

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Efeitos da dieta hipercalórica no metabolismo de proteínas em músculo esquelético e na atividade lipolítica do tecido adiposo branco de ratos.

Luciana Carvalho

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Luciana.

Efeitos da dieta hipercalórica no metabolismo de proteínas em músculo esquelético e na atividade lipolítica do tecido adiposo branco de ratos. Ribeirão Preto, 2010. 127f. 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Tecido adiposo branco. 2. Dieta hipercalórica. 3. Musculatura esquelética.
4. Microdiálise. 5. Lipólise. 6. Agentes lipolíticos.

Orientadora: Kettelhut, Isis do Carmo.

Data da defesa: 06/05/2010.

*Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível e de repente você
estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assís

Dedicatória

À minha família...

Meu pai, *João*, e às duas admiráveis mulheres que Deus me concedeu como mães, *Clélia* e *Rogéria*, pela oportunidade de vida, cuidados, orações e paciência.

Aos meus amigos que Deus me honrou como irmãos *Tatiana* e *Igor*, por todo o apoio, paciência, companheirismo e compreensão.

Ao meu noivo e futuro esposo, *Alexandre*, por se fazer sempre presente, mesmo distante, por estar sempre ao meu lado me amparando, confortando e torcendo.

...Por todo amor a mim dedicado e por nunca perderem a Fé.

Agradecimentos

A *Deus*, Pai de infinita sabedoria e bondade, a *Jesus*, bom e amado Mestre e aos bondosos *Espíritos* protetores, pelas inúmeras oportunidades de aprendizagem e de trabalho. Por me concederem a compreensão de que tudo que nos acontece é em nosso próprio benefício, e que as dificuldades encontradas no caminho constituem os degraus para o aperfeiçoamento intelectual e moral necessário para que se possa evoluir espiritualmente.

À *Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut*, pela simpatia, agradável convivência, orientação e por me proporcionar a oportunidade única de ser sua aluna. Pelos valiosos ensinamentos, conselhos, rigor científico, exemplos de vida, força, dedicação, e pela paciência frente às minhas inúmeras dificuldades. Mas, principalmente pela demonstração de humanidade e dignidade me apoiando tanto no âmbito profissional quanto pessoal demonstrando que além de ser uma excelente profissional é um ser humano admirável.

Ao *Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes*, pela agradável convivência, pelos exemplos de extrema dedicação, empenho e competência como pesquisador e professor, pela contribuição e sugestões nos experimentos de microdiálise e fluxo sanguíneo, bem como nas valiosas correções para a finalização do presente trabalho.

Ao *Prof. Dr. Renato Hélio Migliorini*, pelo breve, porém agradável e inesquecível convívio. Pela dedicação científica e acadêmica na construção dos alicerces deste laboratório. Não apenas ao cientista-professor, mas ao ser humano admirável, pelos exemplos de humildade e de humanidade. Pela gentil atenção, conversas instrutivas e agradáveis.

Ao *Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista*, meu eterno Mestre. Pela companhia gentil e agradável convivência, valiosos ensinamentos, inesquecíveis aulas e pela oportunidade de ser sua aluna. Pelos mais variados gestos de auxílio, apoio e incentivo, mas principalmente por sua extrema generosidade e humildade.

À *María Antonieta Rissato Garófalo*, pela agradável convivência, simpatia, apoio técnico de extrema qualidade, paciência em ensinar várias vezes o mesmo protocolo, rigor científico, disponibilidade, serenidade no ensino de cálculos e na execução dos experimentos, no valioso auxílio, de todas as horas, imprescindível para a concretização deste trabalho.

À *Neusa Maria Zanon*, pela convivência agradável e paciência em me ensinar as inúmeras técnicas laboratoriais de valor inestimável para minha formação profissional. Pela energia e disposição inesgotável fundamentais para a realização dos experimentos, apoio técnico de extrema qualidade; sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À *Elza Aparecida Filippin* (Pila), pela agradável companhia, valioso auxílio técnico nos experimentos, comentários divertidos e canções no laboratório tornando o ambiente de trabalho mais alegre, pelas caronas e momentos divertidos durante os finais de semana.

Ao *Víctor Díaz Galban*, pela convivência sempre gentil, conversas alegres e instrutivas, pelas piadas de mineiro, auxílios e esclarecimentos nas dúvidas químicas e “computacionais”, e por sempre dividir comigo as agradáveis festas de aniversário.

À *Andréza Bonifácio* e *Adriano Duran*, pelo agradável e divertido convívio, pelo zelo no trabalho e auxílios indispensáveis. Ao *Michael Douglas de Oliveira* pela ajuda inestimável no Biotério, pelo sorriso cativante, pelo agradável e divertido convívio.

Ao *Leandro García*, pelo auxílio técnico valioso e *Amanda Araújo* pela breve, porém agradável convivência.

Às minhas avós *Dalva*, *Daisy* e *Eurípida*, ao meu avô *Hélio Novaes* (*in memoriam*), aos meus primos-irmãos *Michelle* e *Fernando*, à minha amiga-irmã *Paula*, e a todos meus familiares por acreditarem em mim, por todo carinho e amor incondicional. À *Eliângela*, *Antônio José*, *André* e *Aloísio*, por todo incentivo, apoio, orações e amizade. Amo muito vocês.

À minha amiga-irmã *Sílvia de Paula Gomes*, pela presença constante em minha vida, por compartilhar momentos de alegrias e de dificuldades, exemplo de extrema dedicação ao trabalho, de força, competência e objetividade. Pelo incentivo, apoio, valiosa ajuda, conselhos e conversas memoráveis. Por todas as histórias vividas desde Ouro Preto, pessoa ímpar e marcante que estará sempre presente em meu coração.

Aos amigos do Laboratório de Controle do Metabolismo:

Valéria Ernestânia Chaves, pessoa essencial para a realização deste trabalho. Pela presença sempre amiga, exemplos de garra e força, auxílio incansável, incentivo constante. Pelo companheirismo, conversas agradáveis e instrutivas, pelos momentos divertidos durante o trabalho e nas horas de folga. Pelos conselhos, apoio científico e pessoal, e acima de tudo por acreditar no meu trabalho. *Merci beaucoup!*

Eduardo Carvalho Lira, pela sempre boa disposição em ajudar, agradável convivência, valioso auxílio nos experimentos de microdiálise. Por toda a paciência, caronas, momentos divertidos no laboratório e em eventos festivos.

Danúbia Frasson, pelo agradável convívio, divertidas conversas, caronas, auxílio na execução dos experimentos de lipólise e pelas valiosas correções, discussões e sugestões para a finalização do presente trabalho.

Amanda Martins Baviera, pela sempre divertida e alegre companhia, boa vontade e disponibilidade em ajudar, simpatia e sorriso cativante. Pelos exemplos admiráveis de determinação, dedicação ao trabalho, competência e honestidade.

Lidiany Góis, pelos incontáveis momentos alegres e divertidos que passamos no laboratório e durante os finais de semana. Pela agradável companhia em horários alternativos de trabalho, auxílios, e por ter me recebido em sua casa quando cheguei a Ribeirão Preto.

Marcos Pereira de Jesus, pela amizade, momentos divertidos e alegres, companhia agradável e inestimável auxílio no cuidado dos animais no biotério.

Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, exemplo de determinação, dedicação e esforço pessoal, pela sempre boa disposição em ajudar, pelas caronas e pelos momentos alegres e divertidos no laboratório.

Leandro Henrique Manfredi, Rafael Rossi Valentim e Wílian de Assis Silveira (os "Twix"), pela amizade, convivência agradável, risadas, conversas, caronas, videozinhos do youtube. Pelos valiosos auxílios e divertidos momentos musicais no laboratório e nas festividades.

Flávia Aparecida Graça, pela alegria contagiante e sorriso cativante, por suas canções no laboratório e pelo inestimável auxílio nos experimentos de fluxo sanguíneo.

Priscila Cassolla, pelas risadas, divertidas histórias e sempre agradável companhia nos horários alternativos de trabalho.

Aos demais amigos do Laboratório de Controle do Metabolismo: *Maria Emília dos Santos, Thiago de Lorena Fábio, Alexandre Machado, Matheus Carvalho, Francielle Przygodda, Graziela Nascimento*, pela agradável convivência, tornando o ambiente do laboratório mais alegre e familiar.

Às amigas *Camila* e *Enyara*, pela agradável convivência, companhia, carinho, apoio, palavras amigas e incentivos únicos. Por torcerem sempre por mim e pelos inestimáveis auxílios.

Ao amigo *José Alberto* (Zé) pela paciência, atenção, gentilezas e sempre boa vontade me auxiliando com as dúvidas de cálculos químicos por e-mail desde a prova de ingresso no Mestrado.

A todos os amigos da Sociedade Espírita União e Caridade: *Maria Aparecida, Edgard, Ivete, Maria Albertina, Zelinda, Ana Cláudia, Cleide, Rosana, Vlamir, Daniela, Marília, Andréia, Daniel, Regina e Cássio*. Pela recepção, agradável convívio, compreensão, respeito, esclarecimentos, afetuosidade, paciência, amparo fraterno e espiritual, palavras amigas, disponibilidade e valiosa oportunidade de aprendizado.

Aos inestimáveis amigos de Ouro Preto: *Carolliny, Marcela, Éder, Flávia, Alexandre* (Nox), *Douglas, Alberto, Leandro, Alzira, Geovam e Luís Phillipe*, por tornarem os momentos vividos inesquecíveis, demonstrando que existem coisas bonitas que eu acredito e que não deixarão de existir como: amizade, palavra, respeito, caráter, bondade, alegria e amor.

