43 ± 0,02 <sup>#</sup>
<b>HP</b>	0,22 ± 0,01 *	0,28 ± 0,01 * #

Os valores representam a média ± erro padrão de 15 amostras. \*  $P < 0,05$  em relação ao N. <sup>#</sup>  $P < 0,05$  em relação ao innervado.



**Figura 17** – Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP) e da desnervação simpática no peso do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente a média  $\pm$  erro padrão de 15 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao N. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.



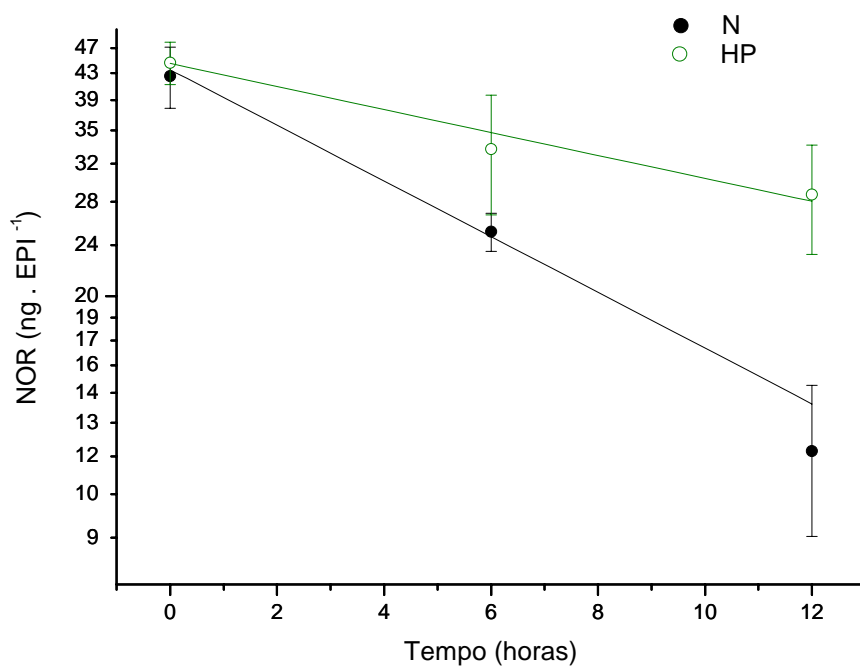
#### 4.4.2 Velocidade de renovação de noradrenalina no tecido adiposo epididimal

A determinação da velocidade de renovação de noradrenalina no EPI teve como finalidade avaliar a atividade do sistema nervoso simpático neste tecido. Os ratos alimentados com a dieta HP não apresentaram diferença significativa no conteúdo de noradrenalina (tempo 0) em relação ao controle. No entanto, o declínio do conteúdo de noradrenalina após o bloqueio de sua síntese, foi menor nos animais alimentados com a dieta HP quando comparado com os animais controles N (Figura 18), isto é, os animais HP apresentaram redução na velocidade de renovação fracional ( $k$ ) e na velocidade de renovação de noradrenalina (VR) com aumento de  $t_{1/2}$ , sugerindo uma menor atividade simpática no EPI desses animais (Tabela XX).

**Tabela XX** – Conteúdo de noradrenalina no tempo 0 ( $NOR_0$ ), velocidade de renovação fracional ( $k$ ), velocidade de renovação de noradrenalina (VR) e tempo em que a concentração de noradrenalina cai à metade da inicial ( $t_{1/2}$ ), no tecido adiposo epididimal, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	$NOR_0$ (ng)	$k$ (%. $h^{-1}$ )	VR (ng. $H^{-1}$ .RETRO $^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
<b>N</b>	42,6 ± 4,43	9,52±1,21	4,09 (3,48-4,74)	7,22
<b>HP</b>	44,6 ± 3,24	3,93 ±0,48*	1,69 (1,31-2,11) *	18,23 *

Os valores representam a média ± erro padrão de 7 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao N.



**Figura 18** – Concentração de noradrenalina (NOR) em função do tempo, após administração intraperitoneal de  $\alpha$ -metil tirosina, no tecido adiposo epididimal (EPI) de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão de 7 animais.

#### 4.4.3 Índice de captação de glicose *in vivo* no tecido adiposo epididimal

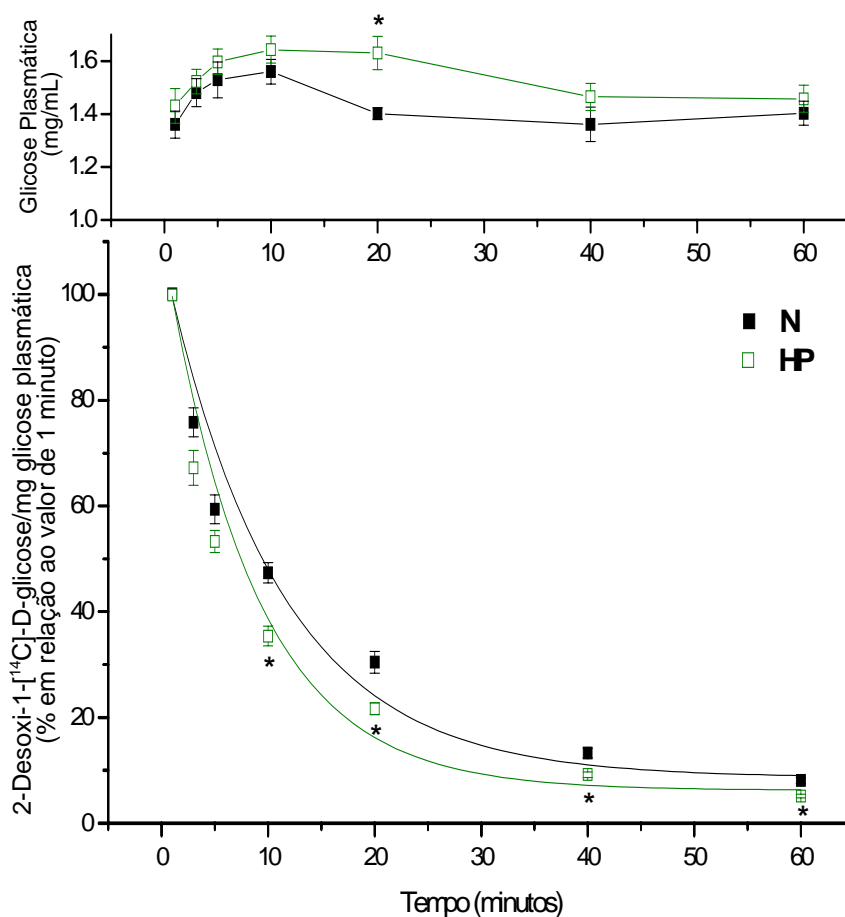
A glicemia nos animais adaptados à dieta HP foram similares a dos animais adaptados à dieta N (Figura 19).

A dieta hiperprotéica livre de carboidratos reduziu o índice de captação de glicose *in vivo* no EPI quando comparado aos dados obtidos nos animais N. A desnervação simpática não causou alteração neste parâmetro em nenhuma das duas dietas estudadas, apesar da tendência de aumento observado no grupo HP (Tabela XXI e Figura 20).

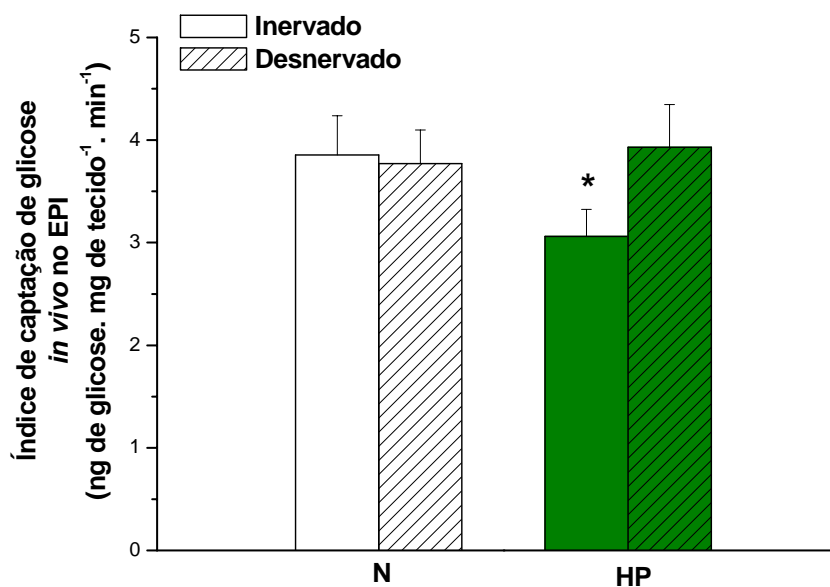
**Tabela XXI** – Índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo* (ng de glicose. mg de tecido<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo epididimal, inervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>N</b>	3,85 ± 0,38	3,77 ± 0,33
<b>HP</b>	3,06 ± 0,26 *	3,93 ± 0,41

Os valores representam a média ± erro padrão de 14 animais. \**P*<0,05 em relação ao N.



**Figura 19** – Glicose plasmática e curva temporal da atividade específica da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose em ratos adaptados à dieta normal (N) e ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 14 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao N.



**Figura 20** – Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP) e da desnervação simpática no índice de captação de 2-desoxi-1-<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo* no tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam a média ± erro padrão de 14 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao N.

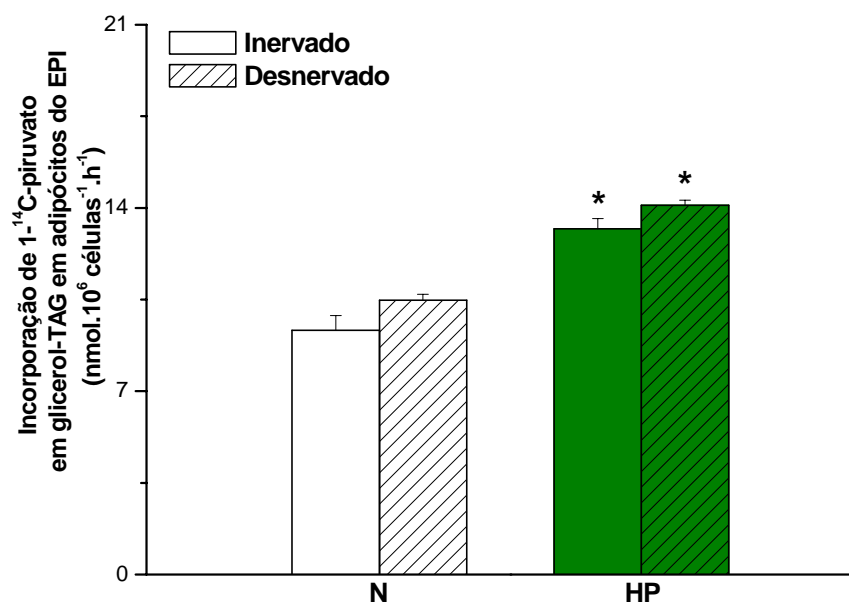
#### 4.4.4. Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato na fração glicerol de TAG *in vitro* no tecido adiposo epididimal

A incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em glicerol de TAG foi maior nos adipócitos do EPI dos animais que receberam a dieta HP em relação à incorporação nos adipócitos provenientes do EPI dos animais N. A desnervação não alterou este parâmetro nos dois grupos estudados (Tabela XXII e Figura 21).

**Tabela XXII** - Incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em glicerol de triacilglicerol (nmol glicerol. 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>) em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, inervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>N</b>	9,33 ± 0,562	10,47 ± 0,234
<b>HP</b>	13,2 ± 0,40 *	14,1 ± 0,198 *

Os valores representam média ± erro padrão de 12 amostras. \**P*<0,05 em relação ao N.



**Figura 21** – Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP) e da desnervação na incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média ± erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao N.

#### 4.4.5 Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal

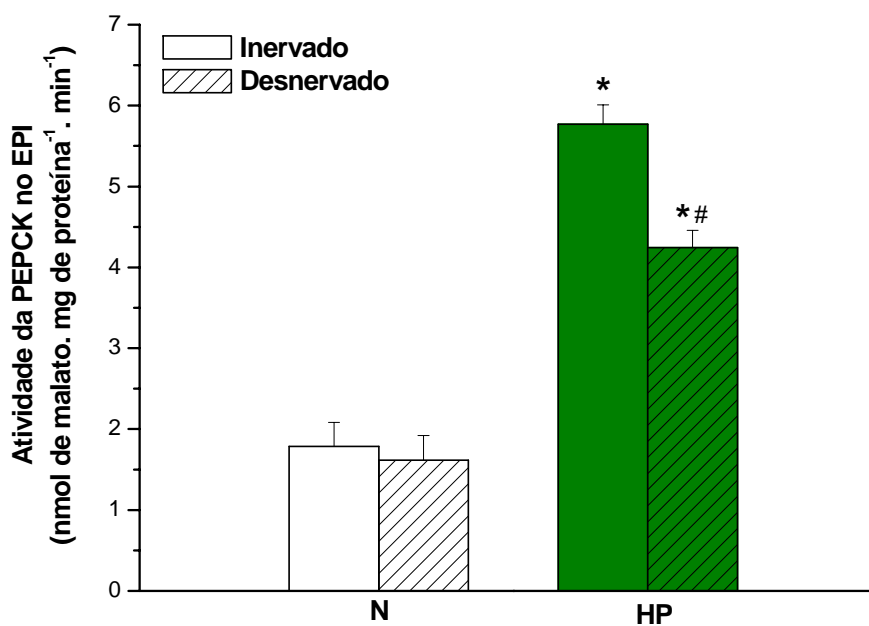
A dieta HP induziu um aumento na atividade da PEPCK no EPI. A desnervação reduziu a atividade da enzima no EPI de ratos HP, embora não tenha sido constatada nenhuma alteração na atividade da PEPCK no EPI de animais N com a desnervação (Tabela XXIII e Figura 22).

**Tabela XXIII** - Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (nmol de malato. mg proteína<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>N</b>	1,79 ± 0,29	1,61 ± 0,31
<b>HP</b>	5,77 ± 0,24*	4,24 ± 0,21 * #

Os valores representam média ± erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao N. # $P < 0,05$  em relação ao innervado.





**Figura 22** – Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP) e da desnervação, na atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao N. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

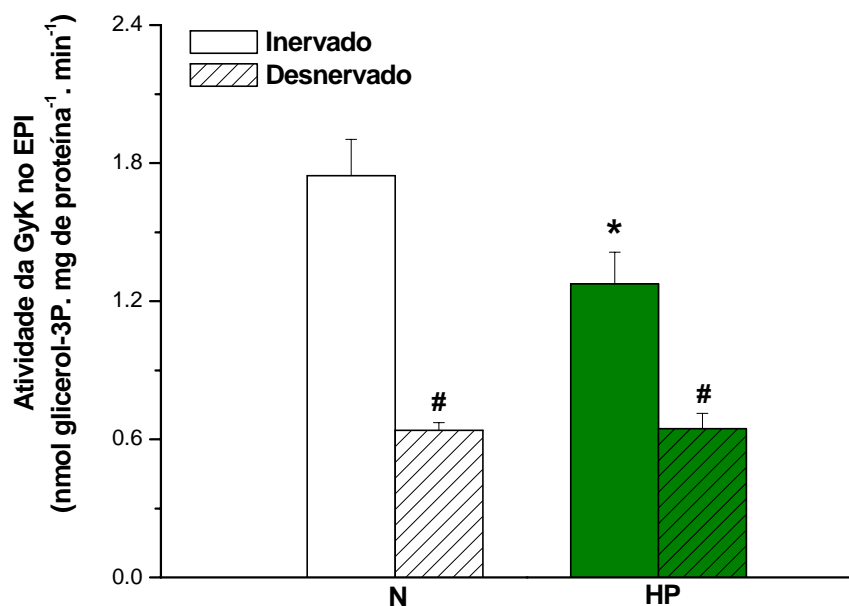
#### 4.4.6 Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo epididimal

A dieta HP reduziu a atividade da enzima gliceroquinase (GyK) no EPI quando comparada à atividade da enzima em ratos adaptados à dieta N. A desnervação reduziu a atividade da GYK no EPI, tanto nos animais adaptados à dieta N quanto nos animais adaptados à dieta HP (Tabela XXIV e Figura 23).