Aos amigos de longa data *Vanessa, Amauri, Edlayne, Lívía Dutra, Andrezza, Elislene, Aline Ester*, por sempre se fazerem presentes com uma palavra amiga e gestos de carinho apesar da distância e do tempo.

Aos “novos” amigos *Rodrigo, Christian, D. Eliana, Sr. Calixto*, e aos “velhos” amigos de infância que reencontrei *Yara, Gláucia e Lívía Galdino* que tenho imenso prazer de conviver, pelas manifestações de carinho, generosidade e por fazerem parte da minha família.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pela minha formação bioquímica, em especial ao *Dr. Wanderley Rodrigues, Dr. Joaquim Coutinho Neto* pelos reagentes. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial *Ivone, Lúcia, Téia, Ronaldo, Lúcia Sakagute e Paulinho*.

Aos amigos de Pós-graduação *Rosana Reis, Sami Yoko, Lucas Tabajara, Adriana Manfiolli, Érika Moreira, Hugo Vieira, Lílíane Fraga, Viviane Aline, Larissa Teixeira, Larissa Marchi, Lara Vieira, Felipe Roberti, Tassiele Heinrich, Andréa Gutierrez e Andréia Suzukawa*.

À *Profa. Dra. Maria Rita Silvério Pires*, pelo carinho e paciência durante minha passagem em seu laboratório. Por permitir meu primeiro contato com o mundo científico. Aos professores e alunos do LBBM-UFOP minha eterna gratidão pelo início de tudo.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, me ensinando que nessa vida todos somos mestres uns dos outros, e que todas as oportunidades de trabalho são dignas e verdadeiras fontes de aprendizagem.

Apoio financeiro: CAPES, FAPESP e CNPq

Índice

Resumo.....	i
Abstract	iii
Lista de Siglas.....	v
1) Introdução	1
1.1) Tecido muscular esquelético	1
1.2) Tecido adiposo branco.....	6
2) Objetivos	17
3) Materiais e Métodos	18
3.1) Animais e seu Tratamento	18
3.1.1) Dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria.....	18
3.2) Determinação do conteúdo lipídico da musculatura esquelética e do TAB RETRO e EPI.....	21
3.3) Teste de tolerância à Glicose (GTT).....	21
3.4) Microdiálise no tecido muscular esquelético	22
3.5) Microdiálise no TAB	25
3.6) Determinação dos parâmetros hemodinâmicos.....	27
3.6.1) Pressão Arterial Média (PAM)	27
3.6.2) Fluxo sanguíneo (FS)	27
3.7) Atividade lipolítica no TAB	28
3.7.1) Determinação do conteúdo de DNA	29
3.8) Análises bioquímicas	31
3.9) Análise estatística dos resultados.....	32
4) Resultados	33
4.1) Peso corporal.....	33
4.2) Parâmetros metabólicos plasmáticos	34
4.3) Teste de tolerância à glicose (GTT).....	37
4.4) Peso de diferentes depósitos do TAB.....	38
4.5) Lipídios totais no TAB RETRO e EPI.....	40

4.6) Lipídios totais em músculos esqueléticos	42
4.7) Peso e concentração de proteínas totais da musculatura esquelética	43
4.8) Metabolismo de proteínas, <i>in situ</i> , em músculo esquelético	45
4.8.1) Tirosina liberada pela musculature esquelética	45
4.8.2) Extração fracional de etanol na musculatura esquelética – medida do fluxo sanguíneo local no tecido muscular	47
4.9) Atividade lipolítica, <i>in situ</i> , do TAB	48
4.9.1) Glicerol liberado pelo TAB	48
4.9.2) Atividade lipolítica, <i>in vitro</i> , do TAB.....	51
5) Discussão.....	71
6) Referências Bibliográficas	90

Resumo

Resumo

Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que ratos alimentados, por três semanas, com a dieta hipercalórica do tipo cafeteria apresentam hiperinsulinemia associada ao aumento dos níveis de TAG plasmáticos, aumento da lipogênese e da utilização de glicose pelo TAB RETRO e EPI, bem como do conteúdo de gordura nesses tecidos sem ocorrer alterações no peso corporal durante todo o período avaliado. Tem sido também relatado que tanto indivíduos quanto animais obesos com resistência à insulina apresentam aumento do catabolismo protéico e perda de massa magra.

Assim um dos objetivos do presente trabalho, foi investigar em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica e hipercalórica do tipo cafeteria por 3 semanas o metabolismo protéico *in situ* no músculo esquelético *tibialis* anterior. Verificamos que, de fato, a dieta promoveu aumento da liberação de tirosina muscular em relação aos controles, com redução no peso e no conteúdo de proteínas dos músculos esqueléticos *soleus*, EDL e *tibialis*, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a manutenção do peso corporal nesses animais, apesar do aumento da gordura corporal.

Outro objetivo do presente estudo foi verificar se o aumento da massa adiposa estocada ocorreu devido apenas ao aumento da lipogênese ou também devido a alterações na atividade lipolítica do tecido adiposo.

Os resultados obtidos mostraram que animais alimentados com a dieta cafeteria apresentam, tanto *in situ* quanto *in vitro*, uma atividade lipolítica basal maior no RETRO, sem entretanto apresentar alterações significativas no EPI. Tornou-se interessante avaliar a resposta lipolítica do TAB de ratos cafeteria incubados na

presença de diferentes agentes lipolíticos. Foi observado uma maior responsividade, *in vitro*, dos adipócitos dos animais cafeteria, incubados na presença de NOR, DBAMPc, IBMX, THEO e FSK, quando comparados com os controles.

Contudo nossos achados não permitem qualquer conclusão quanto aos mecanismos pelos quais a adaptação à dieta cafeteria induz as alterações observadas no metabolismo dos lipídios, mais especificamente, no processo intracelular de ativação da lipólise. Apesar da atividade lipolítica do TAB de ratos cafeteria ser maior que dos animais controles, a atividade aumentada da LPL e da lipogênese provavelmente são preponderantes no TAB, favorecendo o acúmulo de lipídios observado nesses animais.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a administração de uma dieta hipercalórica do tipo cafeteria por 3 semanas reduz o conteúdo protéico muscular e induz o aumento do peso dos tecidos adiposos RETRO e EPI apesar do aumento da lipólise basal (*in situ* e *in vitro*), e da lipólise estimulada por agentes lipolíticos em estudos *in vitro*. A dieta ainda promoveu aumento do catabolismo protéico avaliada pela técnica de microdiálise, o que sugere uma provável resistência à insulina na musculatura esquelética.

Palavras-chave: Tecido adiposo branco, dieta hipercalórica e hiperlipídica, dieta cafeteria, musculatura esquelética, microdiálise, lipólise, agentes lipolíticos.

Abstract

Abstract

Previous studies from our laboratory have shown that hypercaloric diet (type cafeteria) fed rats for three weeks present high plasma levels of insulin and triacylglycerol associated to an increased glucose uptake and lipogenesis in white adipose tissue (retroperitoneal and epididymal). In spite of the higher fat content in these animals, they have the same body weight than controls during all the experimental period. It has been reported that obese animals with insulin resistance show increase in protein catabolism and loss of lean body mass.

One of the objectives of this work was to investigate in rats fed a HCHL diet for 3 weeks, the muscle protein metabolism *in situ* using a microdialysis technique. In fact, this diet induced an increase in tyrosine release from *tibialis* anterior muscle and a reduction in protein content and muscle weight (*soleus*, *Extensor Digitorius Longus* and *tibialis* anterior), which could explain at least in part, the absence of body weight change in these animals when compared to controls, in spite of the increase in fat mass.

The second goal of this work was to investigate if the increase in fat mass of cafeteria diet-fed rats was also due to changes in adipose tissue lipolytic activity. The basal rates of lipolysis in RETRO (*in situ* and *in vitro*) from these animals are higher than controls, as also the response of both tissues to lipolytic agents as norepinephrine, cAMP, isobutylmethylxanthine, theophyllin and forskolin, when compared to controls.

Our findings do not allow any conclusion about the mechanisms responsible for the increase in adipose tissue lipolysis in cafeteria diet-fed rats.

Probably the high lipogenesis and lipoprotein lipase activity in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats are responsible for the increase in fat content, besides the higher lipolytic activity observed in these animals.

Taken together the results of the present study allow concluding that the administration of cafeteria diet for 3 weeks was able to:

- Increase the retroperitoneal and epididymal adipose tissue weight and decrease the muscle protein content;
- Increase basal lipolysis *in situ* and *in vitro* (RETRO), and hormonal stimulated-lipolysis *in vitro* (RETRO and EPI);
- Increase muscle catabolism evaluated by microdialysis technique.

This kind of diet probably induces an increase in insulin resistance in skeletal muscle in rats.

Key words: Adipose tissue, hypercaloric hyperlipidic diet, cafeteria diet, skeletal muscle, microdialysis technique, lipolysis, lipolytic agents.

Lista de Siglas

Lista de Siglas

ACBP	Proteína ligadora de acil-CoA
AKT	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATGL	Lipase do triacilglicerol do adipócito
ATP	Adenosina trifosfato
CGI-58	<i>Comparative gene identification-58</i>
CoA	Coenzima A
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DABA	Ácido 3,5 diaminobenzóico
DAG	Diacilglicerol
Db-AMPc	Dibutiril AMPc
E3	Enzima ligante de Ub
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EPI	Epididimal
EPM	Erro padrão da média
FABP	Proteína ligadora de ácidos graxos
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
FS	Fluxo sanguíneo
FSK	Forskolina
GDP	Difosfato de guanosina.
GLUT	Transportador de glicose
Gs	Proteína G estimulatória
GTP	Trifosfato de guanosina.

GTT	Teste de tolerância à glicose
GyK	Gliceroquinase
HP	Dieta hiperprotéica
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IFN γ	Interferon γ
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	Quinase c-jun N-terminal
LHS	Lipase hormônio sensível
LPL	Lipase lipoprotéica
MAFbx	<i>Muscle atrophy F-box</i>
MAG	Monoacilglicerol
MGL	Lipase do monoacilglicerol
MuRF-1	<i>Muscle RING (Really Interisting New Gene) Finger 1</i>
N	Dieta normal
NOR	Noradrenalina
PAM	Pressão Arterial Média
PDK	Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
RETRO	Retroperitoneal
SNS	Sistema nervoso simpático
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol

TAM	Tecido adiposo marrom
THEO	Teofilina
TNF α	Fator α de necrose tumoral
UPS	Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

Introdução

1) Introdução

A manutenção do balanço energético em mamíferos é fundamental para a homeostase metabólica, sendo que um balanço adequado entre o aporte e a utilização de energia é de fundamental importância para o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico no organismo vivo.

A ativação de determinada via metabólica depende do estado nutricional do indivíduo além de um controle hormonal fino que modula tanto a captação de nutrientes quanto sua produção endógena nos tecidos (Yeo & Sawdon, 2007). A integração de múltiplas vias metabólicas nos principais tecidos envolvidos no metabolismo energético, como a musculatura esquelética e o tecido adiposo, são responsáveis pela utilização da energia proveniente dos nutrientes da dieta ou da reserva corporal. Um desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto energético podem resultar em deposição de gordura e instalação da obesidade.

1.1) Tecido muscular esquelético

O desempenho adequado do organismo está relacionado, principalmente, com a massa magra corporal (James, 1983) e é no estado de crescimento que a massa celular aumenta, devido ao predomínio das reações de síntese protéica, em relação às de degradação (proteólise).

O músculo esquelético é o tecido que contém maior quantidade de proteínas e compõe 40-45% do peso corporal de ratos. Diferente da maioria das células, o crescimento da musculatura esquelética não está intimamente ligado à síntese de

DNA ou divisão celular, mas sim relacionado ao acúmulo de proteínas (Kettelhut *et al.*, 1988b).

O metabolismo de proteínas neste tecido é regulado por numerosos fatores nutricionais, hormonais e neurais, que promovem ajustes metabólicos nas mais diversas situações fisiológicas ou patológicas. Os processos de síntese são finamente regulados não havendo estoque ou reserva de aminoácidos na forma de proteínas, como ocorre com a glicose e os ácidos graxos (AG), que podem ser armazenados como glicogênio ou triacilgliceróis (TAG).

Dessa forma, qualquer desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação poderá promover atrofia ou hipertrofia do tecido muscular. Assim, a atrofia muscular pode ser consequência de uma redução na síntese protéica, de uma ativação da degradação de proteínas, ou ainda uma associação de ambos os processos.

A insulina apresenta várias ações anabólicas sobre o músculo: estimula o transporte de aminoácidos para o interior do tecido, aumenta a síntese, promovendo o início da tradução, e inibe a degradação protéica (Jefferson *et al.*, 1974; Goldberg *et al.*, 1980). Devido a estes efeitos anabólicos, a insulina é essencial para o crescimento muscular normal, o qual não ocorre em seres humanos ou animais diabéticos (Jefferson *et al.*, 1974; Goldberg *et al.*, 1980; Goodman, 1987).

A perda de massa corporal, que é característica frequente de vários estados patológicos, como infarto e diabetes *mellitus* (Wang *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2006; Siew *et al.*, 2007) resulta principalmente da ativação de mecanismos proteolíticos, o que afeta significativamente a homeostase do tecido muscular esquelético, resultando em perda de massa e fraqueza nos indivíduos.

Estudos sobre os efeitos de dietas deficientes em proteínas no metabolismo protéico muscular de ratos (Kettelhut *et al.*, 1988b) tem demonstrado um decréscimo na proteólise muscular, com redução não só da atividade lisossomal, mas também do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (UPS). Entretanto, ratos alimentados com uma dieta hiperprotéica (HP) comparado com animais que receberam uma dieta normal (N) não demonstraram alterações na atividade de nenhuma das vias proteolíticas presentes na musculatura esquelética (Doretto, 1995).

Outros autores têm estudado o papel de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas no metabolismo de carboidratos e lipídios, uma situação nutricional oposta à encontrada em ratos HP (Duarte *et al.*, 2001; Estadella *et al.*, 2004; Prada *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2006; Frasson, 2010). Entretanto, poucos têm discutido a relação do acúmulo de gordura corporal induzida por uma dieta hiperlipídica e o metabolismo de proteínas. Alguns estudos têm demonstrado que a taxa de proteólise corporal total de mulheres obesas é elevada em relação à de mulheres não obesas (Welle *et al.*, 1992 & 1994). Outros autores observaram que a obesidade está associada ao aumento do catabolismo protéico corporal e que esse quadro associado à resistência à insulina pode ser um dos responsáveis pelo aumento da proteólise muscular (Chevalier *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Além disso, estudos têm demonstrado que tanto em humanos, quanto em roedores, a ingestão de quantidades altas de gordura está relacionada de forma desfavorável à sensibilidade à insulina. De fato, o consumo de uma dieta hipercalórica do tipo cafeteria constituída de itens palatáveis, a qual é muito utilizada na alimentação ocidental, tem sido associada à adiposidade e instalação de um quadro de resistência à insulina (Chopra *et al.*, 2002; Popkin, 2001). Frente à grande diversidade de proteínas secretadas pelo tecido adiposo branco (TAB), assim como

seus efeitos que atingem desde os próprios adipócitos até outros tecidos do organismo, constata-se cada vez mais que esse tecido tem uma ligação direta com patologias associadas à obesidade, em especial a resistência à insulina e a síndrome metabólica (caracterizada por algumas desordens metabólicas associadas à obesidade, como resistência à insulina, hipertensão, e dislipidemia).

A resistência à insulina é uma condição, genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma redução na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e nas adiposas. Em consequência à menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina, levando a um quadro de hiperinsulinemia, sem, contudo, observar-se alterações nas demais funções desse hormônio (Bhanot *et al.*, 1996; Pessin *et al.*, 2000; Correia *et al.*, 2002). Entretanto, apesar dos mais variados estudos sobre o tema, os mecanismos exatos pelos quais ocorrem a instalação da obesidade e a resistência à insulina não são bem conhecidos.

Prada *et al.*, 2005; demonstraram que ratos submetidos à dieta cafeteria, hiperinsulinêmicos e normoglicêmicos, apresentaram redução na captação de glicose medida por clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Ao utilizar esta técnica trabalhos da literatura têm demonstrado que a resistência à insulina ocorre primeiramente no fígado em um período de tempo muito curto (3 dias), seguido de danos na ação insulínica em diversos tecidos como músculos esqueléticos, TAB e tecido adiposo marrom (TAM) em 3 semanas (Hansen *et al.*, 1994; Oakes *et al.*, 1997).

Zhou *et al.* (2007) demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica durante 5 meses desenvolveram um quadro de resistência à insulina com concomitante aumento na degradação de proteínas musculares devido à inibição da atividade do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1). Estes autores ainda observaram que a diminuição de Akt fosforilada, proteína envolvida na cascata de sinalização da insulina, causa a ativação da caspase 3, a qual desestrutura o complexo miofibrilar formando substratos que serão degradados pelo UPS. Consistente com essa ativação da via UPS foi observado um aumento na expressão dos atrogenes (genes cuja expressão é estimulada em situações de atrofia), entre eles, os da E3 ligases, atrogina 1 (ou MAFbx) e MuRF-1 no músculo desses camundongos. Mudanças metabólicas associadas à obesidade, tais como a diminuição dos níveis de adiponectinas, aumento de ácidos graxos circulantes, perda de massa magra, (cerca de 11% em músculo *soleus* e cerca de 12% em músculos *extensor digitorum longus*, EDL), foram observadas em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Zhou *et al.*, 2007). Esses autores também demonstraram nesses camundongos um aumento significativo nos níveis de citocinas circulantes, como TNF α , IL-6, e IFN γ , as quais têm sido relacionadas ao catabolismo da musculatura esquelética. Em cultura de adipócitos 3T3-L1 transfectados com um adenovírus recombinante que hiperexpressa adiponectina (produzida pelo tecido adiposo e funciona como um fator endógeno de sensibilização à insulina), foi observado que ao serem expostas a ácidos graxos livres, que causam resistência à insulina no tecido muscular, estas células apresentam uma redução na expressão dessas adipocinas (Zhou *et al.*, 2007). Esses achados demonstram que o balanço entre os ácidos graxos e a adiponectina circulante desempenha um importante papel na proteólise muscular em condições

de resistência à insulina e fornece evidências da existência de um “crosstalk” entre o tecido adiposo e a musculatura esquelética (Zhou *et al.*, 2007).