**Tabela XXIV** - Atividade da gliceroquinase (nmol de glicerol-3P. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo epididimal, inervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta normal (N) e de ratos adaptados à dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP), por 15 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>N</b>	1,75 ± 0,16	0,64 ± 0,03 <sup>#</sup>
<b>HP</b>	1,27 ± 0,14*	0,64 ± 0,07 <sup>#</sup>

Os valores representam média ± erro padrão de 12 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao N. <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao inervado.



**Figura 23** – Efeito da dieta hiperprotéica livre de carboidratos (HP) e da desnervação simpática (EPI), na atividade da enzima gliceroquinase (GyK) do tecido adiposo branco epididimal. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 12 amostras. \*  $P < 0,05$  em relação ao N. #  $P < 0,05$  em relação ao inervado.

#### 4.5 Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica

Foi avaliado o efeito da dieta HCHL sobre os seguintes parâmetros no tecido adiposo branco epididimal (EPI):

- Peso do tecido;
- Índice de captação de glicose *in vivo*;
- Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG;
- Atividade da PEPCK;
- Atividade da enzima gliceroquinase (GyK);

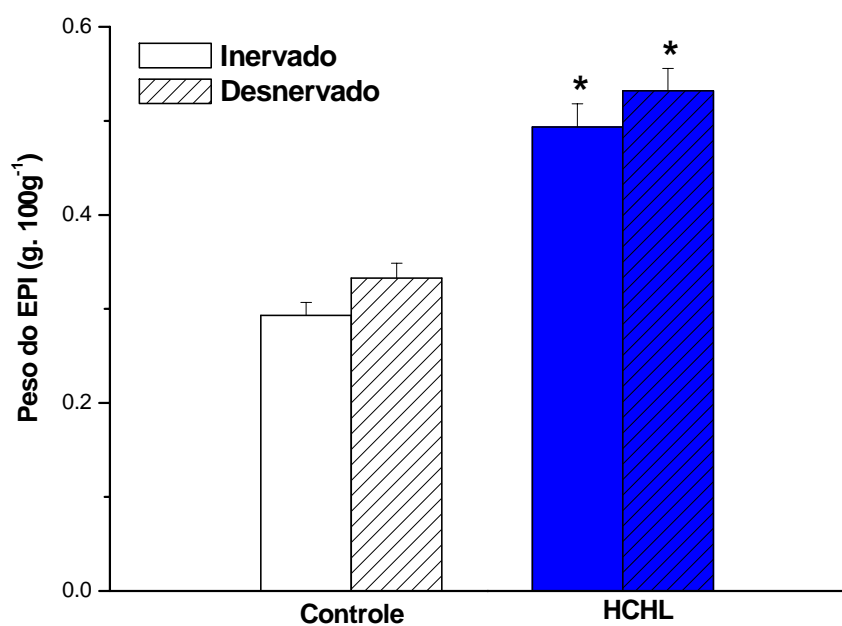
##### 4.5.1 Peso do tecido adiposo branco epididimal

O peso do EPI dos ratos adaptados à dieta HCHL por 21 dias aumentou cerca de 70% em comparação ao peso do EPI dos ratos adaptados à dieta controle. A desnervação simpática não alterou o peso deste tecido nos dois grupos estudados (Tabela XXV e Figura 24).

**Tabela XXV**– Peso do tecido adiposo epididimal (g. 100g<sup>-1</sup>), innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta controle e de ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL), por 21 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>Controle</b>	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,02
<b>HCHL</b>	0,49 ± 0,03*	0,53 ± 0,02*

Os valores representam a média ± erro padrão de 24 amostras. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle.



**Figura 24** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) e da desnervação simpática sobre o peso do tecido adiposo branco epididimal (EPI). As colunas e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 24 amostras. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle.

#### 4.5.2 Índice de captação de glicose *in vivo* no tecido adiposo branco epididimal

O índice de captação de glicose *in vivo* no EPI innervado e desnervado foi avaliado em ratos controles e ratos alimentados com a dieta HCHL após administração de traços de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose.

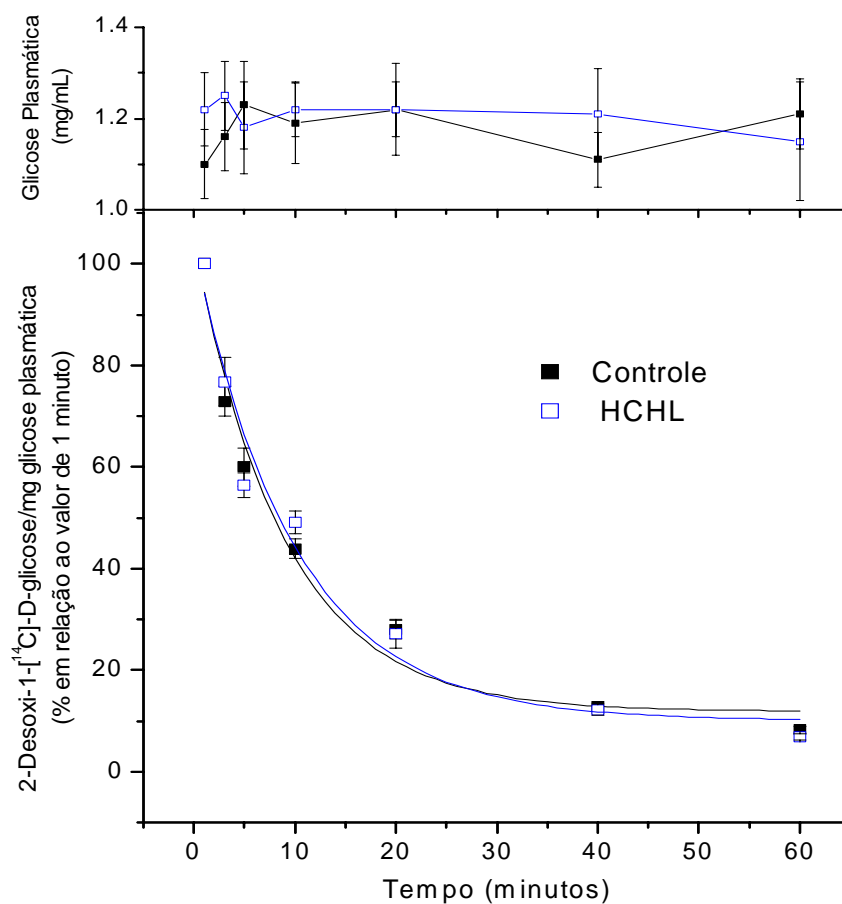
Os níveis plasmáticos de glicose dos animais não apresentaram alteração significativa entre os tempos e os grupos analisados (Figura 25).

A dieta HCHL aumentou o índice de captação da hexose em relação aos animais controles. A desnervação não alterou o índice de captação de glicose em nenhum dos grupos estudados (Tabela XXVI e Figura 26).

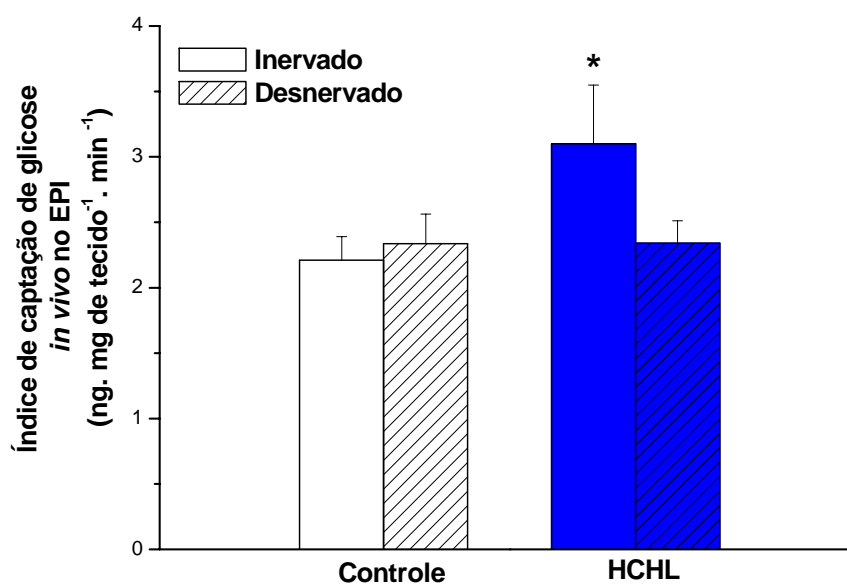
**Tabela XXVI**– Índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo* (ng de glicose. mg de tecido<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta controle e de ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL), por 21 dias.

	Innervado	Desnervado
<b>Controle</b>	2,21 ± 0,18	2,34 ± 0,23
<b>HCHL</b>	3,10 ± 0,45 *	2,34 ± 0,17

Os valores representam a média ± erro padrão de 8 animais. \**P* < 0,05 em relação ao controle.



**Figura 25** – Glicose plasmática e curva temporal da atividade específica da 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose em ratos adaptados à dieta controle e ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL) por 21 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 8 animais.



**Figura 26** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) e da desnervação simpática sobre o índice de captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-D-glicose *in vivo* no tecido adiposo branco epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 8 animais. \* $P < 0,05$  em relação ao controle.



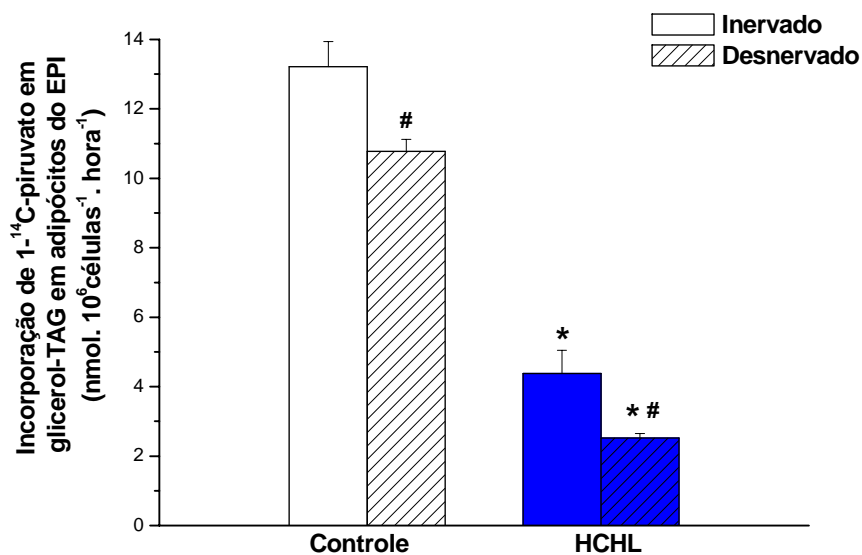
### 4.5.3 Incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato na fração glicerol de TAG em adipócitos do tecido adiposo epididimal

A incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato na fração glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos dos animais adaptados à dieta HCHL foi menor do que nos adipócitos controles. A desnervação induziu uma redução deste parâmetro em adipócitos do EPI tanto do grupo controle quanto do grupo HCHL (Tabela XXVII e Figura 27).

**Tabela XXVII** - Incorporação de 1-<sup>14</sup>C-piruvato em glicerol de triacilglicerol (nmol. 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>. hora<sup>-1</sup>), em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta controle e ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL), por 21 dias.

	Innervado	Desnervado
<b>Controle</b>	13,21 ± 0,73	10,78 ± 0,34 #
<b>HCHL</b>	4,38 ± 0,67 *	2,52 ± 0,37 * #

Os valores representam médias ± erro padrão de 14 amostras. \**P*<0,05 em relação ao controle. #*P*< 0,05 em relação ao innervado.



**Figura 27** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) e da desnervação simpática na incorporação de 1-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de triacilglicerol (TAG) em adipócitos do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média ± erro padrão de 14 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

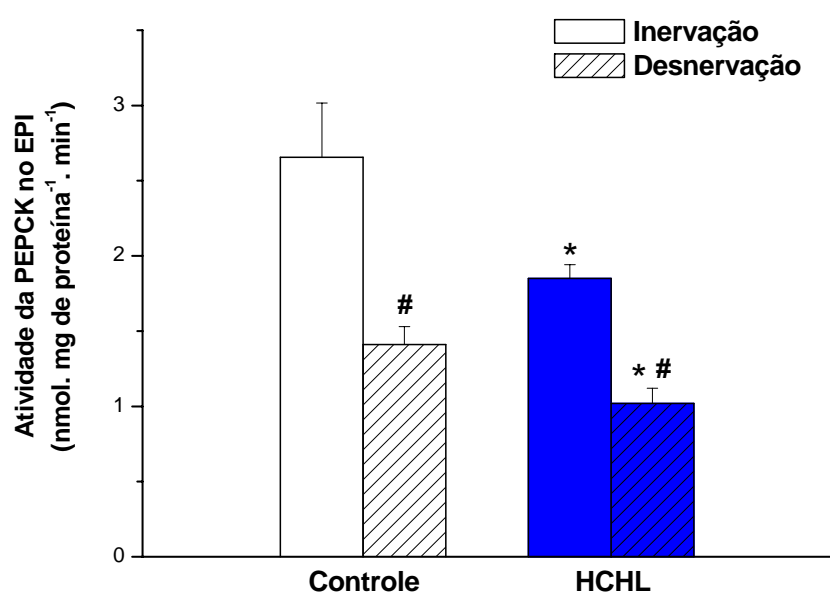
#### 4.5.4. Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no tecido adiposo epididimal

A atividade da PEPCK no EPI foi reduzida em cerca de 30% pela dieta HCHL. Assim como observado na incorporação de piruvato em glicerol de TAG, a desnervação promoveu redução na atividade da enzima, tanto nos ratos controles como em ratos adaptados à dieta HCHL (Tabela XXVIII e Figura 28).

**Tabela XXVIII** - Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (nmol de malato. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo epididimal, innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta controle e de ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL), por 21 dias..

	Inervado	Desnervado
<b>Controle</b>	2,66 ± 0,36	1,41 ± 0,12 <sup>#</sup>
<b>HCHL</b>	1,85 ± 0,09 <sup>*</sup>	1,02 ± 0,10 <sup>* #</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão de 8 amostras. <sup>#</sup>P < 0,05 em relação ao innervado.



**Figura 28** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) e da desnervação simpática na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 8 amostras. #  $P < 0,05$  em relação ao innervado.

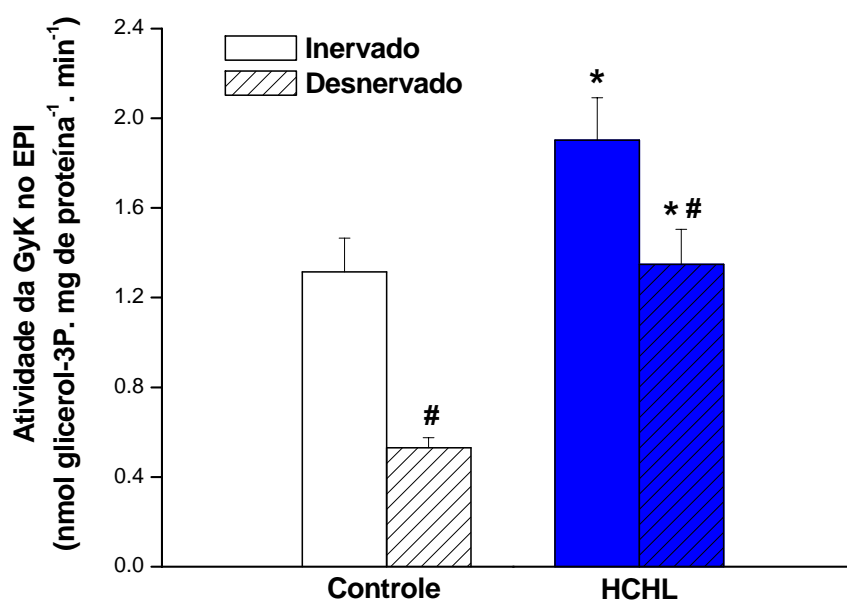
#### 4.5.5 Atividade da enzima gliceroquinase no tecido adiposo epididimal

A dieta HCHL induziu aumento em cerca de 45% na atividade da GyK. A desnervação reduziu a atividade da enzima em aproximadamente 60% nos animais controles e de 30% no grupo HCHL (Tabela XXIX e Figura 29).

**Tabela XXIX** - Atividade da gliceroquinase (nmol de glicerol-3P. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) no tecido adiposo branco epididimal, innervado e desnervado, de ratos adaptados à dieta controle e de ratos adaptados à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL), por 21 dias.

	Inervado	Desnervado
<b>Controle</b>	1,31 ± 0,15	0,53 ± 0,04 <sup>#</sup>
<b>HCHL</b>	1,90 ± 0,19 *	1,35 ± 0,16 * <sup>#</sup>

Os valores representam média ± erro padrão de 10 amostras. \**P*<0,05 em relação ao controle. <sup>#</sup>*P*< 0,05 em relação ao innervado.



**Figura 29** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL) e da desnervação simpática na atividade da gliceroquinase (GyK) do tecido adiposo epididimal (EPI). As colunas e as barras representam respectivamente os valores da média  $\pm$  erro padrão de 10 amostras. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. # $P < 0,05$  em relação ao inervado.

**Resumo dos resultados das 3 vias de geração de G3P nas diferentes situações experimentais e os efeitos obtidos com a desnervação**

**Tabela XXX** – Parâmetros das vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo branco epididimal nas diferentes situações experimentais estudadas.

<b>Via glicolítica</b>			<b>Via de fosforilação direta do glicerol</b>		
<b>Captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose</b>			<b>Atividade da GyK</b>		
	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>(nmol glicerol.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	
<i>In vivo</i> (ng glicose.mg tecido <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )					
<b>Controle</b>	2,2±0,2	2,0±0,2	<b>Controle</b>	1,3±0,1	0,5±0,0 <sup>#</sup>
<b>Jejuado</b>	1,5±0,1*	1,6±0,1	<b>Jejuado</b>	0,4±0,0*	0,2±0,0* <sup>#</sup>
<b>HCHL</b>	3,1±0,4*	2,3±0,2	<b>Diabético</b>	1,3±0,1	0,6±0,0 <sup>#</sup>
<b>N</b>	3,8±0,4	3,8±0,3	<b>HCHL</b>	1,9±0,2*	1,3±0,2* <sup>#</sup>
<b>HP</b>	3,1±0,3 <sup>&amp;</sup>	3,9±0,4	<b>N</b>	1,7±0,2	0,6±0,0 <sup>#</sup>
<i>In vitro</i> (nmol glicose.10 <sup>6</sup> cél <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )			<b>HP</b>	1,3±0,1 <sup>&amp;</sup>	0,6±0,1 <sup>#</sup>
<b>Controle</b>	2,0±0,1	1,8±0,1			
<b>Diabético</b>	1,0±0,1*	0,5±0,1* <sup>#</sup>			

<b>Via gliceroneogênica</b>					
<b>Incorporação de piruvato em glicerol-TAG</b>			<b>Atividade da PEPCK</b>		
	<b>(nmol glicerol. 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup>.hora<sup>-1</sup>)</b>		<b>(nmol malato. mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	
<b>Controle</b>	10,9±0,7	7,65±0,1 <sup>#</sup>	<b>Controle</b>	2,6±0,2	1,7±0,2 <sup>#</sup>
<b>Jejuado</b>	19,2±1,1*	14,1±0,9* <sup>#</sup>	<b>Jejuado</b>	6,2±0,6*	1,5±0,1 <sup>#</sup>
<b>Diabético</b>	14,2±0,5*	12,2±0,6* <sup>#</sup>	<b>Diabético</b>	12,9±1,1*	4,0±0,4* <sup>#</sup>
<b>HCHL</b>	4,4±0,7*	2,5±0,4* <sup>#</sup>	<b>HCHL</b>	1,8±0,1*	1,0±0,1* <sup>#</sup>
<b>N</b>	9,3±0,6	10,5±0,2	<b>N</b>	1,8±0,3	1,6±0,3
<b>HP</b>	13,2±0,4 <sup>&amp;</sup>	14,1±0,2 <sup>&amp;</sup>	<b>HP</b>	5,8±0,2 <sup>&amp;</sup>	4,2±0,2 <sup>&amp;</sup> <sup>#</sup>

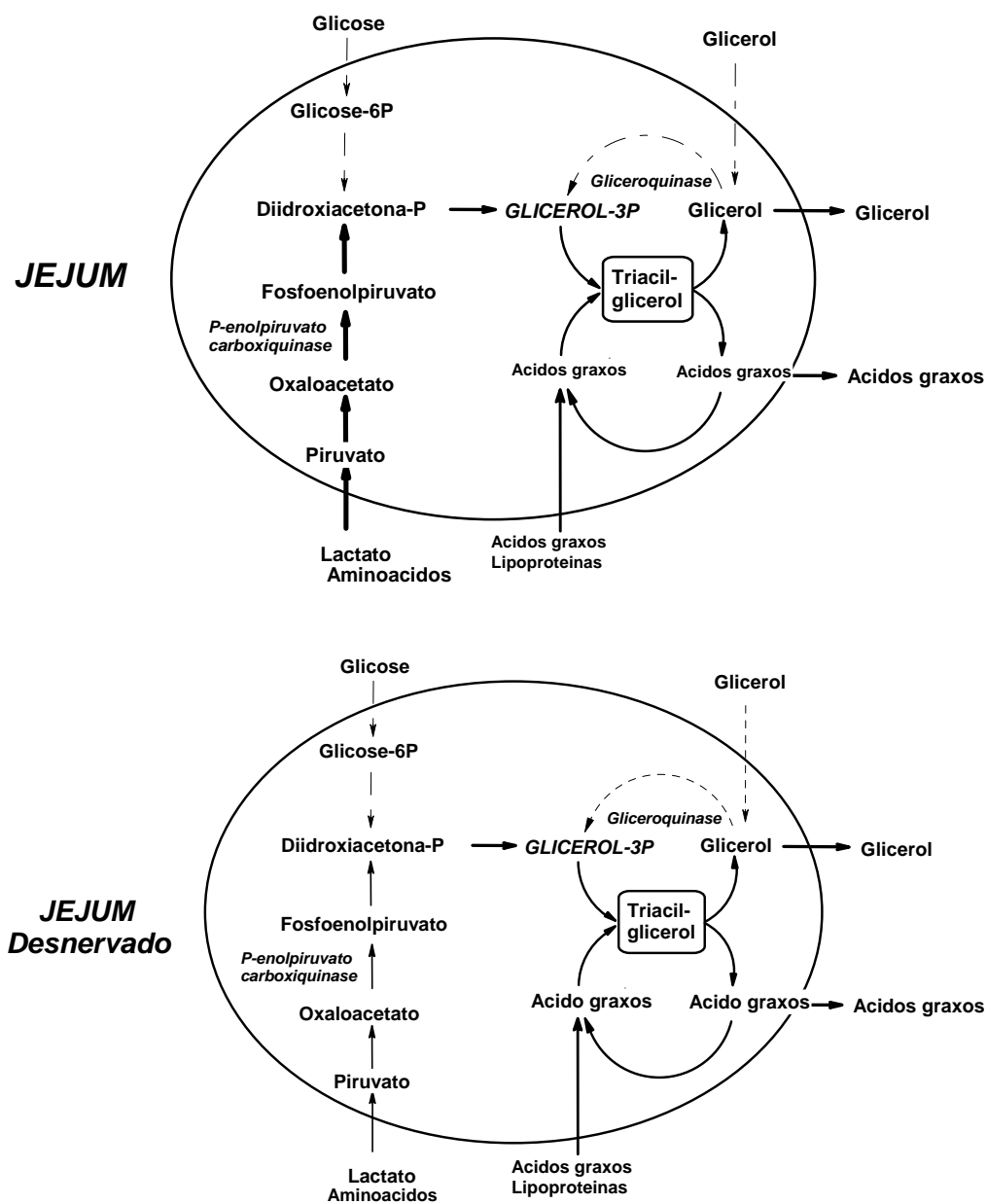
Onde **I**= inervado; **D**= desnervado; \**P*<0,05 vs controle. &*P*<0,05 vs N. #*P*<0,05 vs inervado.

**Efeito do jejum**

Os dados sugerem que o jejum diminui a *via* de formação de G3P a partir da glicose (↓ do índice de captação de glicose) e a *via* de fosforilação direta do glicerol (↓ da atividade da GyK) no tecido adiposo epididimal. A *via* gliceroneogênica encontra-se elevada no tecido dos animais submetidos ao jejum (↑ da PEPCK e ↑ da incorporação de piruvato em glicerol).

**Efeito da desnervação** - A desnervação não altera a *via* de geração de G3P a partir da glicose no tecido adiposo epididimal de animais submetidos ao jejum, mas causa um efeito adicional, de redução, na *via* de fosforilação direta do glicerol. A desnervação reduz a *via* da gliceroneogênese no jejum (↓ incorporação do piruvato em glicerol-TAG e ↓ atividade da PEPCK), no entanto está *via* se mantém com atividade maior que a encontrada no tecido epididimal de animais controles. Nos animais controles a desnervação leva a uma redução tanto da gliceroneogênese como na *via* da gliceroquinase, sem alteração na *via* de formação de G3P a partir da glicose.



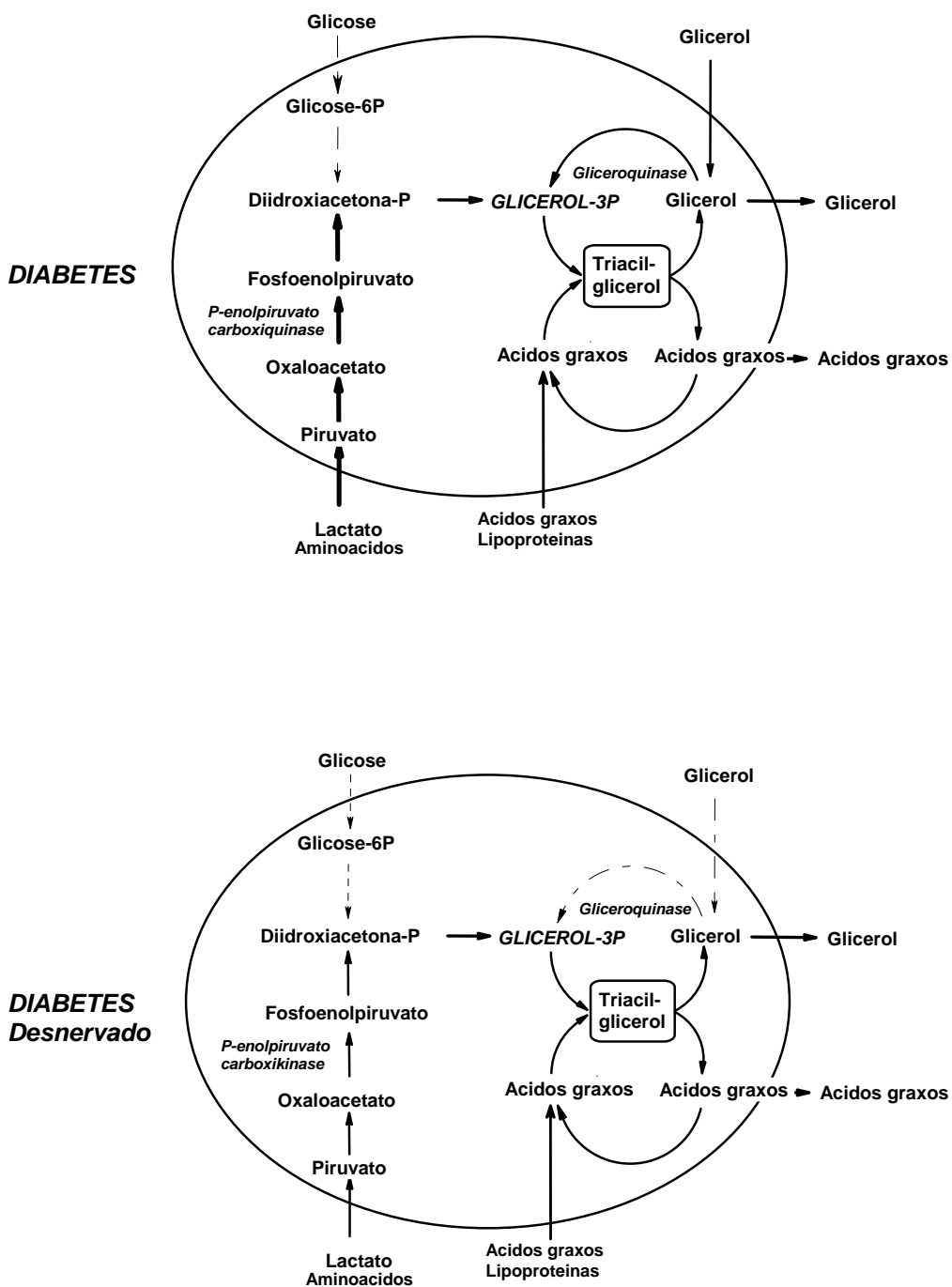


**Figura 30** – Efeito do jejum e da desnervação simpática nas vias de geração de glicerol-3- fosfato no tecido adiposo branco epididimal.

**Efeito do diabetes**

O diabetes aumentou a *via* gliceroneogênica ( $\uparrow$  da incorporação de piruvato em glicerol e  $\uparrow$  da PEPCK) compensando a redução de G3P a partir da glicose ( $\downarrow$  do índice de captação de glicose) sem alterar a *via* de fosforilação do glicerol (nenhuma alteração na atividade da GyK) .

**Efeito da desnervação** - A desnervação causa uma redução adicional na atividade da *via* de geração de G3P a partir de glicose no tecido adiposo epididimal de animais diabéticos. A desnervação reduz a *via* gliceroneogênica ativada pelo diabetes, porém mesmo reduzida, parece ser esta a *via* predominante na geração de G3P em EPI desnervado de animais diabéticos. A desnervação simpática também reduziu a atividade da *via* de fosforilação direta do glicerol.