O interesse de nosso laboratório no estudo da regulação da via gliceroneogênica levou à utilização de ratos alimentados por 3 semanas com a dieta cafeteria (Chaves *et al.*, 2006; Frasson, 2010). Nesses estudos foi observado que essa dieta induz um aumento nos níveis plasmáticos de insulina e de TAG, sem, contudo alterar os níveis plasmáticos de glicose e de AGL. Além disso, foi demonstrado aumento da massa de gordura corporal e da capacidade lipogênica dos animais que receberam a dieta cafeteria. Embora tenha sido constatado o aumento da massa adiposa não foram encontradas alterações no peso corporal dos ratos cafeteria quando comparados com os controles.

Tais achados em conjunto com os dados da literatura, que demonstram aumento de proteólise muscular associada à resistência à insulina, motivaram no presente trabalho, o estudo dos efeitos da dieta hipercalórica do tipo cafeteria, por 3 semanas, no metabolismo de proteínas *in situ* do músculo esquelético de ratos.

1.2) Tecido adiposo branco

Além da clássica função do TAB como principal reserva energética do organismo para mobilização de AG em situação de demanda, este tecido desempenha importante papel na proteção mecânica contra choques e traumatismos externos. Vale ainda ressaltar seu papel na produção e liberação de várias citocinas, sendo definido por alguns autores como “órgão endócrino” (Wajchenberg, 2000; Frühbeck *et al.*, 2001).

O metabolismo de lipídios no TAB é regulado por hormônios que promovem efeitos diversos, não só sobre os processos de síntese e degradação de TAG, como sobre sua própria função endócrina e sobre a regulação da adipogênese (Wajchenberg *et al.*, 2000). O TAG é estruturalmente formado pela união de uma molécula de glicerol a três moléculas de AG por meio de ligações ésteres e seu conteúdo armazenado no TAB é dependente do balanço entre a velocidade de síntese (lipogênese) e de degradação (lipólise). Em períodos de balanço energético positivo, como durante a ingestão alimentar, em que a ingestão calórica excede o gasto energético, o TAG é estocado como forma de energia. Enquanto que, em períodos de balanço energético negativo, como em condições de jejum, o TAB fornece AG e glicerol, pela contínua hidrólise dos TAG estocados. Essa lipólise ocorre em grau variável de acordo com a demanda energética, liberando os AG que serão transportados na circulação (na forma livre, não esterificado) ligados à albumina, onde poderão ser captados e oxidados pelos tecidos.

A glicose e os AGL constituem os principais substratos utilizados pelos tecidos periféricos como fonte de energia. Tanto a produção hepática de glicose quanto sua utilização pelos tecidos são controladas. Os AGL, por sua vez, são controlados não apenas durante sua síntese, não sendo conhecido nenhum fator responsável pela regulação de sua utilização, a qual é proporcional à sua concentração plasmática.

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, estes controlam a síntese de AG não apenas diretamente, pelas alterações do fluxo de metabólitos, como também pela ativação da secreção de hormônios reguladores da síntese de AG (Hillgartner *et al.*, 1995; Kersten, 2001), como a insulina.

O sistema nervoso autônomo tem controle direto sobre o tecido adiposo através de seus componentes simpático e parassimpático. A inervação simpática está relacionada principalmente com as ações catabólicas, como a lipólise mediada pelos receptores β adrenérgicos e dependente da atividade da enzima lipase hormônio sensível (LHS) (Pénicaud *et al.*, 2000). Entretanto, a possível contribuição da inervação do tecido adiposo pelo sistema nervoso parassimpático é bastante controversa e a existência da inervação parassimpática no TAB ainda permanece incerta (Ballantyne, 1968; Ballantyne & Raftery, 1974; Kreier *et al.* 2002 & 2006; Berthoud *et al.*, 2006; Giordano *et al.* 2006).

A insulina é o principal hormônio anabólico no controle do metabolismo energético, regulando o metabolismo da glicose, de proteínas e de lipídios e é provavelmente, o mais importante fator hormonal envolvido na regulação da lipogênese. Seus efeitos 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 produção de glicerol-3-P pode ser oriunda da captação de glicose, o que envolve proteínas transportadoras específicas, os GLUT-4, e este processo é controlado pela insulina, que durante o período prandial, estimula a translocação dessas proteínas para a membrana celular, aumentando o transporte de glicose (Lemos *et al.*, 2006). Além disso, a metabolização da glicose é acelerada pela insulina, produzindo além do glicerol-3-P pela ativação das enzimas glicolíticas,

também moléculas de AG, por ativação de enzimas 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 AG sintetizados *de novo* a partir da glicose ou de outros compostos produtores de acetil-CoA (como alguns aminoácidos), os AG esterificados pelo tecido, podem ser provenientes da hidrólise dos TAG 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 (LPL). Os AGL assim liberados das lipoproteínas são captados pelos adipócitos, por difusão facilitada através de transportadores específicos, tais como CD36 e proteína transportadora de AGL (FATP). Uma vez no citosol, que é um meio aquoso, o AGL se liga a outra proteína ligadora, a FABP, que transporta o composto para ser acilado com coenzima A. Este processo é executado por outra proteína integral de membrana, a acil-CoA sintase. Terminando esta etapa, a acil-CoA é levada por outra proteína, a ACBP (proteína ligadora de Acil-CoA), para os locais de esterificação com glicerol-3-P.

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

No entanto, independente da origem dos AG, o fornecimento de glicerol-3-P é essencial para o funcionamento adequado do TAB e formação de TAG. A via clássica de obtenção de glicerol-3-P pelo TAB é a sua síntese a partir de carbonos de glicose, pela conversão de dihidroxiacetona fosfato, um intermediário da *via*

glicolítica, a glicerol-3-P, uma reação catalisada pela enzima glicerol-3-P desidrogenase. Além desta via, o TAB possui duas outras formas de obtenção desse metabólito: **a)** fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase (GyK) e **b)** via gliceroneogênica que consiste na formação de glicerol-3-P 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 glicerol-3-P por uma reversão parcial da via glicolítica.

O conteúdo e a atividade da GyK no TAB são relativamente baixos e considerados desprezíveis quando comparados ao 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. Entretanto, diversos achados sugerem que a GyK contribui na geração de glicerol de TAG no TAB. Estudos 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 como peso corporal e o tamanho dos adipócitos nessas situações (Stern *et al.*, 1983). Além disso, dados deste laboratório demonstraram que a atividade da GyK mostra-se aumentada no TAB epididimal (EPI) de animais que receberam a dieta cafeteria, acompanhando o aumento do *turnover* de noradrenalina (NOR) tecidual observado neste tecido (Frasson, 2010). Esta mesma relação direta entre GyK e atividade simpática também é observada no TAB retroperitoneal (RETRO), de animais alimentados com a mesma dieta hipercalórica, onde há aumento da atividade simpática e aumento da GyK. (Chaves *et al.*, 2006).

O controle da lipólise no TAB é bastante complexo e envolve a interação de diversos fatores. As catecolaminas são as principais ativadoras da mobilização de AG do TAB induzida pelo jejum. A NOR ao se ligar aos receptores β -₃ adrenérgicos, os quais são acoplados às proteínas G na membrana plasmática dos adipócitos, transmitem o sinal estimulatório à enzima adenilil ciclase, a qual catalisa a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O AMPc gerado se liga à proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e a ativa pela dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas. Uma vez estimulada, a PKA fosforila a lipase hormônio sensível (LHS), induz sua ativação e, subsequentemente, sua translocação do citosol para o glóbulo de gordura desencadeando a hidrólise dos TAG estocados (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).

Estudos realizados recentemente em camundongos com ausência do gene que codifica a LHS sugerem que outras lipases podem participar da mobilização de AG do TAB. O tratamento de adipócitos isolados destes animais 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 (MAG) (Kraemer *et al.*, 2002). A superexpressão da lipase recentemente descrita, denominada lipase do triacilglicerol do adipócito (ATGL ou desnutrina), promove um aumento na quebra de TAG e liberação de AG do TAB (Zimmermann *et al.*, 2004; Jaworski *et al.*, 2007).

A ATGL ou desnutrina é altamente expressa no tecido adiposo e está aumentada durante a diferenciação do adipócito 3T3-L1. A expressão da ATGL é também observada na musculatura cardíaca, fibras tipo I da musculatura esquelética, testículos, macrófagos, fígado e outros tipos celulares. A ATGL realiza seletivamente o primeiro passo na hidrólise dos TAG resultando na formação de DAG e AGL e sua atividade de hidrolase de TAG é independente da LHS no tecido adiposo. Além disso, em 2006, Lass *et al.*, mostrou que a atividade da ATGL é fortemente estimulada por um ativador conhecido como *comparative gene identification-58* (CGI-58). Contudo, o mecanismo molecular da ativação da ATGL pela CGI-58 não é conhecido. Aparentemente, CGI-58 se liga à ATGL, mas não está claro se a ligação com CGI-58 afeta a conformação ou facilita o contato com a superfície de seu substrato.