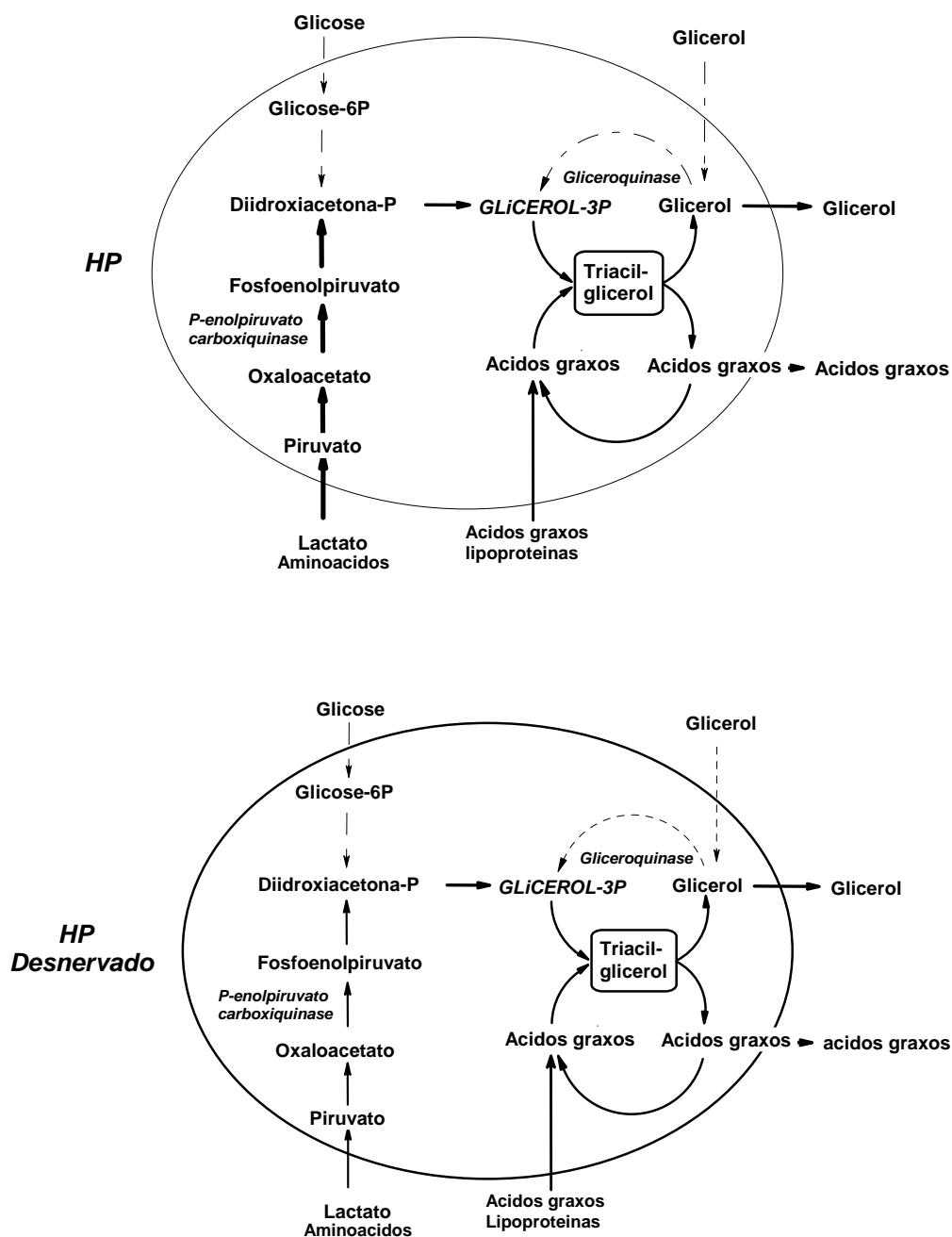


**Figura 31** – Efeito do diabetes e da desnervação simpática nas vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo branco epididimal.

***Efeito da dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP)***

Os dados mostram que a adaptação à dieta HP provoca uma redução da *via* de formação de G3P a partir da glicose ( $\downarrow$  do índice de captação de glicose) e da *via* de fosforilação direta do glicerol ( $\downarrow$  da GYK), compensada com o aumento da *via* gliceroneogênica ( $\uparrow$  da incorporação do piruvato em glicerol e aumento da PEPCK) no tecido adiposo epididimal.

***Efeito da desnervação*** - A desnervação simpática não altera a *via* de formação de G3P a partir da glicose e reduz *via* gliceroneogênica no tecido adiposo epididimal de animais alimentados com a dieta HP. A incorporação do piruvato em glicerol no lado desnervado não é alterada, apesar da redução observada na atividade da PEPCK no lado desnervado em relação ao inervado. A desnervação do EPI de animais HP causa uma redução adicional na *via* de fosforilação direta do glicerol no EPI dos animais HP.

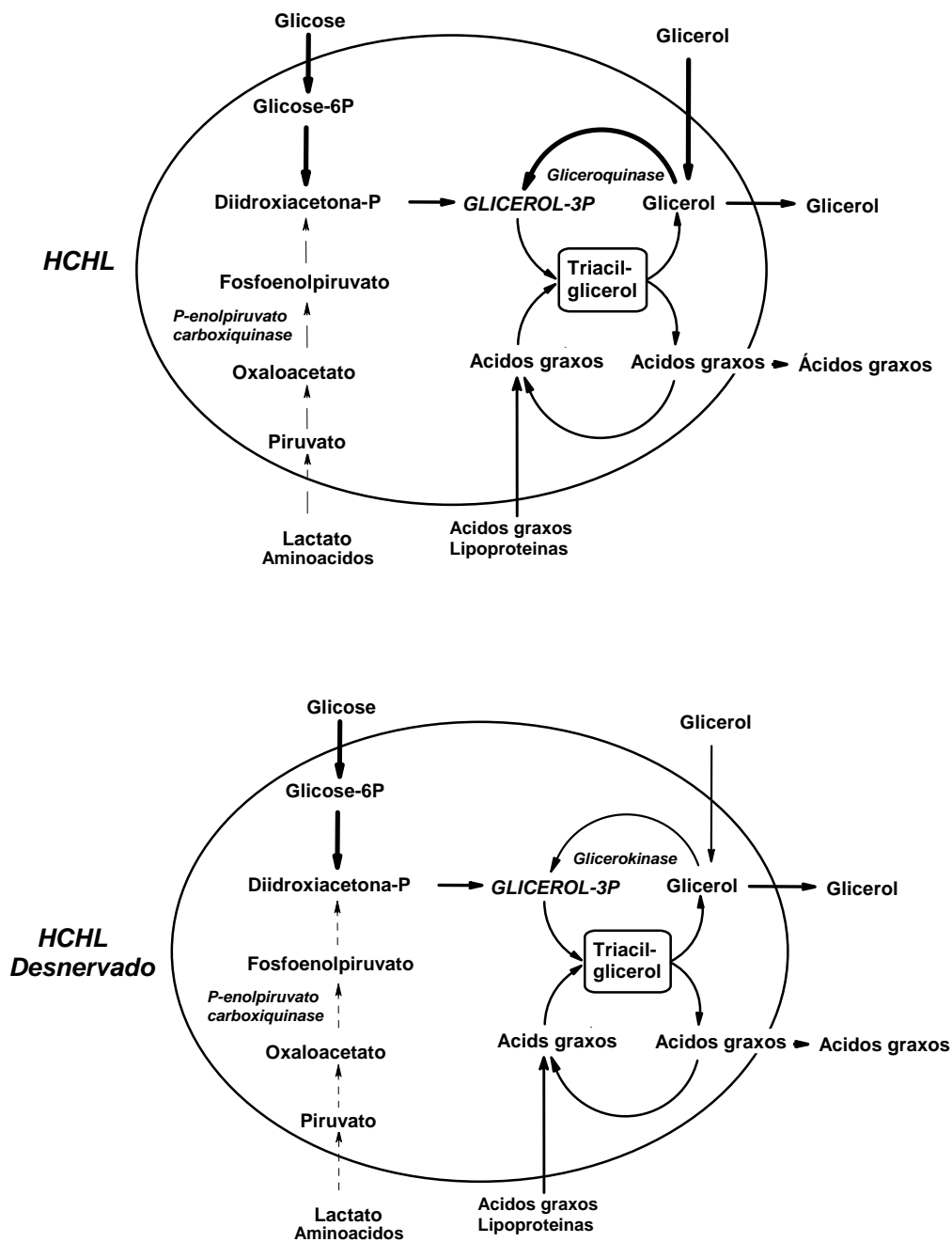


**Figura 32** – Efeito da dieta hiperprotéica, livre de carboidratos, e da desnervação simpática nas vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo branco epididimal.

***Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria***

A via glicolítica apresentou-se aumentada e a via gliceroneogênica reduzida no tecido adiposo epididimal de animais alimentados com a dieta HCHL. A via de fosforilação direta do glicerol neste tecido encontra-se elevada em animais HCHL quando comparada aos controles.

***Efeito da desnervação*** - A desnervação não alterou a já aumentada *via* glicolítica no tecido adiposo epididimal de ratos alimentados com a dieta HCHL. A *via* gliceroneogênica foi reduzida pela desnervação simpática. A mesma resposta de redução foi observada na *via* de fosforilação direta do glicerol no tecido adiposo epididimal desnervado de animais que foram alimentados com a dieta HCHL.



**Figura 33** – Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria e da desnervação simpática nas vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo branco epididimal.

**Análise comparativa entre o tecido adiposo Retroperitoneal e Epididimal de animais alimentados com uma dieta balanceada**

Os resultados obtidos na nossa dissertação de Mestrado com o tecido adiposo retroperitoneal e os obtidos em nossa tese de Doutorado com o tecido adiposo epididimal nos permitem fazer uma análise comparativa entre os 2 tecidos considerando as diferentes vias metabólicas relacionadas com a geração de G3P, atividade lipolítica e influência do SNS.

O EPI apresenta maior massa, maior atividade gliceroneogênica e maior atividade da gliceroquinase do que o RETRO, parecendo ser essas duas vias as mais importantes neste tecido para a geração do G3P e manutenção do TAG. Estas duas vias dependem do SNS nos dois tecidos estudados.

No EPI tanto a atividade lipolítica (menor que o RETRO) como a captação de glicose (igual ao RETRO) parecem não ser reguladas pelo SNS.

**Tabela XXXI** – Análise comparativa entre o tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.

	<i>Retroperitoneal</i>		<i>Epididimal</i>	
	<i>Inervado</i>	<i>Desnervado</i>	<i>Inervado</i>	<i>Desnervado</i>
<b><i>Peso (g.100g<sup>-1</sup>)</i></b>	0,17 ± 0,004	0,17 ± 0,005	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,02
<b><i>Lipólise (Glicerol)</i></b>	22,20 ± 0,73	18,30 ± 1,04 #	14,16 ± 0,98	16,20 ± 0,54
<b><i>Captação de glicose</i></b>	2,60 ± 0,28	3,62 ± 0,34 #	2,20 ± 0,25	1,83 ± 0,17
<b><i>Incorporação de piruvato glicerol-TAG</i></b>	5,56 ± 0,98	2,33 ± 0,18 #	10,15 ± 0,81	7,81 ± 0,24 #
<b><i>PEPCK</i></b>	2,32 ± 0,19	1,51 ± 0,16 #	2,62 ± 0,16	1,69 ± 0,17 #
<b><i>Gliceroquinase</i></b>	0,87 ± 0,067	0,56 ± 0,034 #	1,31 ± 0,15	0,53 ± 0,04 #

#  $P < 0,05$  em relação ao inervado.



***Discussão***

---

## 5. Discussão

A principal função do tecido adiposo branco é atender as necessidades energéticas dos tecidos periféricos através da mobilização dos AG armazenados na forma de TAG. Assim sendo, sua autonomia funcional depende da manutenção de estoque adequado de TAG que é determinado pelo balanço entre dois processos antagônicos: a lipólise e a lipogênese. Além da quantidade de TAG mantida neste tecido, resultado do balanço entre estes os dois processos citados acima, outro fator que determina a massa do tecido adiposo é a diferenciação e a proliferação dos adipócitos.

Classicamente, o sistema nervoso simpático (SNS), tem importante papel na ativação da lipólise. Estudos mostram que em situações de demanda energética, neurônios de diversas áreas do sistema nervoso central, principalmente neurônios hipotalâmicos, aumentam o fluxo simpático para o tecido adiposo, aumentando a liberação de noradrenalina e conseqüentemente aumentando a lipólise, mobilizando assim os AG armazenados como TAG. Além da lipólise, a participação do SNS é comprovada em vários outros aspectos do metabolismo lipídico no TAB, como o controle da síntese de AGs, G3P e da diferenciação e proliferação celular.

Situações como o jejum e a exposição ao frio de 4°C aumentam a atividade simpática nos vários depósitos de TAB (MIGLIORINI *et al.*, 1997; GARÓFALO *et al.*, 1996). Trabalho recente em nosso laboratório mostra que a adaptação de ratos à dieta HCHL do tipo cafeteria, também leva a um aumento do fluxo simpático no RETRO (CHAVES *et al.*, 2006). Situação oposta, em que ocorre uma diminuição da atividade simpática no RETRO e no EPI, foi observado em ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (HP).

---

A utilização de modelos experimentais que promovem aumento ou diminuição da atividade simpática e alterações quantitativas no armazenamento de TAG, através de manipulações de dietas ou situações patológicas específicas, é interessante para a compreensão do papel do simpático no metabolismo, nas diversas situações, e fundamentaram a escolha de animais em situações experimentais de jejum, diabetes e animais adaptados à dieta HP e HCHL neste trabalho.

A desnervação unilateral do RETRO e EPI, nessas situações experimentais, utilizando o lado contralateral como controle, foi a ferramenta utilizada para avaliar a contribuição do simpático nos parâmetros estudados neste trabalho. A eficiência da desnervação, avaliada pela redução do conteúdo de noradrenalina tecidual, mostra maior eficiência da desnervação química no EPI do que a desnervação cirúrgica no RETRO (redução em 88% e 66%, respectivamente). Os valores de redução obtidos no RETRO são próximos aos valores de 60-64% encontrados em outros trabalhos em que esta metodologia foi utilizada (CANTU E GOODMAN, 1967; BOWERS *et al.*, 2004). Já a desnervação do EPI não permite comparação com outros trabalhos, pois este foi um procedimento experimental original, desenvolvido e padronizado no nosso laboratório no início deste trabalho. Após várias tentativas verificamos que a inervação que chega ao EPI acompanha a veia espermática e que a aplicação de fenol em volta de uma porção desta veia provoca uma redução significativa no conteúdo de noradrenalina no EPI.

Ao analisarmos o efeito do SNS pela comparação dos efeitos obtidos no lado inervado com o desnervado, partimos da premissa que fatores hormonais são mantidos no lado privado da inervação simpática, isto é, os dois lados do tecido se encontram na mesma condição hormonal.

### 5.1 Peso do tecido adiposo epididimal e a lipólise

A redução do peso no EPI, observada ao final de 48h de jejum, pode ser atribuída, além da queda na atividade lipogênica, ao já bem estabelecido aumento da atividade lipolítica confirmada pelo aumento na liberação de glicerol (54%) e de ácidos graxos (171%), quando comparado à liberação pelos adipócitos dos animais alimentados (Tabelas VII e VIII). Além do aumento da atividade simpática observada no tecido na situação de jejum (MIGLIORINI *et al.*, 1997), outras alterações já conhecidas, como a redução na secreção de insulina, aumento do glucagon e de outros hormônios lipolíticos, como a adrenalina, podem contribuir para o aumento da lipólise, e como consequência a redução de peso do tecido. A liberação de glicerol é um índice de avaliação da lipólise, a redução de 50% na atividade da GyK observada no EPI dos animais em jejum, pode ser um fator adicional para o aumento da liberação de glicerol, mesmo considerando que a atividade desta enzima é reduzida no TAB quando comparada ao fígado e a formação de G3P por esta via, constitua apenas uma pequena fração da geração de G3P. Quanto à liberação de ácidos graxos, além da lipólise e da GyK, a alteração das outras vias de geração de G3P não podem ser descartadas, uma vez que a quantidade de G3P disponível é determinante na quantidade de AG que serão esterificados ou reesterificados e portanto, liberados pelos adipócitos. Como observado em nossos experimentos, apesar da incorporação de piruvato em glicerol de TAG em adipócitos do EPI ter aumentado em 89% nos animais jejuados, houve uma redução no índice de captação de glicose em 25%, sugerindo alterações quantitativas nas vias de geração de G3P.

Durante a lipólise, 3 moléculas de AG são liberados por molécula de glicerol, e desta forma, na ausência da reesterificação de AG, a razão AG/glicerol é

aproximadamente 3 (considerando baixa a atividade da GyK). Com a reesterificação dos AG, esta relação será inferior a 3. Analisando a relação AG/GLI no EPI em nossos experimentos observamos que no estado alimentado a relação é 1,30 (70,05/53,69) (Tabelas VII e VIII) e no estado de jejum esta relação aumenta para 2,32 (191,40/82,45) (Tabelas VII e VIII), o que significa que cerca de 43% dos AG foram liberados pelos adipócitos dos animais alimentados e 77% pelos adipócitos de animais em jejum. Se os adipócitos de animais alimentados liberaram 43%, significa que 57% dos AG foram reesterificados, enquanto no jejum, apenas cerca de 23% dos AG sofreram reesterificação. Desta forma, o estado de jejum está associado com aumento da liberação de AG para atender as necessidades energéticas dos tecidos periféricos e redução na percentagem de AG reesterificados. No entanto, mesmo com a redução na percentagem de reesterificação, os valores absolutos dos AG esterificados são elevados tendo em vista o aumento da lipólise e conseqüentemente de AGL disponíveis. Tudo indica que a *via* gliceroneogênica é fundamental nesta situação de jejum, uma vez que verificamos um aumento de cerca de 76% na incorporação de piruvato em glicerol de TAG e uma redução tanto na via de fosforilação do glicerol como na síntese através da glicose, observado pela redução da atividade da GyK e do índice de captação de glicose observada nos animais em jejum (Tabela XIII e IX e Figura 11 e 7, respectivamente).

A ausência de efeito da desnervação no peso do EPI em animais alimentados e os significativos efeitos da desnervação em animais mantidos em jejum, impedindo a redução do peso do EPI (Tabela VI), podem ser atribuídos à maior atividade simpática no tecido nesta situação experimental de restrição alimentar.

Utilizando as premissas estabelecidas anteriormente, para explicar a redução do peso do EPI no jejum, em que associamos o aumento da atividade simpática com

o aumento da lipólise e com a redução do peso, poderíamos fazer a seguinte análise em relação às conseqüências da desnervação sobre o peso do tecido: ao iniciar o jejum, 48 horas antes da avaliação, os animais já se encontravam desnervados (5 dias antes). Com o jejum, o aumento da atividade lipolítica é um fator determinante na redução do peso no lado inervado. No lado desnervado, no entanto, com a interrupção da inervação simpática, que já se encontrava prejudicado antes mesmo do início do jejum (a desnervação aconteceu 7 dias antes da avaliação experimental), o peso adquirido no período alimentado é mantido. Assim, em 48 horas de jejum, esse peso adquirido no período alimentado é mantido no lado desnervado, enquanto o aumento da lipólise pode ter contribuído para a redução do peso no tecido inervado. No entanto, ao analisarmos a quantidade de glicerol liberado (índice de lipólise), podemos constatar que não existe diferença entre a liberação pelos adipócitos do EPI desnervado em relação aos adipócitos do lado inervado. A redução em torno de 50%, observada na atividade da GyK no lado desnervado de animais em jejum em relação ao lado inervado (Tabela XIII e Figura11), poderia contribuir na redução da reciclagem do glicerol e portanto com a manutenção na liberação do glicerol. Entretanto, a baixa atividade desta enzima no TAB, nos induz a acreditar que outros fatores, que não a redução da lipólise, poderiam estar contribuindo mais significativamente para a manutenção do peso do tecido. O fato de outros estímulos lipolíticos (glucagon, adrenalina) continuarem atuando no tecido desnervado, dão sustentação aos dados do glicerol, de que a atividade lipolítica continua alta no tecido desnervado de animais em jejum. Um aspecto não avaliado neste trabalho até o momento, e que poderia estar contribuindo para a manutenção do peso do tecido, é o papel inibitório do SNS sobre a proliferação dos adipócitos, outro fator determinante na definição da massa do

tecido adiposo. Cousin e colaboradores (1993) observaram aumento no conteúdo de DNA, 7 dias após a desnervação do RETRO e, aumento no número de células após 4 semanas. Aumento também no número de adipócitos foi encontrado por Youngstrom e Bartness (1998) no tecido adiposo inguinal após 11 semanas de desnervação. Bowers e colaboradores (2004), encontraram aumento no peso e no número de adipócitos no RETRO após 5 semanas de desnervação. Embora não haja dados na literatura sobre a variação temporal destes parâmetros no EPI, não podemos deixar de considerar que a desnervação foi um procedimento realizado 7 dias antes da avaliação, de tal forma que muitas destas alterações já estariam em curso no tecido desnervado quando da instalação do jejum. Assim sendo, parece pouco provável que apesar de estímulos lipolíticos decorrentes do jejum, a redução de peso seja detectável 48 horas após o início da privação de alimentos. Desta maneira, mesmo com a manutenção da lipólise decorrentes dos fatores hormonais do estado de jejum, o peso do tecido do lado desnervado poderia estar preservado no momento da avaliação.

Com a descoberta da inervação sensorial no tecido adiposo branco em 1996 por Giordano e colaboradores, começaram a surgir dúvidas quanto ao fato do SNS ser o único responsável pelo controle da proliferação dos adipócitos, já que a cirurgia de desnervação simpática pode lesar a inervação sensorial do tecido. A possibilidade da contribuição da inervação sensorial no controle da proliferação celular no TAB foi descartada pelo grupo do professor Timothy Bartness em 2006, após a realização de experimentos de desnervação seletiva do sistema sensorial no tecido adiposo inguinal, utilizando a capsaïcina, sem alterações na proliferação de adipócitos. No entanto, quando o tecido foi submetido a uma desnervação simpática cirúrgica houve um aumento de aproximadamente 300% no número de adipócitos; e

quando a desnervação simpática foi realizada quimicamente, utilizando 6-hidroxi-dopamina, o aumento observado foi de 400% (FOSTER e BARTNESS, 2006). O papel do sistema nervoso sensorial no TAB parece ser o de informar ao sistema nervoso central os níveis lipídicos presentes no tecido adiposo do organismo. Com a lipectomia (retirada de parte do tecido adiposo ou de todo ele), o sistema sensorial que inerva o tecido é lesado e a ausência de sinal sensorial do tecido lipectomizado para o cérebro causaria um estímulo que provocaria um aumento compensatório de massa lipídica no tecido intacto (MAUER *et al.*, 2001; SHI e BARTNESS, 2005).

A possível contribuição da inervação parassimpática na definição dos parâmetros avaliados no EPI e RETRO por sua vez, passa primeiro, pela existência da inervação parassimpática nestes tecidos, que se mostra até o momento, bastante controverso. Há alguns anos, estudos têm sido desenvolvidos, sem sucesso, com a finalidade de detectar sinais que indiquem a presença de inervação parassimpática através da constatação de atividade acetilcolinesterásica (enzima responsável pelo catabolismo da acetilcolina, o principal neurotransmissor parassimpático) nos tecidos adiposos (BALLANTYNE, 1968; BALLANTYNE e RAFTERY, 1974). Posteriormente, a presença da inervação parassimpática direta no TAB foi relatada por Kreier *et al.*, (2002 e 2006). Giordano e colaboradores em 2006, após intensa investigação, contestaram a existência de inervação parassimpática no TAB, relatada nos trabalhos de Kreier. Pesquisadores com vasta experiência na investigação da inervação vagal em outros diversos tecidos (estômago, fígado, etc), também contestaram a credibilidade dos achados do grupo de Kreier (BERTHOUD *et al.*, 2006). Até o momento estes dados não foram reproduzidos por nenhum outro grupo científico, permanecendo ainda dúvidas quanto à existência da inervação parassimpática no tecido adiposo branco.



O diabetes é uma situação metabólica com alterações muito semelhante ao jejum. Os efeitos qualitativos e quantitativos do jejum e do diabetes, no peso do EPI, foram muito semelhantes nas duas situações (Tabela VI e Tabela XIV). No entanto, embora tenha ocorrido uma redução na perda de peso no EPI de animais diabéticos com a desnervação, como no jejum, o peso final foi menor que o EPI desnervado de animais alimentados (no jejum, peso do EPI desnervado é semelhante ao peso do EPI desnervado de animais alimentados). Esta diferença quantitativa em resposta à desnervação, poderia ser decorrente dos menores níveis de insulina nos animais diabéticos, favorecendo os processos catabólicos e levando a um menor peso do tecido que os dos animais em jejum.

Ao contrário do jejum e diabetes onde observamos uma redução no peso do EPI e RETRO, animais alimentados com a dieta HCHL do tipo cafeteria tiveram um aumento no peso do EPI (Tabela XXV e Figura 24). Chaves e colaboradores (2006), já haviam constatado aumento no peso do RETRO de animais adaptados a esta dieta. A desnervação não foi capaz de alterar este parâmetro no EPI (Tabela XXV e Figura 24), que acompanhou o comportamento já observado anteriormente no RETRO (dados não publicados). Esta ausência de efeito decorrente da desnervação do tecido, apesar do aumento da atividade simpática, poderia ser explicado pela alta concentração da insulina plasmática (56% a mais do que os animais controles) (CHAVES *et al.*, 2006). Estes achados poderiam sugerir que nos animais HCHL, os fatores metabólicos-hormonais são prevalentes aos neurais em relação ao peso do tecido.

Animais que receberam dieta HP apresentam como no jejum e diabetes, reduzidos níveis de insulina (KETTELHUT *et al.*, 1985). No entanto, essa foi a única situação experimental utilizada neste trabalho, onde temos uma redução da

atividade simpática no EPI (Tabela XX e Figura 18). Desta forma, a falta do estímulo anabólico da insulina é contrabalanceada pela redução do estímulo simpático lipolítico, culminando em um peso menor. O comportamento do peso do EPI nestas condições nos sugere que assim como no jejum e diabetes, o fator hormonal é prevalente ao estímulo neural em relação aos parâmetros avaliados; uma vez que, apesar de menor o estímulo simpático, reduzindo a lipólise, o peso do tecido foi reduzido. Da mesma forma que o EPI, a redução do peso do RETRO e a reduzida atividade simpática em animais adaptados à dieta HP já tinham sido constatados anteriormente por Boschini (2006). O aumento no peso do EPI, tanto no grupo N quanto no grupo HP causada pela desnervação (Tabela XIX e Figura 17), difere dos resultados obtidos no RETRO onde a desnervação simpática não alterou o peso do tecido em animais do grupo HP.

Este e outros achados já mencionados anteriormente mostram diferentes respostas entre o EPI e o RETRO quando submetidos à desnervação. Estas diferentes respostas podem ser atribuídas à diferença de sensibilidade dos tecidos aos fatores hormonais e neurais. Dados recentes da literatura comprovam que o estímulo simpático não é uniforme para todo o organismo. Assim, alguns depósitos de TAB podem receber estímulos mais intensos do que outros, e conseqüentemente apresentar respostas diferentes. Essa variação parece existir também em outras espécies animais. Brito e colaboradores (2008), observaram estas diferenças em depósitos de TAB de *Siberian hamster* em situação de glicoprivação induzida pela administração de 2-desoxi-D-glicose, que culminam com o aumento da atividade simpática nos tecidos adiposos inguinal, dorsal subcutâneo e RETRO. Já o EPI e o tecido adiposo marrom interescapular não sofreram alterações no fluxo simpático nesta situação. Dados destes mesmos autores, no jejum de 16 horas, mostram um

aumento da atividade simpática no tecido adiposo inguinal e EPI, sem alteração no RETRO e em outros tecidos avaliados. A exposição ao frio (5°C) aumentou o estímulo simpático nos tecidos adiposos inguinal, EPI, RETRO e marrom. Já o frio combinado com o jejum de 16 horas aumentou o *turnover* de noradrenalina no tecido adiposo inguinal, RETRO, EPI e marrom (BRITO *et al.*, 2008).

Todos estes achados confirmam que diferentes depósitos de tecido adiposo podem ser ativados diferentemente pelo SNS em animais submetidos à mesma situação. Este fato justifica as diferentes respostas dos tecidos, quando desnervados. Tendo em vista, que as vias de formação de G3P são importantes variáveis na definição do peso do tecido, as observações realizadas até o momento, mostram a complexidade das interações dos fatores regulatórios do anabolismo e do catabolismo lipídico.

## **5.2 Vias de geração de glicerol-3-fosfato**

Dados obtidos em nosso laboratório mostram que o fornecimento adequado de G3P para cada situação é resultante de alterações na velocidade das três vias de geração desta molécula.

Situações onde os níveis de insulina encontram-se reduzidos, a captação de glicose também está diminuída, enquanto a *via* gliceroneogênica está elevada. Já em situações onde os níveis de insulina encontram-se elevados a captação da hexose aumenta e a *via* gliceroneogênica diminuiu. Em todos os nossos modelos, a atividade da gliceroquinase (GyK) parece acompanhar a concentração de insulina plasmática, com exceção do grupo dos animais diabéticos, onde os valores da GyK foram semelhantes aos dos controles.

A desnervação simpática química no EPI alterou a resposta da captação de glicose, somente no grupo dos animais diabéticos, reduzindo-a. Este fato pode ser decorrente dos experimentos nestes animais terem sido realizados *in vitro*, ao contrário da avaliação em outros grupos, que foram realizados *in vivo*.

A gliceroneogênese e a atividade da GyK foram reduzidas pela desnervação. No EPI de animais onde a concentração de insulina plasmática encontra-se baixa, embora tenhamos observado uma redução da via gliceroneogênica pela desnervação, estes valores, mesmos reduzidos, se mantêm maiores aos valores encontrados nos EPI dos animais controles, sugerindo a predominância desta via na geração do G3P. Estes dados suportam a hipótese, levantada por nosso laboratório, de que as vias de geração de G3P são reguladas para manter um suprimento adequado de G3P necessário para a esterificação dos ácidos graxos e armazenamento na forma de TAG.

Dados ainda não publicados de nosso laboratório, utilizando a técnica de dupla marcação ( $^3\text{H}_2\text{O}$  e glicose- $^{14}\text{C}$ ) *in vivo*, que nos permite calcular a *via* gliceroneogênica por diferença entre síntese total e pela *via* glicolítica, mostram que a gliceroneogênese é a principal *via* fornecedora de G3P para o fígado, tecido adiposo marrom (TAM), RETRO e EPI em ratos alimentados com dieta balanceada, ratos jejuados por 48 horas e ratos adaptados a dieta HCHL do tipo cafeteria (CHAVES e KETTELHUT). A contribuição da gliceroneogênese aumenta quando os animais são submetidos ao jejum, este aumento é de 31% no fígado, 18% no TAM, 16% no RETRO e de 21% no EPI. Já com a dieta HCHL do tipo cafeteria a contribuição da gliceroneogênese se mantêm em valores equivalente aos encontrados no tecido de animais que receberam dieta balanceada, no caso do fígado; ou a valores muito menores no caso do RETRO e EPI (CHAVES e

KETTELHUT). Nye e colaboradores também encontraram resultados parecidos e sugerem que a via gliceroneogênica além de ser a predominante na geração de G3P é a responsável pela formação de 90% de todo G3P no EPI e no tecido adiposo mesentérico (NYE *et al.*, 2008).

Embora a gliceroneogênese seja a via predominante na geração de G3P as outras duas vias possuem papel importante na manutenção do estoques de TAG no TAB. Alterações em cada via serão discutidas detalhadamente nos tópicos abaixo.