Assim, tem sido proposto um novo modelo para os mecanismos envolvidos na regulação da lipólise. As perilipinas regulam a atividade da ATGL e da LHS pela ligação do ativador CGI-58 na ATGL e pelo controle do acesso da gota lipídica pela LHS. No estado basal, CGI-58 se encontra ligada às perilipinas e a atividade das lipases está baixa. No estado ativado, a fosforilação das perilipinas pela PKA leva a liberação de CGI-58 a qual torna-se então disponível para ativar a ATGL. A ativação da ATGL produz DAG que é o substrato preferencial da LHS. Concomitantemente, a LHS é fosforilada pela PKA e as perilipinas promovem sua translocação resultando em uma eficiente hidrólise dos DAG. Em seguida, a atividade da lipase do

monoacilglicerol (MGL) resulta na formação de glicerol e ácidos graxos livres (Zimmermann *et al.*, 2009).

Ao contrário das catecolaminas, no tecido adiposo, a insulina promove, inibição da lipólise, reduzindo os níveis de AGL plasmáticos promovendo a inibição da mobilização de AG do TAB (Beardsall *et al.*, 2006; Lemos, 2006). 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 propicia a fosforilação e ativação da proteína quinase B ou Akt (PKB/Akt) por meio da PDK1 (Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol 1). 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, prejudicando em última instância a ativação da ATGL através da liberação de CGI-58 pelas perilipinas, bloqueando portanto, a mobilização de AG 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).

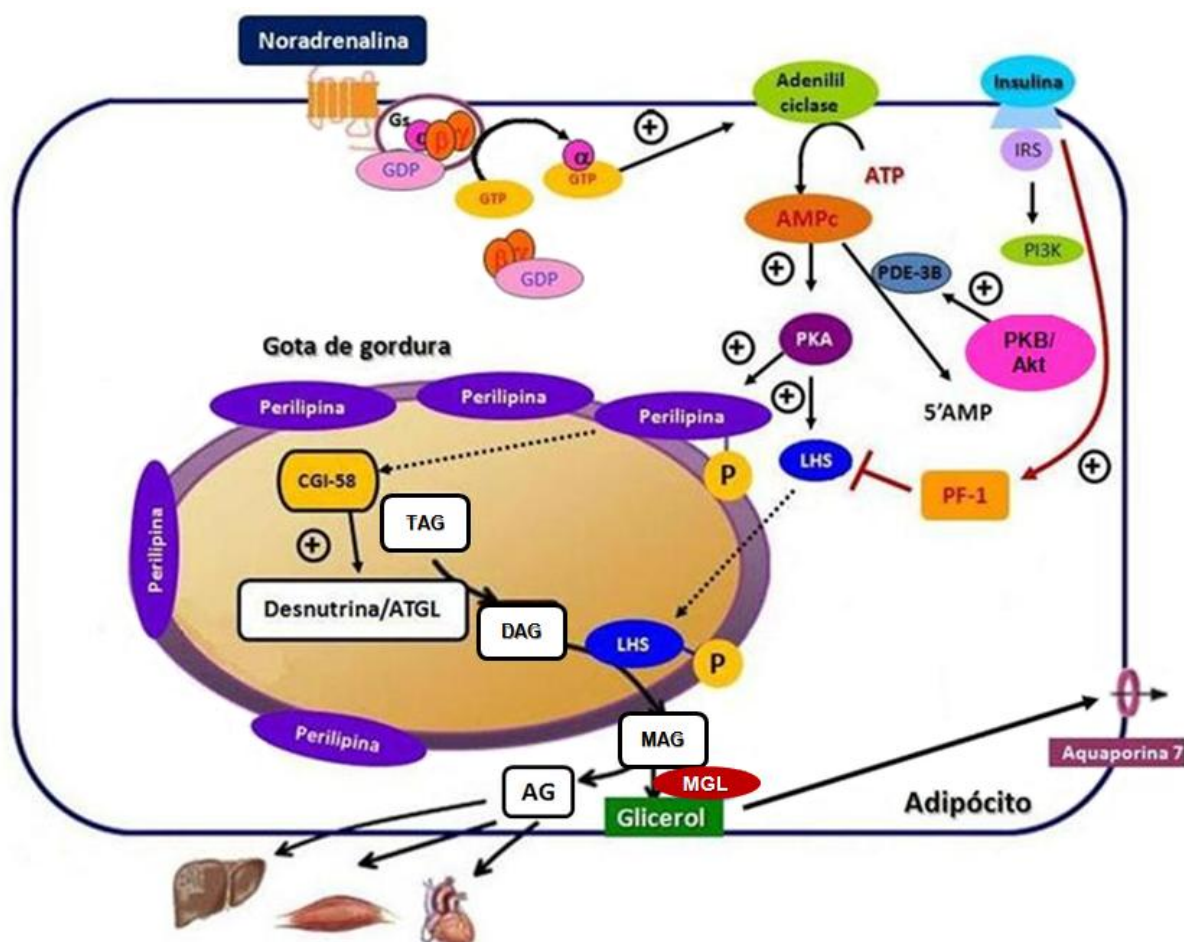


Figura 1 – Representação esquemática do processo de lipólise (modificado de Vázquez-Vela *et al.*, 2008). α, β, γ , subunidades da proteína G. AG, ácidos graxos. AMPc, monofosfato de adenosina cíclico. 5'AMP, 5' monofosfato de adenosina. ATGL, lipase do triacilglicerol do adipócito. ATP, trifosfato de adenosina. CGI-58, *comparative gene identification-58*. DG, diacilglicerol. GDP/GTP, trifosfato e difosfato de guanosina. Gs, proteína G estimulatória. IRS, substrato do receptor da insulina. LHS, lipase hormônio sensível. MG, monoacilglicerol. MGL, lipase do monoacilglicerol. P, fosfato. PDE-3B, fosfodiesterase 3 B. PF1, proteína fosfatase-1. PI3K, fosfatidil inositol 3 quinase. PKA, proteína quinase dependente de AMPc. PKB/Akt, proteína quinase B. TG, triacilglicerol.

Apesar da lipólise e lipogênese, serem processos estritamente controlados por fatores nutricionais, hormonais e neurais, por vias ainda não totalmente elucidadas, pode ocorrer um desequilíbrio favorecendo o balanço energético positivo, levando à adiposidade. Quando esse desequilíbrio é crônico ocorre a instalação de um quadro de obesidade. Parece que o ajuste do consumo com a oxidação de cada macronutriente possui um rigoroso controle para manutenção da homeostase energética. Flatt (1987), afirma que o balanço de nitrogênio e de carboidratos é facilitado pela capacidade do organismo em ajustar as taxas de oxidação de aminoácidos e de glicose, respectivamente, em relação aos seus consumos alimentares. Contudo, no caso dos lipídios, esse ajuste é bem menos preciso e o aumento no seu consumo não estimula proporcionalmente a sua oxidação. Além disso, a eficiência com que o lipídio da dieta é estocado como gordura corporal é alta, cerca de 96%. O aumento na ingestão lipídica induz o balanço lipídico positivo e, conseqüentemente, o acúmulo de massa adiposa corporal (Flatt, 1987 & 1995).

Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que ratos alimentados por 3 semanas com a dieta cafeteria apresentaram aumento da captação de glicose *in vivo* para produção de glicerol-3-P, da atividade da GyK, da síntese de AG, bem como da atividade da LPL, com conseqüente aumento dos depósitos de gordura corporal (Chaves *et al.*, 2006). Contudo, embora esses ratos apresentem hiperinsulinemia e aumento de lipogênese, também foi observado um aumento no *turnover* de NOR no RETRO e EPI desses animais, indicando uma hiperatividade simpática.

Considerando esses achados em conjunto com os dados existentes na literatura, podemos observar as complexas alterações hormonais e metabólicas em

animais adaptados a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica. Assim, o presente trabalho teve como outro objetivo investigar se a adiposidade, verificada nos animais cafeteria, foi apenas devido ao aumento da lipogênese, a uma redução na atividade lipolítica, ou ainda a uma associação de ambos os processos. Desta forma, a fim de verificar os efeitos da dieta cafeteria no metabolismo lipídico do TAB de ratos, a atividade lipolítica basal, *in situ* e *in vitro*, foi avaliada. Além disso, para esclarecer as possíveis alterações na resposta lipolítica, também investigamos a lipólise *in vitro*, no RETRO e EPI, em condição estimulada por um agonista adrenérgico (noradrenalina), forskolina (que estimula o complexo da adenilil ciclase), dibutilil-AMPc (db-AMPc), um análogo estrutural do AMPc, e com inibidores da fosfodiesterase do AMPc como isobutil-metil-xantina (IBMX) e teofilina (THEO).

Objetivos

2) Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal esclarecer, na musculatura esquelética e no tecido adiposo branco (TAB), o efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria no metabolismo de proteínas do músculo esquelético *in situ* e a atividade lipolítica *in situ* e *in vitro*, do TAB de ratos.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram investigar os efeitos da dieta cafeteria:

- ❖ no conteúdo de gordura, no peso e no conteúdo de proteínas da musculatura esquelética;
- ❖ no metabolismo de proteínas da musculatura esquelética *in situ* de ratos;
- ❖ na tolerância à glicose;
- ❖ na resposta lipolítica do TAB *in situ* e *in vitro*, em condições basais;
- ❖ na resposta lipolítica no TAB retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI) *in vitro*, em condição estimulada por agonista adrenérgico (noradrenalina), forskolina (que estimula o complexo da adenilil ciclase), dibutilil-AMPc (db-AMPc), um análogo estrutural do AMPc, e com inibidores da fosfodiesterase do AMPc como isobutil-metil-xantina (IBMX) e teofilina (THEO).