### 5.2.1 A partir da *vía glicolítica*

Esta via foi avaliada no EPI, pela captação de 2-desoxi-1-[<sup>14</sup>C]-glicose *in vivo* ou *in vitro* (animais diabéticos). O índice de captação de glicose no EPI mostrou-se reduzido nos animais jejuados, diabéticos e adaptados à dieta HP e aumentado no EPI dos animais alimentados com a dieta HCHL. Na literatura é amplamente conhecida a dependência que o processo de captação da glicose, no tecido adiposo e muscular, tem pela insulina, o que explica plenamente os resultados obtidos onde em situações de reduzidos níveis de insulina, observamos uma redução na captação de glicose e vice-versa.

A mesma resposta foi encontrada no RETRO dos animais jejuados (dados obtidos no nosso mestrado), animais alimentados com a dieta HP (BOSCHINI, 2006) e animais alimentados com a dieta HCHL (CHAVES *et al.*, 2006).

A desnervação não alterou o índice de captação de glicose no EPI dos animais jejuados, alimentados com a dieta HCHL ou HP. No EPI dos animais diabéticos a desnervação reduziu a captação da hexose avaliada *in vitro*. Já no RETRO, a desnervação aumentou o índice de captação de glicose nos animais alimentados, jejuados *in vivo* (dados obtidos no mestrado) e nos animais HP

(BOSCHINI, 2006). O mesmo aumento foi encontrado no RETRO de animais diabéticos. Nossos dados corroboram os achados de Lefebvre e colaboradores (1973) que observaram aumento na captação de glicose *in vitro* no RETRO desnervado quando comparado ao tecido contralateral intacto. Os experimentos *in vitro* no RETRO desnervado de animais jejuados não reproduziu a resposta encontrada *in vivo* no mesmo tecido, já que não observamos alteração deste parâmetro *in vitro*, sugerindo que o experimento *in vitro* não reflete todas as alterações causadas pela desnervação *in vivo* e que fatores metabólicos e/ou hormonais parecem exercer um papel importante sobre a captação da hexose, pelo menos no que diz respeito ao RETRO.

A exposição de adipócitos isolados de ratos ao isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) induz uma diminuição na captação de glicose estimulada pela insulina. Este efeito não envolve alteração na atividade do receptor de insulina (tirosina quinase) e pode ser revertido somente se o agonista  $\beta$  adrenérgico for removido após uma hora de sua adição (SANDRA *et al.*, 1987; ARSENIS *et al.*, 1986). Esta inibição adrenérgica do transporte de glicose é dependente principalmente dos receptores  $\beta_3$  adrenérgicos (CARPÉNÉ *et al.*, 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que a estimulação  $\beta$  adrenérgica inibe a captação de glicose em adipócitos 3T3-L1, via  $\beta_2$  e  $\beta_3$  adrenérgicos, por interferir na translocação de GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática (MULDER *et al.*, 2005). Estes achados concordam com a informação de que a diminuição do número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos em adipócitos, pela infusão prolongada de isoproterenol, promove um aumento da sensibilidade das células à ação da insulina, em ratos (GREEN *et al.*, 1996). O efeito inibitório das catecolaminas na utilização de glicose induzida pela insulina (em adipócitos isolados de ratos) tem sido verificado somente

quando estas células são incubadas em baixas concentrações (10 a 300  $\mu\text{U/mL}$ ) de insulina (KIRSCH *et al.*, 1983). Contudo, nossos achados sugerem que a insulina tem papel predominante na captação de glicose comparado com as catecolaminas. As situações experimentais de jejum e diabetes além de apresentarem baixas concentrações de insulina, o que já causa uma redução na captação de glicose, apresentam alta atividade simpática, o que favoreceria uma redução ainda maior na captação da hexose. Porém com a desnervação, retiramos a inibição causada pelas catecolaminas e não encontramos um aumento neste parâmetro. Contrariamente, a desnervação reduziu a captação de glicose no EPI dos animais diabéticos. Vale lembrar que este último experimento foi realizado *in vitro* e a ausência de fatores hormonais e/ou metabólicos podem ter comprometido a resposta.

Recentemente, tem sido relatada na literatura, a importância de fatores de transcrição na regulação da expressão de transportadores de glicose (GLUT). A região promotora do transportador de glicose regulado pela insulina (GLUT4) contém sítios de ligação para muitos fatores de transcrição nuclear, dentre eles estão os PPAR $\gamma$  (receptores de ativação da proliferação de peroxissomas do tipo gama) e o FOXO 1 (Forkhead Box O tipo 1) (ARMONI *et al.*, 2007). Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes e regulam o metabolismo de lipídios e de lipoproteínas, participam da homeostase glicídica e influenciam na proliferação e diferenciação de adipócitos (SPIEGELMAN, 1997). Os AG e drogas hipoglicêmicas (drogas da família tiazolidinedionas – TZD) são potentes ligantes dos PPAR $\gamma$  e ajudam a regular o metabolismo lipídico e a homeostase glicídica. Trabalhos com cultura de adipócitos primários têm mostrado que na ausência de ligantes (PPAR $\gamma$  na forma não-ligada), os PPAR $\gamma$  se ligam à região promotora do GLUT4, reduzindo a expressão desta proteína. Já na presença de TZD, os PPAR $\gamma$  se ligam a esta

substância, diminuindo a repressão de GLUT4, aumentando a sua expressão e conseqüentemente a resposta do tecido à ação da insulina (ARMONI *et al.*, 2003). FOXO é um dos principais fatores de transcrição envolvidos na cascata intracelular de sinalização da insulina, já que sua atividade pode ser inibida pela fosforilação catalisada pela proteína AKT. FOXO1 quando fosforilado (Thr24, Ser256 e Ser319) é impedido de entrar no núcleo, não exercendo o seu papel na transcrição gênica (TRAN *et al.*, 2003). FOXO1 reprime a transcrição de PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2 sendo este efeito dose-dependente. Quando FOXO1 é fosforilado, ou seja na presença de insulina, esse efeito repressor de FOXO1 é impedido, permitindo a transcrição normal desses fatores de transcrição (ARMONI *et al.*, 2006). Podemos aventar a hipótese que em situações onde os níveis de insulina estão altos como na dieta HCHL, bem como os ligantes de PPAR $\gamma$  como os AGs, a transcrição de GLUT4 pode estar aumentada facilitando a captação da hexose no EPI. Já nos grupos de animais que apresentam baixos níveis de insulina plasmáticos (jejum, diabetes e HP), a atividade de FOXO1 está provavelmente aumentada no núcleo dos adipócitos no EPI, portanto menor a transcrição de PPAR $\gamma$  e menor repressão da expressão de GLUT4. Contudo, vale lembrar, que esta proteína é um transportador de glicose dependente da ação da insulina. Situações experimentais que apresentam redução da concentração deste hormônio conseqüentemente apresentam reduzida cascata de sinalização da insulina e provavelmente redução da translocação de vesículas contendo GLUT4 para a membrana, assim apesar do provável aumento da transcrição deste composto a captação não será alterada ou se manterá diminuída em situações de reduzida insulina.

Assim podemos sugerir que a insulina possui papel predominante na captação de glicose no EPI e que o sistema nervoso simpático parece não interferir



neste processo, desempenhando um papel estimulatório somente em situações de deficiência insulínica (diabetes), contudo não podemos excluir a importância de outros fatores hormonais e/ou metabólicos para a manutenção desta resposta.

### 5.2.2 A partir da *via* gliceroneogênica

A *via* da gliceroneogênese, avaliada pela velocidade de incorporação de 1-<sup>[14C]</sup>-piruvato em glicerol de TAG e pela atividade da PEPCK, mostrou-se aumentada no EPI de animais jejuados, diabéticos e alimentados com a dieta HP. Já os animais alimentados com a dieta HCHL apresentam redução na gliceroneogênese. Os mesmo achados foram encontrados no RETRO na situação de jejum e diabetes (dados obtidos no nosso mestrado) e nos grupos tratados com as dietas HP (BOSCHINI, 2006) ou HCHL (CHAVES *et al.*, 2006).

Estudos pioneiros da literatura, realizados *in vitro*, mostraram que o tecido adiposo poderia sintetizar G3P pela *via* gliceroneogênica (BALLARD *et al.*, 1967b) e que ocorre um aumento significativo desta *via*, bem como um aumento na atividade da PEPCK, enzima chave da *via* gliceroneogênica em situações catabólicas como jejum e diabetes. Estes trabalhos sugeriam que o aumento da gliceroneogênese no jejum e diabetes, teria por finalidade inibir a liberação excessiva de AGs do tecido adiposo para a circulação, evitando assim um aumento na produção hepática de corpos cetônicos e cetoacidose (RESHEF *et al.*, 1970).

A hipótese de uma possível relação positiva entre lipólise e gliceroneogênese no TAB é sugerida por alguns trabalhos. Reshef e colaboradores em 1970 observaram que animais diabéticos e jejuados, que mostram atividade lipolítica aumentada, apresentavam uma gliceroneogênese elevada. Camundongos com deficiência (nocautes) da lipase hormônio sensível, enzima responsável pela

hidrólise do TAG, apresentam atividade lipolítica reduzida concomitante com uma baixa atividade da PEPCK (ZIMMERMANN *et al.*, 2004). No entanto, estudos do nosso laboratório conflitam com a hipótese de que a lipólise e gliceroneogênese estejam diretamente relacionadas. Dados do laboratório com animais submetidos à dieta HP, apresentam aumento da gliceroneogênese no RETRO (BOTION *et al.*, 1998), baixa atividade simpática no RETRO (BOSCHINI, 2006) e redução da lipólise basal no TAB destes animais (KETTELHUT *et al.*, 1985; MARTINS-AFFÉRI *et al.*, 2004). Já animais alimentados com uma dieta HCHL do tipo cafeteria apresentam alta atividade simpática no TAB e reduzida atividade gliceroneogênica (CHAVES *et al.*, 2006)

Trabalhos da literatura sugerem que os AGs, principalmente insaturados de cadeia longa, estimulam a transcrição da PEPCK tanto em adipócitos 3T3-F442A (ANTRAS-FERRY *et al.*, 1994), quanto em adipócitos normais (DUPLUS *et al.*, 2002). Tordjman e colaboradores em 2004 mostraram que cultura de adipócitos (3T3-F442A) incubados com agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol) e expostos a AGs monoinsaturados apresentam aumento do mRNA da PEPCK e de sua atividade. Esse aumento da expressão da PEPCK pode ser devido à ação de fatores de transcrição, como o PPAR $\gamma$ , que parecem ser sensíveis à presença de AGs (TONTONNOZ *et al.*, 1995). Nessas condições, o aumento da atividade simpática nos adipócitos e o aumento da lipólise com mobilização de AGs, podem estimular a expressão e a atividade da PEPCK, via PPAR $\gamma$ . Fato que estaria facilitado em animais jejuados, diabéticos e alimentados com a dieta HCHL. No entanto, nesta última situação experimental, surpreendentemente a gliceroneogênese encontra-se reduzida.

Hopgood e colaboradores (1973) mostraram o aumento da atividade e síntese da PEPCK no fígado e tecido adiposo de animais submetidos ao jejum, que quando realimentados, paralelamente ao aumento da insulinemia, apresentavam redução na atividade da enzima. Esta observação nos mostra o efeito agudo da insulina inibindo a expressão e atividade da PEPCK. Dados obtidos no nosso laboratório reforçam esta relação inversa entre insulina e PEPCK. Nos animais adaptados à dieta HCHL, onde há um aumento nos níveis plasmáticos de insulina, há uma redução da gliceroneogênese no RETRO e EPI (CHAVES *et al.*, 2006). Além destes efeitos da insulina inibindo a PEPCK, dados do nosso laboratório indicam ainda, que a própria glicose (5 mM) pode inibir o fluxo gliceroneogênico *in vitro*, avaliado pela incorporação de 2-[<sup>14</sup>C]-piruvato em glicerol de TAG, em adipócitos do RETRO de ratos adaptados à dieta HP, (BOTION *et al.*, 1995). Estes achados ajudam-nos a explicar a alta atividade gliceroneogênica no EPI de animais jejuados e diabéticos e a reduzida atividade gliceroneogênica no EPI de animais HCHL.

Recentemente, foram relatados na literatura outros fatores de transcrição que regulam a expressão da PEPCK no tecido adiposo além do PPAR $\gamma$ , como C/EBP $\beta$  (CAAT/enhancer binding protein), FOXO 1, SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) e CBP (CREB binding protein). A C/EBP $\beta$  é um dos fatores de transcrição regulados pela insulina. Este fator possui duas isoformas que são expressas de acordo com o estado hormonal e dietético do organismo, sendo C/EBP $\beta$ -C1 a forma inibitória e C/EBP $\beta$ -B1 a isoforma estimulatória da transcrição do gene da PEPCK. A insulina aumenta a concentração de C/EBP $\beta$ -C1 através da via de sinalização da PI3K. No entanto, a repressão mediada pela insulina da transcrição do gene da PEPCK pelo fator C/EBP $\beta$ -C1 não ocorre de forma imediata, necessitando cerca de 60 e 120 minutos para alterar a expressão gênica, e requer a

ligação deste fator de transcrição a uma série de sítios na região promotora do gene da PEPCK. Já o FOXO1 parece ativar a expressão da PEPCK. Este fator de transcrição, quando superexpresso no fígado de camundongos, aumenta a expressão dessa enzima tanto *in vivo* como *in vitro* (hepatócitos isolados) aumentando a neoglicogênese (ZHANG *et al.*, 2006). Nakae e colaboradores utilizando camundongos transgênicos que continham a proteína FOXO1 com serina 256 substituída por outro aminoácido não fosforilável, mostraram que FOXO mutante se localizava permanentemente no núcleo, causando após 6 meses resistência à insulina avaliada por teste de tolerância a glicose intraperitoneal (IPGTT) e teste de tolerância à insulina intravenoso (ITT) (NAKAE *et al.*, 2002). Vale lembrar que FOXO é um dos principais fatores de transcrição envolvidos na cascata intracelular de sinalização da insulina e sua atividade pode ser inibida pela fosforilação catalisada pela proteína AKT. O papel de FOXO1 no TAB ainda não é claro, porém trabalhos têm mostrado sua importância na regulação da transcrição de várias proteínas relacionadas ao metabolismo glicídico e lipídico. Tanto o PPAR $\gamma$  como o FOXO1 foram inicialmente relacionados, como importantes componentes da regulação da diferenciação de adipócitos, posteriormente é que lhe foram atribuídas, importância na regulação da transcrição de proteínas no tecido já maduro. SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein), outro fator de transcrição, bloqueia a estimulação da transcrição da PEPCK induzida pelo CBP (CREB binding protein), coativador transcricional crítico na estimulação da expressão gênica da PEPCK induzida pelo AMPc. Há dados demonstrando que a superexpressão da SREBP-1c no tecido adiposo causa lipodistrofia em camundongos transgênicos (CHAKRAVARTY *et al.*, 2005; CHAKRAVARTY e HANSON, 2007). Portanto vários podem ser os fatores de transcrição reguladores da expressão da PEPCK.

Com a retirada do estímulo simpático pela desnervação no EPI, a concentração de catecolaminas é reduzida no tecido, bem como os níveis AMPc, portanto a expressão da PEPCK via CBP estaria reduzida, levando a uma diminuição na atividade da enzima, fato que foi observado em todas as situações experimentais estudadas. Além disso, a redução da enzima com a desnervação ocasionou conseqüentemente redução da incorporação de piruvato em glicerol de TAG, resposta encontrada no EPI dos animais jejuados, diabéticos e alimentados com a dieta HCHL. A incorporação de piruvato em glicerol de TAG no EPI dos animais HP não foi alterada pela desnervação. Contudo vale ressaltar que a desnervação causou uma redução pequena na atividade da PEPCK (27%) no EPI dos animais HP, quando comparada com as outras situações experimentais estudadas, onde a redução causada pela desnervação foi muito maior (jejum 76%, diabetes 70% e HCHL 44%).

Assim podemos sugerir que existe um “*crosstalk*” entre a insulina e a catecolamina para a manutenção da gliceroneogênese no EPI, a insulina mantendo seu papel inibitório e as catecolaminas estimulando a atividade desta via.

### **5.2.3 A partir da atividade da gliceroquinase**

Apesar de apresentar uma baixa atividade no TAB e de ser geralmente considerada funcionalmente desprezível nesse tecido, diversos achados sugerem que a GyK contribui na geração de glicerol de TAG no TAB. Estudos realizados há cerca de duas décadas, pouco citados na literatura, mostram haver uma correlação positiva entre a atividade da GyK no TAB e diferentes tipos de obesidade (STERN *et al.*, 1983 e CHAKRABARTY *et al.*, 1984). Ratos Zucker obesos (fa/fa), camundongos obesos ob/ob e camundongos com obesidade induzida por aurotioglicose,

apresentam aumento na atividade de GyK no TAB, correlacionado positivamente com o peso corporal e o tamanho dos adipócitos nessas situações (STERN *et al.*, 1983).

Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que tanto a atividade quanto a expressão da GyK no TAM estão sob controle direto do sistema nervoso simpático (KAWASHITA *et al.*, 2002; FESTUCCIA *et al.*, 2003). A exposição ao frio de 4°C, onde ocorre aumento do fluxo simpático para o TAM, promove elevação tanto da expressão quanto da atividade da GyK. Após a desnervação simpática cirúrgica desse tecido, a atividade da enzima é reduzida aos valores de animais mantidos à temperatura ambiente. Efeitos semelhantes sobre a atividade e a expressão da GyK no TAM foram obtidos pela infusão prolongada de noradrenalina e também de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, sendo esses efeitos inibidos por  $\beta$ -antagonistas, mas não por antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (FESTUCCIA *et al.*, 2003). Nos ratos adaptados à dieta hiperprotéica, em que o fluxo simpático para o TAM encontra-se reduzido (BRITO *et al.*, 1998), a atividade da GyK também mostra-se reduzida. A desnervação simpática do TAM de ratos HP, reduz ainda mais, a atividade da GyK (KAWASHITA *et al.*, 2002).

A atividade da GyK apresentou-se reduzida no EPI dos animais jejuados e alimentados com a dieta HP (Figura 11 e 23), mesmo com o conhecido aumento do turnover de noradrenalina no TAB de animais jejuados. A reduzida atividade da GyK no RETRO de ratos em jejum, já tinha sido constatado anteriormente (Tabela XIII e Figura 11). Os animais alimentados com a dieta HP apresentaram redução do turnover de noradrenalina no EPI (Figura 18) e no RETRO (BOSCHINI, 2006), o que estaria de acordo com a reduzida atividade da enzima. Nos animais diabéticos a atividade GyK não foi alterada no EPI, contudo apresentou-se reduzida no RETRO.

Diferente do encontrado em todas as outras situações experimentais estudadas, a atividade da GyK mostrou-se aumentada no EPI dos animais que receberam a dieta HCHL do tipo cafeteria (Tabela XXIX e Figura 29), que acompanha o aumento do turnover de noradrenalina tecidual observado neste tecido. Esta mesma relação direta entre a GyK e atividade simpática é observada no RETRO, onde há aumento da atividade simpática e aumento da GyK (CHAVES *et al.*, 2006).

Com exceção do grupo jejuado e diabético, a atividade da GyK acompanhou a aumentada ou diminuída atividade simpática dos tecidos. Este comportamento da GyK, nos sugere que outro, ou outros fatores, podem estar contribuindo no controle da atividade da enzima. Os animais jejuados e diabéticos, onde a atividade desta enzima se encontra reduzida, mesmo com aumento do fluxo simpático, apresentam em comum os reduzidos níveis de insulina. Apesar da manutenção da atividade da GyK no EPI de animais diabéticos, não podemos excluir a insulina como um possível modulador da atividade da GyK no TAB.

A desnervação simpática reduziu o conteúdo de noradrenalina no RETRO e no EPI, bem como a atividade da GyK em todos os grupos estudados. Observação semelhante foi realizado por outros autores, após a desnervação do RETRO de animais alimentados com a dieta HCHL (CHAVES *et al.*, 2006) e animais alimentados com a dieta HP (BOSCHINI, 2006). Assim, estes dados reforçam a hipótese da importância do sistema nervoso simpático no controle da atividade da gliceroquinase também no TAB, estimulando a atividade da GyK. Dados não publicados de nosso laboratório mostram um aumento da atividade da GyK no RETRO, após infusão prolongada de noradrenalina e de agonista  $\beta_3$ -adrenérgico. Estes achados sugerem que o possível efeito da estimulação simpática na atividade

da GyK do TAB parece ser mediada, assim como no TAM, por receptores adrenérgicos do tipo  $\beta_3$  (BOSCHINI, 2006).

As proteínas aquagliceroporinas (AQP), assim como a GyK, tem sido associadas ao metabolismo de glicerol. Estas proteínas são transportadoras de água e pequenas moléculas neutras como o glicerol. Existem 4 diferentes tipos de AQP: 3,7,9 e 10 que são diferentemente expressas em quase todos os tipos de células e tecidos; mas principalmente, em adipócitos, no trato urinário, respiratório, gastrointestinal, músculos esquelético e cardíaco, fígado, cérebro e medula espinhal (TAKATA *et al.*, 2004 e ROJEK *et al.*, 2008). A AQP do subtipo 7 (AQP7) é o tipo presente no tecido adiposo e alterações na expressão desse canal parecem estar relacionadas as alterações, tanto o metabolismo de lipídios como o de carboidratos.

Camundongos nocautes para AQP7, submetidos ao jejum apresentam baixos níveis de glicerol plasmático, quando comparados a camundongos controles jejuados, entretanto o conteúdo de glicerol no interior do adipócitos é significativamente maior que o conteúdo encontrado nos adipócitos dos animais controles. Esses animais nocautes também apresentam baixas concentrações de glicose plasmática quando comparados aos controles jejuados, mostrando uma dificuldade de manutenção da glicemia de jejum, sugerindo assim um papel importante do glicerol como substrato da neoglicogênese hepática (MAEDA *et al.*, 2004). Animais nocautes para AQP7 tornam-se obesos após 12 semanas de vida, acompanhados de uma hipertrofia nos adipócitos devido ao aumento dos estoques de TAG e instalação da resistência à insulina (HIBUSE *et al.*, 2005 e HARA-CHIKUMA *et al.*, 2005).

Adipócitos 3T3-L1 nocautes para AQP7 apresentam altas concentrações intracelulares de glicerol, elevada atividade da GyK, aumento das concentrações de



G3P e da captação de ácidos graxos, resultando em um aumento dos estoques de TAG no interior do adipócito (HIBUSE *et al.*, 2005). A insulina é um potente inibidor da expressão da AQP7, graças à existência de um elemento de resposta negativo à insulina, localizado na região promotora do gene da AQP7 observado em adipócitos 3T3-L1 (KISHIDA *et al.*, 2001). Contrariamente, o PPAR $\gamma$  quando ativado forma um heterodímero com o receptor do ácido retinóico X alfa (RXR $\alpha$ ) e liga-se no elemento responsivo ao PPAR $\gamma$  na região promotora do gene da AQP7, causando aumento da expressão do seu mRNA (KISHIDA *et al.*, 2001a). FOXO1 quando superexpresso e em alta concentração no núcleo dos hepatócitos de ratos provoca um aumento de 2,5 vezes na expressão da AQP 9 (ZHANG *et al.*, 2006), porém não existem ainda, relatos se FOXO1 desempenha esse mesmo papel no controle da AQP7 no TAB. As catecolaminas parecem facilitar a translocação da AQP7 da periferia nuclear para a membrana plasmática do adipócito, sem contudo alterar a sua expressão (KISHIDA *et al.*, 2000). Trabalhos com adipócitos isolados de camundongos mostram um aumento da translocação e da expressão desta proteína para a membrana celular em situações que ocorrem um aumento da atividade lipolítica, facilitando a saída do glicerol (KISHIDA *et al.*, 2000; MAEDA *et al.*, 2004; HIBUSE *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2007).

Vale lembrar que, com exceção do EPI dos animais diabéticos, a atividade da GyK acompanhou os níveis de insulina encontrado nas diferentes situações experimentais estudadas. Como a insulina é um potente inibidor da expressão de AQP7, nas situações de jejum, diabetes e alimentados com a dieta HP, onde os níveis de insulina encontram-se baixos, provavelmente esteja ocorrendo um aumento da transcrição desta proteína facilitando a saída do glicerol do TAB. Na situação de jejum onde a atividade simpática está aumentada, temos provavelmente

uma facilitação ainda maior na liberação deste composto. No TAB dos animais que receberam a dieta HCHL do tipo cafeteria, apesar de apresentarem atividade simpática aumentada o que poderia facilitar a translocação desta proteína para membrana, os níveis de insulina encontram-se altos nestes animais o que causaria provavelmente uma inibição da expressão da AQP7, reduzindo a liberação de glicerol para o exterior do adipócitos.

Assim podemos supor que além do “*crosstalk*” insulina-catecolamina, parece existir um controle da atividade da GyK dependente da concentração do substrato (glicerol) no interior do adipócito. Nada impede, que este controle já observado em leveduras, onde a atividade da GyK varia conforme a concentração de glicerol no interior da célula, possa ocorrer também no TAB ou em outras células de outros seres vivos.

## **Conclusões**

Os dados deste trabalho corroboram a hipótese que existe um controle recíproco entre as vias de geração de G3P, principalmente entre a via glicolítica e a gliceroneogênese, independente da atividade da gliceroquinase.

A formação de G3P no TAB epididimal a partir da: a) *via* glicolítica é estimulada pela insulina. A ação estimulatória do SNS se torna evidente apenas em situações de deficiência insulínica, como no diabetes; b) *via* gliceroneogênica é inibida pela insulina e atividade pelo SNS; c) *via* de fosforilação direta do glicerol (GyK) parece depender principalmente da inervação simpática no tecido adiposo, além de fatores hormonais e/ou metabólicos.

---

Desta forma, podemos sugerir que existe uma interação entre a atividade do SNS e os níveis de insulina no controle das vias de geração de G3P no EPI de ratos, entretanto não podemos excluir a possibilidade de outros fatores hormonais e/ou metabólicos também interferirem nestes processos.

As informações obtidas neste trabalho, juntamente com as obtidas na nossa dissertação de mestrado, sugerem que o TAB tanto RETRO como EPI, independente da situação experimental do animal, tem o objetivo de manter os estoques de TAG, para isso alteram as atividades das vias de geração de G3P, mantendo um suprimento adequado e contínuo deste composto, molécula essencial para a formação do TAG.

Vale a pena também ressaltar que o EPI parece ser menos responsivo as condições energéticas sistêmicas que o RETRO, provavelmente para fornecer energia aos tecidos locais, como testículos e glândulas anexas.

Para melhor entendermos este “*crosstalk*” seria interessante analisarmos os mecanismos moleculares de interação hormonal entre a insulina e a catecolamina no controle das vias de geração de G3P.

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 6. Referências Bibliográficas

**Antras-Ferry, J.; Le Bigot, G.; Robin, P.; Robin, D.; Forest, C.** Stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 385-391, 1994.

**Armoni, M.; Harel, C.; Karni, S.; Chen, H.; Bar-Yoseph, F.; Ver, M. R.; Quon, M. J.; Karnieli, E.** FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and -gamma2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 281(29):19881-91, 2006.

**Armoni, M.; Harel, C.; Karnieli, E.** Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 18(3):100-7, 2007.

**Armoni, M.; Kritz, N.; Harel, C.; Bar-Yoseph, F.; Chen, H.; Quon, M. J.; Karnieli, E.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. *J Biol Chem.* 278(33):30614-23, 2003.

**Arsenis, G.; Livingston, J.N.** Isoproterenol reduces insulin stimulation of hexose uptake by rat adipocytes via a postinsulin binding alteration. *Endocrinology* 119: 50-57, 1986.

**Bachelard, H.S.; Clarck, A.G.; Thompson, M.F.** Elucidation of reaction mechanisms by substrates and dead end inhibitor kinetic analysis. *Biochem. J.* 123: 707-715, 1971.

**Ballantyne, B.** Histochemical and biochemical aspects of cholinesterase activity of adipose tissue. *Archives Internation Pharmacodynamie Therapie*, 173: 343-350, 1968.

**Ballantyne, B.; Raftery, A. T.** The intrinsic autonomic innervation of white adipose tissue. *Cytobios*, 10: 187-197, 1974.

**Ballard, F.J.; Hanson, R.W.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem. J.* 104: 866-871, 1967. a

**Ballard, F.J.; Hanson, R.W.; Leveille, G.A.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase and synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 242: 2746-2750, 1967. b

**Bartness, T.J.** Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. *The Journal of Clinical Investigation*, 110: 1235-1237, 2002.

**Belfrage, P.; Fredrikson, G.; Nilsoon, N.O.; Stralfors, P.** Regulation of adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int. J. Obes.* 5: 635-641, 1981.

**Belfrage, P.; Vaughan, M.** Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lipid Res.* 10: 341-4, 1969.

**Berthoud, H. R.; Fox, E. A.; Neuhuber, W. L.** Vagaries of adipose tissue innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(5):R1240-2, 2006.

**Bidder, T.G.J.** Hexose translocation across blood brain interface configural aspects. *Neurochem.* 15: 867-874, 1968.

**Boschini, R.P.** *Controle da geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos – Papel do sistema nervoso simpático.* Ribeirão Preto, 2006, 66p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**Botion, L.M.; Brito, M.N.; Brito, N.A.; Brito, S.R.C.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 47: 1217-1221, 1998.

**Botion, L. M.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm Metab Res.* 27(7):310-3,1995.

**Bowers, R.R.; Festuccia, W.T.L.; Song, C.K.; Shi, H.; Migliorini, R.H.; Bartness, T.J.** Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286: R1167-R1175, 2004.

**Brilo, M.N.; Brito, N.A.; Garófalo, M.A.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Sympathetic activity in brown adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *J Auton Nerv Syst.* 69(1):1-5, 1998.

**Brilo, N.A.; Brito, M.N.; Bartness, T.J.** Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294(5):R1445-52, 2008.

**Brito, S.R.C.; Festuccia, W.L.; Kawashita, N.H.; Moura, M.F.; Xavier, A.R.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty-acids. *Metabolism* 55: 84-89, 2006.

**Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Brito, M.N.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 50: 1208-1212, 2001.

**Cantu, R.; Goodman, M.** Effects of denervation and fasting on white adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 212(1): 207-212, 1967.

**Carpéné, C.; Chalaux, E.; Lizarbe, M.; Estrada, A.; Mora, C.; Palacin, M.; Zorzano, A.; Lafontan, M.; Testar, X.**  $\beta_3$ -adrenergic receptors are responsible for the adrenergic inhibition of insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *Biochem. J.* 296: 99-105, 1993.

**Chakrabarty, K.; Tauber, J.W.; Sigel, B.; Bombeck, C.T.; Jeffay, H.** Glycerokinase activity in human adipose tissue as related to obesity. *Int J Obes.* 8(6):609-22, 1984.

**Chakravarty, K.; Cassuto, H.; Reshef, L.; Hanson, R.W.** Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40(3):129-54, 2005.