Materiais e Métodos

3) Materiais e Métodos

3.1) Animais e seu Tratamento

3.1.1) Dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos machos Wistar com peso inicial entre 40 e 55 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica & Imunologia em ambiente controlado, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e acondicionados aos pares em gaiolas, permitindo a medida diária da quantidade de alimento e do volume de líquido ingeridos. Uma dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria, obtida pela suplementação de uma dieta balanceada comercial com diversos alimentos palatáveis, foi oferecida ao grupo experimental no período de 8 a 90 dias, de acordo com o protocolo utilizado. Para as análises bioquímicas os animais foram alimentados com a dieta por 8, 15 e 21 dias. Na avaliação de parâmetros como peso e conteúdo de gordura da musculatura esquelética e do tecido adiposo, a dieta cafeteria foi administrada por 8, 10, 15 e 21 dias. Nos estudos da atividade lipolítica, *in vitro*, e de microdiálise os animais receberam a dieta por 21 e 24 dias (3 semanas) respectivamente. Enquanto no teste de tolerância à glicose (GTT) a dieta foi administrada durante 40, 50, 60 e 90 dias. A cada dia, quatro, entre doze itens previamente selecionados (Tabela 1), eram oferecidos aos animais, sendo que cada um deles apresentava densidade calórica superior à da dieta comercial (Rothwell *et al.*, 1982). A água dos animais do grupo experimental era acrescida de sacarose

(20%). Os ratos controles receberam uma dieta balanceada comercial (Nuvital®) e água *ad libitum*.

A distribuição dos macronutrientes e a densidade calórica de cada um dos itens palatáveis que foram oferecidos ao grupo experimental, bem como a da ração comercial Nuvital®, foram obtidas das tabelas de informações nutricionais nos rótulos dos alimentos (Tabela 1). Em média, os ratos alimentados com a dieta controle ingeriram aproximadamente 50 Kcal por 100 g de peso corporal por dia, enquanto os animais submetidos à dieta hipercalórica e hiperlipídica do tipo cafeteria (HCHL) ingeriram aproximadamente 70 Kcal por 100g de peso corporal por dia.

Os experimentos foram realizados pela manhã, entre 8h e 11h, em ratos alimentados ou em jejum de 12 horas (para os estudos de tolerância à glicose), pesando cerca de 240 g e o sacrifício desses animais foi realizado por deslocamento cervical ou decapitação (quando necessária a coleta de sangue).

Tabela 1 – Distribuição dos macronutrientes e densidade calórica dos alimentos constituintes da dieta cafeteria.

	Carboidrato	Lipídio	Proteína	Densidade caloric
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(Kcal/g)
Bala de caramel	72,70	9,09	18,18	4,45
Bacon	0,00	58,00	9,00	5,69
Batata frita	45,00	35,00	5,00	5,15
Bis[®]	63,10	23,30	8,10	4,95
Bolacha de Maisena	62,50	12,50	7,50	4,02
Castanha-do-Pará	7,00	67,00	17,00	6,99
Chocolate	50,00	33,30	10,00	5,40
Chocooky[®]	63,33	23,33	3,33	5,00
Pé-de-moleque	58,82	26,47	11,76	5,29
Snacks[®]	65,00	17,50	7,50	4,50
Torrada	73,33	6,67	13,33	4,00
Torrone	80,00	7,50	10,00	3,80
Ração Nuvital[®]	55,00	4,50	22,00	2,85

Os ratos do grupo experimental recebiam água *ad libitum* acrescida de sacarose (20%).

3.2) Determinação do conteúdo lipídico da musculatura esquelética e do TAB RETRO e EPI

Os tecidos adiposos foram retirados de ratos alimentados com a dieta cafeteria durante 8, 10, 15 e 21 dias, e o tecido muscular esquelético foi retirado apenas de ratos adultos (230 - 250 g), alimentados durante 3 semanas com a dieta cafeteria. A extração do conteúdo lipídico da musculatura esquelética e do TAB RETRO e EPI foi realizada pelo método de Folch *et al.* (1957). Os tecidos foram então armazenado em clorofórmio:metanol, na proporção de 2:1, para posterior processamento. Os tecidos foram homogeneizados em Politron e em seguida o material foi filtrado utilizando papel Whatman nº 1 e ao filtrado foi adicionado água deionizada, na proporção de 10 ml de clorofórmio-metanol para 2 ml de água para cada 10 mL do filtrado. Após separação das fases clorofórmica e aquosa, uma alíquota da fase clorofórmica foi transferida para tubos previamente pesados para evaporação a 50° C. A quantificação da gordura foi obtida pelo método gravimétrico e os resultados expressos em g.100g^{-1} de peso corporal.

3.3) Teste de tolerância à Glicose (GTT)

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em ratos controles e alimentados com essa dieta durante 40, 50, 60 e 90 dias.

Após jejum de 12h, foi coletada uma amostra de sangue da cauda dos animais e a concentração plasmática basal de glicose foi medida imediatamente por um glicosímetro modelo Accu-Chek® Go. Em seguida, uma solução de glicose (2,0 g/kg) foi administrada aos animais por meio de uma sonda gástrica e amostras de

sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. A variação da concentração de glicose plasmática (concentração de glicose plasmática após administração da solução de glicose subtraída da concentração de glicose plasmática basal) *versus* o tempo foi plotada em gráfico, obtendo-se uma curva exponencial de primeira ordem. A área sob a curva (integral) foi determinada utilizando o software origin 6.0 para verificar a sensibilidade à glicose pela comparação entre as áreas sobre as respectivas curvas glicêmicas dos dois grupos estudados.

3.4) Microdiálise no tecido muscular esquelético

A fim de investigar o efeito, da dieta do tipo cafeteria no metabolismo de proteínas, *in situ*, de ratos adultos foram determinadas as concentrações de tirosina liberadas para o interstício, pelo músculo esquelético *tibialis* anterior. Para tanto, foi utilizada a técnica de microdiálise (Ungerstedt, 1991), que consiste na implantação de cateteres do tipo linear, no tecido de interesse. Os cateteres foram confeccionados a partir de uma membrana de diálise semipermeável (Cuprophane, 18mm de comprimento por 0,3 mm de diâmetro, 3 kDa de limite de permeabilidade) colada em ambas as extremidades a tubos de polietileno PE-10 (comprimento padrão de 50mm) e preenchidos com um fluido isotônico. Estes cateteres, quando implantados no tecido desejado, permitiam a passagem dos metabólitos do líquido intersticial para dentro da membrana, por gradiente de concentração, até atingirem o equilíbrio.

No dia dos experimentos, os animais com peso corporal entre 220 e 250 g (24 dias na dieta) foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg peso corporal, *i.p.*),

traqueostomizados com cateter de polietileno PE-240 e canulados na artéria carótida esquerda (cateter PE-50) para coleta de amostras de sangue. Os animais foram mantidos em mesas cirúrgicas aquecedoras (Insight®) com temperatura constante de 37°C.

Para determinar a concentração de tirosina liberada pela musculatura esquelética, o cateter de microdialise foi inserido longitudinalmente no músculo *tibialis anterior* com o auxílio de cânula-guia e perfundido a um fluxo constante de 1 µl/min com uma solução de perfusão (solução de NaCl 0,9% contendo glicose 1 mM, tirosina fria 50 µM, albumina bovina 0,5% e [¹⁴C]-tirosina). Após um período de equilíbrio inicial de 30 minutos considerados a partir do início do gotejamento da solução de perfusão, os músculos foram dialisados ao longo de 90 minutos. Ao término do experimento, foram coletadas amostras do dialisado, da solução de perfusão e do sangue arterial da carótida esquerda para determinação do fator de recuperação do cateter, das concentrações intersticial (I) e arterial (A) de tirosina e da diferença I - A. O dialisado foi coletado diretamente em tubos de microcentrífuga e, em seguida, mantido a – 20°C em solução de ácido tricloroacético (TCA 5%). O sangue coletado da artéria carótida esquerda foi imediatamente centrifugado, sendo o plasma separado e desproteínizado com ácido perclórico (PCA 1N) e congelado a – 20°C para posterior análise. As concentrações de tirosina no dialisado (40 µl), na solução de perfusão (50 µl) e no plasma (40 µl) foram determinadas pelo método fluorimétrico descrito por Waalkes & Uderfriend (1957). O plasma desproteínizado foi utilizado para a determinação da concentração de tirosina e do fator de recuperação do cateter. A capacidade de recuperação da tirosina é avaliada através da adição de [¹⁴C]-tirosina (~2500 dpm, 0,05 mmol/L) ao líquido de perfusão, e é calculada a partir da extração fracional da marca radioativa, que corresponde ao

valor de recuperação do metabólito não marcado. A contagem de radioativo da [^{14}C]-tirosina na solução de perfusão e no dialisado foi determinada em 10 μl de cada amostra diluída em 4 ml de líquido de cintilação biodegradável (Fischer Scientific). A leitura foi feita em espectrômetro de cintilação líquida PACKARD 1900. O catabolismo protéico é avaliado pela diferença entre a concentração de tirosina intersticial e arterial, ou seja, pelo índice I – A. Este conteúdo de tirosina é utilizado como um índice do metabolismo protéico por ser um aminoácido não metabolizado e por não ser sintetizado *de novo* no tecido muscular.