**Chakravarty, K.; Hanson, R.W.** Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-c gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nutr Rev.* 65:S47-56, 2007

**Chaves, V.E.** *Efeitos da dieta hipercalórica e do sistema nervoso simpático na geração de glicerol-3-fosfato nos tecidos adiposos branco e marrom de ratos.* Ribeirão Preto, 2008, 140p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**Chaves, V.E.; Frasson, D; Martins-Santos, M.E.; Boschini, R.P.; Garófalo, M.A.R.; Festuccia, W.T.L.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. *J.Nutr.* 136: 2475-2480, 2006.

**Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ.** Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275 : 5011–5015, 2000.

**Costa, E.; Boullin, D.J.; Hammer, W.; Vogel, W.; Brodie, B.B.** Interactions of drugs with adrenergic neurons. *Pharmacol. Rev.* 18: 577-597, 1966.

**Cousin, B.; Casteilla, L.; Lafontam, M.; Ambid, L.; Langin, D.; Berthault, M.; Penicaud, L.** Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology*, 133: 2255-2262, 1993.

**Dole, V.P.; Meinertz, H.** Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235: 2595-2599, 1960.

**Duplus, E.; Glorian, J.; Tordjman, J.; Berge, R.; Forest, C.** Evidence for selective induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by unsaturated and nonmetabolized fatty acids in adipocytes. *J. Cell Biochem.* 85: 651-661, 2002.

**Ferré, P.; Leturque, A.; Brunol, A.F.; Penicaud, L.; Girard, J.** A method to quantify glucose utilization *in vivo* in skeletal muscle and white adipose tissue of anesthetized rat. *Biochem. J.* 228: 103-110, 1985.

**Festuccia, W.T.L.; Guerra-Sá, R.; Kawashita, N.H.; Garófalo, M.A.R.; Evangelista, E.A.; Rodrigues, V.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1536-R1541, 2003.

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

**Foretz, M.; Guichard, C.; Ferre, P.; Fofelle, F.** Sterol regulatory element binding protein 1c is a major of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12737-12742, 1999.

**Foster, M.T.; Bartness, T.J.** Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291(6):R1630-7, 2006.

**Franckhauser, S.; Munoz, S.; Pujol, A.; Casellas, A.; Riu, E.; Otaegui, P.; Su, B.; Bosch, F.** Increased fatty-acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 51: 624-630, 2002.



**Frasson, D.** *Papel do sistema nervoso simpático na captação de glicose e na gliceroneogênese no tecido adiposo branco.* Ribeirão Preto, 2005, 67p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Roselino, J.E.S.; Migliorini, R.H.** Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Autonomic Nerv. Syst.* 60: 206-208, 1996.

**Giordano, A.; Song, C. K.; Bowers, R. R.; Ehlen, J. C.; Frontini, A.; Cinti, S.; Bartness, T.J.** White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(5):R1243-55, 2006.

**Gorin, E.; Tal-Or, Z.; Shafrir, E.** Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and tiamcinolone treated rats. *Eur. J. Biochem.* 8: 370-375, 1969.

**Green, A.; Carroll, R.M.; Dobias, S.B.** Desensitization  $\beta$ -adrenergic receptors in adipocytes causes increased insulin sensitivity of glucose transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 271: E271-E276, 1996.

**Griffin, M.J.; Sul, H.S.** Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life* 56: 595-600, 2004.

**Haemmerle, G.; Zimmermann, R.; Hayn, M.; Theussl, C.; Waeg, G.; Wagner, E.; Sattler, W.; Magin, T.M.; Wagner, E.F.; Zechner, R.** Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277: 4806–4815, 2002.

**Hara-Chikuma, M. ; Sohara, E.; Rai, T.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Sasaki, S.; Uchida, S.; Verkman, A.S.** Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol. Chem.* 280 : 15493-15496, 2005.

**Harms, P.G.; Ojeda, S.R.** A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Physiol.* 36(3): 391-392, 1974.

**Hausman, D.B.; DiGirolamo, M.; Bartness, T.; Hausman, G.J.; Martin, R.J.** The biology of white adipose tissue proliferation. *Obesity reviews* 2: 239-254, 2001.

**Hibuse T. et al.** Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 10993-10998, 2005.

**Hillgartner, F.B.; Salati, L.M.; Goodridge, A.L.** Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acids synthesis. *Physiol. Reviews* 75: 47-76, 1995.

**Holm C.** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1120–1124, 2003.

**Hopgood, M.F.; Ballard, F.J.; Reshef, L.; Hanson, R.W.** Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase in rat liver adipose tissue. *Biochem. J.* 134: 445-453, 1973.

**Horton, R.W.; Medrum, B.S.; Bachelard, H.S.** Enzymatic and cerebral metabolic effects of 2-deoxyglucose. *J. Neurochem.* 21: 507-520, 1973.

**Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Duncan, R.E.; Ahmadian, M.; Sul, H.S.** Regulation of Triglyceride Metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293: G1–G4, 2007.

**Jones, D.D.; Ramsay, T.G.; Hausman, G.J.; Martin, R.J.** Norepinephrine inhibits rat preadipocyte proliferation. *International Journal of Obesity*, 16: 349-354, 1992.

**Kalhan, S. C.; Mahajan, S.; Burkett, E.; Reshef, L.; Hanson, R. W.** Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J. Biol. Chem.* 276: 12928-12931, 2001.

**Kawashita, N.H.; Festuccia, W.T.L.; Brito, M.N.; Moura, M.A.F.; Brito, S.R.C.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 282: R1185-R1190, 2002.

**Kersten S.** Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* 2: 282-286, 2001.

**Kettelhut, I.C.; Foss, M.C.; Migliorini, R.H.** Lipolysis and the antilipolytic effect of insulin in adipocytes from rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism* 34: 69-73, 1985.

**Kipnis, D.M.; Cori, C.F.** Studies of tissue permeability. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm. *J.Biol.Chem.* 234: 171-177, 1959.

**Kirsch, D.M.; Baumgarten, M.; Deufel, T.; Rinninger, F.; Kemmler, W.; Häring, H.U.** Catecholamine-induced insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 216: 737-745, 1983.

**Kishida, K. ; Kuriyama, H. ; Funahashi, T. ; Shimomura, I. ; Kihara, S. ; Ouchi, N. ; Nishida, M. ; Nishizawa, H. ; Matsuda, M. ; Takahashi, M. ; Hotta, K. ; Nakamura, T. ; Yamashita, S. ; Tochino, Y. ; Matsuzawa, Y.** Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem.* 275 : 20896-20902, 2000.

**Kishida, K. ; Shimomura, I. ; Kondo, H. ; Kuriyama, H. ; Makino, Y. ; Nishizawa, H. ; Maeda, N. ; Matsuda, M. ; Ouchi, N. ; Kihara, S. ; Kurachi, Y. ; Funahashi, T. ; Matsuzawa, Y.** Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J Biol Chem.* 276 (39): 36251-60, 2001.

**Kishida, K. ; Shimomura, I. ; Nishizawa, H. ; Maeda, N. ; Kuriyama, H. ; Kondo, H. ; Matsuda, M. ; Nagaretani, H. ; Ouchi, N. ; Hotta, K. ; Kihara, S. ; Kadowaki, T. ; Funahashi, T. ; Matsuzawa, Y.** Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 276: 48572 - 48579, 2001a.

**Kraemer, F.B.; Shen, W.J.** Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43:1585–1594, 2002.

**Kreier, F.; Fliers, E.; Voshol, P. J.; Van Eden, C. G.; Havekes, L. M.; Kalsbuk, A.; Van Heijningen, C. L.; Sluiter, A. A.; Mettenleiter, T. C.; Romijn, J. A.; Sauerwein, H. P.; Buijs, R. M.** Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat: function implications. *J. Clin. Invest.*, 110: 1243-1250, 2002.

**Kreier, F.; Kap, Y. S.; Mettenleiter, T.C.; Van Heijningen, C.; Van Der Vliet, J.; Kalsbeek, A.; Sauerwein, H. P.; Fliers, E.; Romijn, J. A.; Buijs, R.M.** Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology* 147: 1140–1147, 2006.

**Krstulovic, A.M.** Investigations of catecholamines metabolism using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 35: 207-210, 1982.

**Langin D.** Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biol.* 329:598–607; discussion 653–55, 2006.

**Lefebvre, P.; Luyckx, A.; Bacq, Z.M.** Effects of denervation on the metabolism and the response to glucagons of white adipose tissue of rats. *Hormone and Metabolic Research*, 5: 245-250, 1973.

**Londos, C.; Honnor, R.C.; Dhillon, G.S.** 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.* 260:15139–15145, 1985.

**Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 139: 265-275, 1951.

**Maeda, N.; Funahashi, T.; Hibuse, T.; Nagasawa, A.; Kishida, K.; Kuriyama, H.; Nakamura, T.; Kihara, S.; Shimomura, I.; Matsuzawa, Y.** Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17801- 17806, 2004.

**Martins-Afférri, M.P.; Festuccia, W.T.L.; Navegantes, L.C.C.; Garófalo, M.A.R.; Botion, L.M.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Response to intra- and extracellular lipolytic agents and hormone-sensitive lipase translocation are impaired in adipocytes from rats adapted to high-protein, carbohydrate-free diet. *J. Nutr.* 134: 2919-2923, 2004.

**Mauer, M.M.; Harris, R.B.S.; Bartness, T.J.** The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25: 15-28, 2001.

**Migliorini, R.H.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.** Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am. J. Physiol.* 272: R656-R661, 1997.

**Morimoto, C.; Kameda, K.; Tsujita, T.; Okuda, H.** Relationship between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J. Lip. Res.* 42: 120-127, 2001.

**Mulder, A.H.; Tack, C.J.; Olthaar, A.J.; Smits, P.; Sweep, F.C.G.J.; Bosch, R.R.** Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E627-E633, 2005.

**Nakae, J.; Biggs, W. H. 3<sup>rd</sup>; Kitamura, T.; Cavenee, W. K.; Wright, C.V.; Arden, K.C.; Accili, D.** Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet.* 32(2):245-53, 2002.

**Nakae, J. J.; Cao, Y.; Oki, M.; Orba, Y.; Sawa, H.; Kiyonari, H.; Iskandar, K.; Suga, K.; Lombes, M.; Hayashi, Y.** Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. *Diabetes* 57(3):563-76, 2008.

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

**Nye, C. K.; Hanson, R. W.; Kalhan, S. C.** Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem.* 283(41):27565-74, 2008.

**Okazaki, H.; Osuga, J.; Tamura, Y.; Yahagi, N.; Tomita, S.; Shionoiri, F.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Harada, K.; Kimura, S.; Gotoda, T.; Shimano, H.; Yamanda, N.; Ishibashi, S.** Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51:3368–3375, 2002.

**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.* 168:399–405, 1987.

**Olswang, Y.; Cohen, H.; Papo, O.; Cassuto, H.; Croniger, C.M.; Hakimi, P.; Tilghman, S.M.; Hanson, R.W.; Reshef, L.** A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose size and fat content in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 625-630, 2002.

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

**Reshef, L.; Hanson, R.W.; Ballard, F.J.** A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 245: 5979-5984, 1970.

**Rodbell, M.** Metabolism of isolated fatty cells: I-effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J.Biol.Chem.* 239: 735-380, 1964.

**Rojek, A. ; Praetorius, J.; Frøkiaer, J.; Nielsen, S.; Fenton, R. A.** A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol.* 70: 301-327, 2008.

**Rothwell, N.J.; Stock, M.J.** Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats. *Br. J. Nutr.*, 47: 461-471, 1982.

**Sandra, A.; Marshall, S.J.** Effect of chronic isoproterenol exposure on insulin binding and insulin-stimulated hexose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 1093-1097, 1987.

**Schmid, H.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H.** Reduced lipogenesis in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism*, 33: 219-223, 1984.

**Shi, H.; Bartness, T.J.** White adipose tissue sensory nerve denervation mimics lipectomy-induced compensatory increases in adiposity. *American Journal Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289: R514-R520, 2005.

**Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olso, B.J.; Klenk, D.C.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.

**Sols, A.; Craine, R.K.** The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate related and compounds. *J.Biol.Chem.* 210: 581-595, 1954.

**Somogyi, M.** Determination of blood sugar. *J.Biol.Chem.* 160: 69-73, 1945.

**Spiegelman, B. M.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res.* 2(11): 457-64, 1997.

**Stern, J.S.; Hirsch, J.; Drewnowski, A.; Sullivan, A.C.; Johnson, P.R.; Cohn, C.K.** Glycerol kinase activity in adipose tissue of obese rats and mice: effects of diet composition. *J Nutr.* 113(3):714-20, 1983.

**Stralfors, P.; Honnor, R.C.** Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur.J. Biochem.* 182:379-385, 1989.

**Su, C.L.; Sztalryd, C.; Contreras, J.A.; Holm, C.; Kimmel, A.R.; Londos, C.** Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278:43615-19, 2003.

**Sztalryd, C.; Xu, G.; Dorward, H.; Tansey, J.T.; Contreras, J.A.; Kimmel, A.R.; Londos, C.** Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161:1093–103, 2003.

**Takata, K.; Matsuzaki, T.; Tajika, Y.** Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem.* 39(1):1-83, 2004;

**Taubin, H.L.; Djahanguiri, B.; Landsberg, L.** Noradrenaline concentration and turnover in different regions of the gastrointestinal tract of the rat: an approach to the evaluation of sympathetic activity in the gut. *GUT* 13: 790-795, 1972.

**Tran, H.; Brunet, A.; Griffith, E. C.; Greenberg, M. E.** The many forks in FOXO's road. *Sci STKE.* 172: RE5. 2003.

**Tontonoz, P.; Hu, E.; Devine, J.; Beale, E.G.; Spiegelman, B.M.** PPAR $\alpha$  regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell Biol.* 15: 351-357, 1995.

**Tordjman, J.; Chauvet, G.; Quette, J.; Beale, E.G.; Forest, C.; Antonie, B.** Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cell. *J.Biol.Chem.* 278: 18785-18790, 2003a.

**Tordjman, J.; Khazen, W.; Antoine, B.; Chauvet, G.; Quette, J.; Fouque, F.; Beale, E.G.; Benelli, C.; Forest, C.** 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, 2003b.

**Wick, A.; Drury, D.R.; Nakada, H.I.; Wolfe, J.B.** Localization of primary metabolic block produced by 2-deoxy-glucose. *J.Biol.Chem.* 224: 963-969, 1957.

**Young, J.B.; Weiss, J.; Boufath, N.** Effects of dietary monosaccharides on sympathetic nervous system activity in adipose tissues of male rats. *Diabetes* 53: 1271-1278, 2004.

**Youngstrom, T.G.; Bartness, T.J.** White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increase fat pad mass and fat cell number. *Am. J. Physiol.* 275: R1488-1493, 1998.

**Zhang, J.; Hupfeld, C.J.; Taylor, S.S.; Olefsky, J.M.; Tsien, R.Y.** Insulin disrupts beta adrenergic signaling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437:569–573, 2005.

Zhang, W.; Patil, S.; Chauhan, B.; Guo, S.; Powell, D. R.; Le, J.; Klotsas, A.; Matika, R.; Xiao, X.; Franks, R.; Heidenreich, K.A.; Sajan, M.P.; Farese, R.V.; Stolz, D.B.; Tso, P.; Koo, S.H.; Montminy, M.; Unterman, T.G. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 281(15):10105-17, 2006.

Zimmermann, R.; Strauss, J.G.; Haemmerle, G.; Schoiswohl, G.; Birner-Gruenberger, R.; Riederer, M.; Lass, A.; Neuberger, G.; Eisenhaber F.; Hermetter, A.; Zechner, R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383–1386, 2004.



# 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](#)