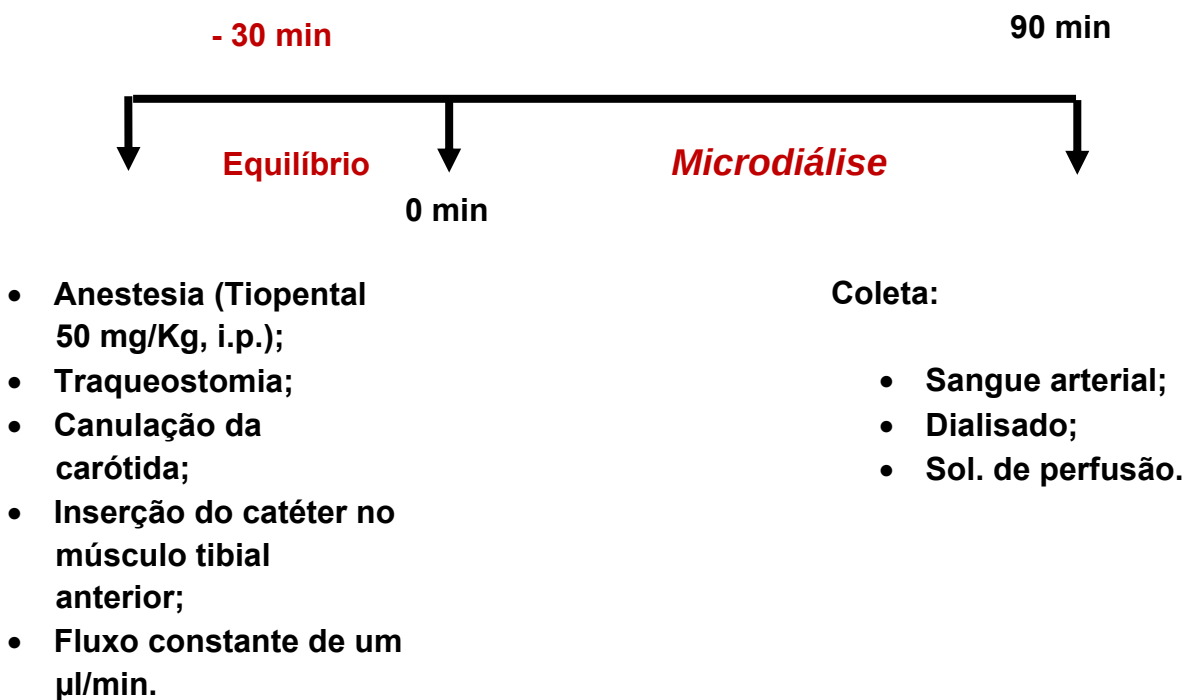


Figura 2 – Protocolo experimental utilizado para a determinação da concentração intersticial de tirosina no músculo *tibialis* anterior de ratos alimentados com a dieta cafeteria e ratos controles.

3.5) Microdiálise no TAB

A fim de investigar o efeito da dieta do tipo cafeteria na atividade lipolítica, *in situ*, de ratos adultos, foram determinadas as concentrações de glicerol liberadas para o interstício pelo RETRO. Para tanto, foi utilizada a técnica de microdiálise (Ungerstedt, 1991). Os cateteres utilizados foram confeccionados como anteriormente descrito no protocolo utilizado para o músculo esquelético. No dia dos experimentos, os animais com peso corporal entre 220 e 250 g (24 dias de dieta) foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg peso corporal, *i.p.*), traqueostomizados com cateter de polietileno PE-240 e canulados na artéria carótida esquerda (cateter PE-50) para aferição da pressão arterial média (PAM) e coleta de amostras de sangue. Os animais foram mantidos em mesas cirúrgicas aquecedoras (Insight®) com temperatura constante de 37°C.

Para determinar a concentração de glicerol liberado pelo TAB, o cateter de microdiálise foi inserido longitudinalmente no RETRO com o auxílio de uma cânula-guia e perfundido a um fluxo constante de 2,5µl/min com uma solução de perfusão contendo NaCl 0,9%, glicose 1 mM, albumina bovina 0,5% e glicerol-[U-¹⁴C] (0,5µCi/mL). Este último foi utilizado para estimar o fator de recuperação do cateter de microdiálise. Após um período de equilíbrio inicial de 60 minutos, considerados a partir do início do fluxo da solução de perfusão, o RETRO unilateral foi dialisado ao longo de 90 minutos de experimento, o qual foi dividido em 3 intervalos consecutivos de 30 minutos cada. Após o término de cada intervalo foram coletadas amostras do dialisado, da solução de perfusão e do sangue arterial da carótida esquerda para determinação do fator de recuperação do cateter, das concentrações intersticial e arterial de glicerol e da diferença I - A. As concentrações de glicerol no dialisado (40

3.6) Determinação dos parâmetros hemodinâmicos

3.6.1) Pressão Arterial Média (PAM)

Nos experimentos de microdiálise, o estado hemodinâmico dos animais foi avaliado pela aferição da PAM diretamente na artéria carótida. Após o tempo de equilíbrio a PAM era aferida, no início e no final da coleta das amostras, por meio de um transdutor de pressão conectado a um amplificador (braile biomédica).

3.6.2) Fluxo sanguíneo (FS)

Para a avaliação qualitativa do FS local utilizou-se a técnica do *clearance* do etanol, o qual foi adicionado à solução de perfusão. Nestes experimentos, o tecido muscular *tibialis* anterior e o tecido adiposo inguinal foram perfundidos a um fluxo constante de 1µl /min com solução de perfusão acrescida de etanol absoluto (5mM), ao longo de 90 minutos no tecido muscular e 120 minutos no tecido adiposo. O etanol foi quantificado no dialisado a cada 15 minutos no tecido muscular e a cada 20 minutos no tecido adiposo, bem como, na solução de perfusão ao final do experimento. O etanol é utilizado para estimar o fluxo sanguíneo por se tratar de um metabólito inerte, ou seja, por não ser secretado e nem metabolizado pelos tecidos analisados. Portanto, infere-se que uma redução na concentração de etanol no dialisado significa um aumento do FS local (vasodilatação), pois as moléculas de etanol evaporam devido a um aumento da temperatura no local, bem como, o aumento no dialisado, significa uma redução no FS local (vasoconstrição).

O FS foi então estimado pela obtenção da extração fracional de etanol empregando-se a seguinte fórmula:

$$EF = ([Et_D]/[Et_{SP}])$$

Onde:

EF: extração fracional;

[Et_D]: concentração de etanol (mmol/L) no dialisado;

[Et_{SP}]: concentração de etanol (mmol/L) na solução de perfusão.

A partir dos resultados obtidos na extração fracional podemos inferir que quanto mais próximo de 1 menor será o FS. Portanto, há uma relação inversa entre a extração fracional e FS local, ou seja, quanto menor for a extração fracional, maior será o fluxo e vice-versa.

3.7) Atividade lipolítica no TAB

Após 21 dias de tratamento com a dieta cafeteria, a atividade lipolítica do RETRO e do EPI foi avaliada através da liberação de glicerol para o meio de incubação.

Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, os tecidos adiposos foram removidos, fragmentados e pesados. O RETRO (200 mg), previamente fatiado com 500 µm de espessura (utilizando-se um fatiador “McIlwain Tissue Chopper”) ou a porção mais fina distal do EPI (200 mg) foram incubados a 37°C, sob agitação constante, durante duas horas, em 2 ml de meio Krebs-Henseleit contendo 0,119 M de NaCl; 0,025 M de NaHCO₃; 4,746 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO₄; 1,2 mM de KH₂PO₄; 1,92 mM de CaCl₂ acrescido de glicose 4,5 mM e de 2% de albumina, em pH 7,4, equilibrado em carbogênio (95% de O₂ :5% de CO₂) . Para o grupo controle, quando necessário, foi utilizado um “pool” de RETRO ou EPI de dois ratos, tomando-

se o cuidado de colocar, em cada tubo de incubação, a mesma proporção em peso de tecidos de cada rato utilizados para formar o “pool”.

Com o objetivo de verificar o efeito da dieta cafeteria na atividade lipolítica basal, *in vitro*, os fragmentos de tecido foram incubados como acima descrito, em condição não estimulada. A lipólise foi avaliada através da quantificação de glicerol liberado para o meio de incubação e foi determinada por espectrofotometria modificada para leitura em placas de ELISA, utilizando o kit enzimático comercial Bioclin da Quibasa®, e de AGL utilizando o kit Randox® NEFA. Os valores foram expressos em nmol de glicerol ou AGL. $\mu\text{g DNA}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$ de incubação.

O efeito da NOR na atividade lipolítica do tecido adiposo branco, dos ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria, foi avaliado pela adição desta catecolamina em diferentes concentrações (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4}M) e ácido ascórbico (0,01 M), ao meio Krebs-Henseleit acima descrito.

O efeito de agentes lipolíticos na resposta lipolítica do TAB dos ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria foi avaliado pela adição, ao meio Krebs-Henseleit acima descrito, de um análogo do AMPc, o dibutilil AMPc (DBcAMP, 10^{-3} M), da forskolina, uma droga que atua ativando o sistema da adenilil ciclase (FSK, 10^{-5} M), da isobutilmetilxantina (IBMX, 10^{-4} M) e Teofilina (THEO, 10^{-2} M), que são inibidores da fosfodiesterase do AMPc.

3.7.1) Determinação do conteúdo de DNA

Devido ao fato do presente estudo ter sido desenvolvido com fragmentos de tecido, os resultados de liberação de glicerol e de AG para o meio de incubação foram expressos como nmol. $\mu\text{g DNA}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para correção pelo número de células

correspondentes a cada grupo. A correção pela quantificação de DNA do tecido permite essa correspondência com o número de células considerando-se que o conteúdo de DNA por célula é constante nos mamíferos (*Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004*).

Para tanto, avaliamos três diferentes métodos de extração de DNA. O primeiro foi a técnica de extração utilizando o detergente catiônico CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) que tem a função de romper as membranas celulares para liberação do DNA. Como os ácidos nucleicos podem absorver radiação UV a 260 nm, o DNA pode ser quantificado utilizando-se espectrofotômetro. O segundo foi o método de Burton, 1955; cujo princípio se baseia na reação do DNA com a difenilamina formando um complexo colorido, que pode ser detectado por espectrometria de absorção a 600 nm. O último foi o método de Erwin et al., 1981; cujo princípio baseia-se na reação da desoxirribose com o ácido 3,5-diaminobenzóico (DABA) formando um composto fluorescente que é detectado por um espectrofluorímetro.

Todos os métodos avaliados foram eficientes para a extração do DNA do tecido adiposo, contudo, tanto o método que utiliza o detergente CTAB quanto o que utiliza a difenilamina sofrem contaminação com o RNA. Assim sendo, o método escolhido para a realização do presente trabalho foi o método que utiliza o reagente DABA por não ser necessária nenhuma separação de DNA e RNA, pois a reação é altamente específica para desoxirribose.

O conteúdo de DNA do RETRO e EPI, de ratos que receberam a dieta cafeteria e ratos controles, foi então avaliado pelo método fluorimétrico utilizando o DABA e DNA de esperma de salmão como padrão. O procedimento é baseado na medida do produto fluorescente da reação específica entre o DABA e a

desoxirribose. Fragmentos de tecido adiposo (~ 200 mg) foram imersos em TCA 5% e homogeneizados em politron. Em seguida, os homogenados foram centrifugados a 11.000 r.p.m., 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante, descartado. O pellet foi então ressuspenso em TCA 5%, e as amostras e os padrões foram incubados em banho-maria por 30 minutos, a 90°C, para hidrólise do DNA. As amostras foram então resfriadas em gelo e os aldeídos resultantes da hidrólise do DNA foram separados por centrifugação. Uma alíquota de 50 µl do hidrolisado foi diluída em 0,45 ml de TCA 5%. As amostras e a curva padrão foram então incubadas na presença de 200 µl de uma solução de DABA (200 mg/ml) durante 1 hora a 60°C. As amostras foram resfriadas em gelo, e foram adicionados 2 ml de HCl 1N no momento da leitura. A fluorescência emitida pelo produto formado entre o DABA e a desoxirribose liberada foi medida em espectrofluorímetro Schmadzu, com comprimentos de ondas de 412 nm (excitação) e 520 nm (emissão). O conteúdo total de DNA dos fragmentos de tecido foi utilizado para a correção da concentração de glicerol e de AGL liberados para o meio de incubação.

3.8) Análises bioquímicas

A concentração de proteínas totais na musculatura esquelética foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A concentração plasmática de AGL foi medida por titulação com base fraca segundo o método de Dole & Meinertz (1960). A medida da glicemia foi realizada pelo método da glicose oxidase utilizando o kit Glucos 500 (Dole Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda). A concentração de etanol foi determinada pelo método bioquímico de Bent & Gutmann, 1974 e Hickner, *et al.*; 1992.

3.9) Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou como médias percentuais $\pm$ EPM dos grupos experimentais em relação aos grupos controles (considerados como 100%). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste Two Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls e/ou teste t de Student e nível de significância adotado foi menor ou igual a 5% ($P \leq 0,05$).

Resultados

4) Resultados

4.1) Peso corporal

Os pesos dos animais controles (alimentados com a dieta balanceada) e dos ratos submetidos à dieta cafeteria foram acompanhados diariamente e estão representados na figura 4. O peso corporal destes animais ao final de 24 dias de dieta foi semelhante ao dos animais controles (235 ± 5 g).

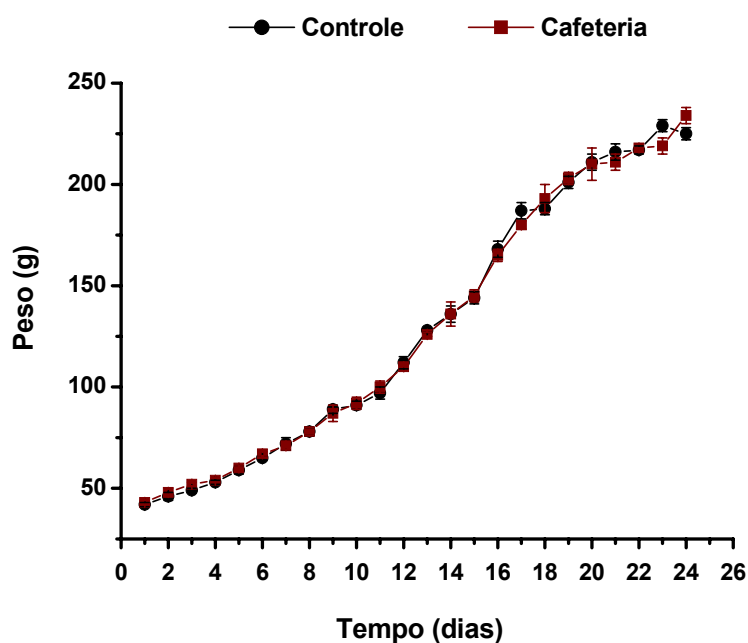


Figura 4 – Peso corporal (g) de ratos alimentados com a dieta cafeteria e de animais controles. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 a 20 animais.

4.2) Parâmetros metabólicos plasmáticos

Na figura 5 estão representados os valores médios de glicemia de animais do grupo cafeteria e do grupo controle durante o período de administração da dieta.

Nos animais alimentados com a dieta balanceada os valores de glicemia plasmáticos variaram de 131 mg.dl⁻¹ para 148 mg.dl⁻¹ após 2 semanas e para 144 mg.dl⁻¹ após 21 dias, havendo um aumento de aproximadamente 12% em relação a primeira semana de dieta. Contudo, os valores glicêmicos no grupo cafeteria foram semelhantes até o final do período avaliado. Dessa forma, não foi observado diferenças na concentração plasmática de glicose entre os grupos nutricionais após a segunda semana de estudo. Além disso, foi observado na primeira semana uma diferença de 11% na glicemia dos animais controles quando comparado com os animais do grupo cafeteria.

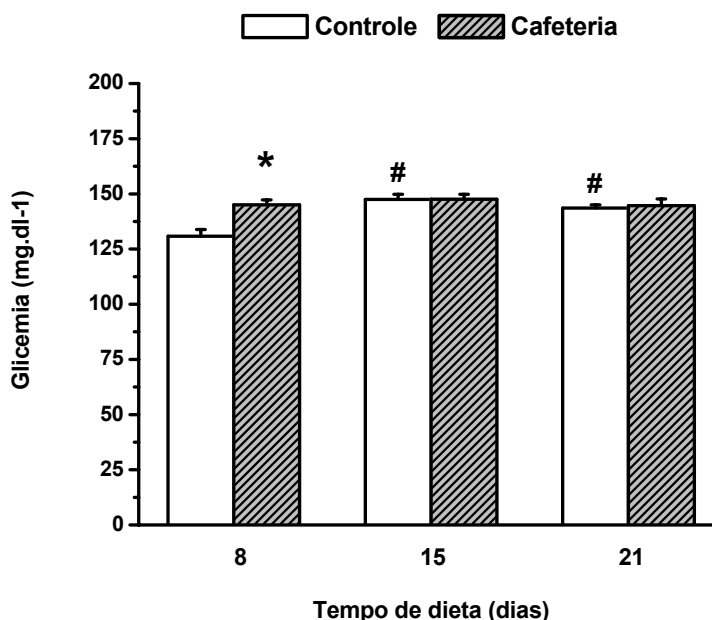


Figura 5 – Glicemia (mg.dl⁻¹) de ratos alimentados com as dietas cafeteria e controle. Os valores representam a média ± EPM de 10 a 20 animais. * $P < 0,05$ vs controle. # $P < 0,05$ vs 8 dias.

Nos animais alimentados com a dieta balanceada os valores de AGL plasmáticos variaram de $0,338 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ após 1 semana para $0,458 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ após 21 dias, havendo um aumento de $0,120 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ ou 35%. Nos animais alimentados com a dieta cafeteria, embora os valores de AGL fossem semelhantes aos controles após uma semana na dieta, houve um aumento de 43%. Contudo, a dieta cafeteria não alterou os níveis plasmáticos de AGL durante todo o período avaliado entre os grupos estudados (Tabela 2 e Figura 6).

Ao final do período experimental foi verificado que a dieta cafeteria promoveu um aumento significativo nos níveis plasmáticos de TAG quando comparado com os controles (Figura 7).

Tabela 2 – Níveis plasmáticos de AGL de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tempo (dias)	AGL ($\mu\text{mol.ml}^{-1}$)	
	Controle	Cafeteria
8	$0,338 \pm 0,017$ (17)	$0,358 \pm 0,010$ (18)
15	$0,469 \pm 0,022$ (21)#	$0,505 \pm 0,013$ (22) #
21	$0,458 \pm 0,021$ (10)#	$0,513 \pm 0,03$ (10)#

Os valores representam a média $\pm$ EPM. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. # $P < 0,05$ vs 8 dias.

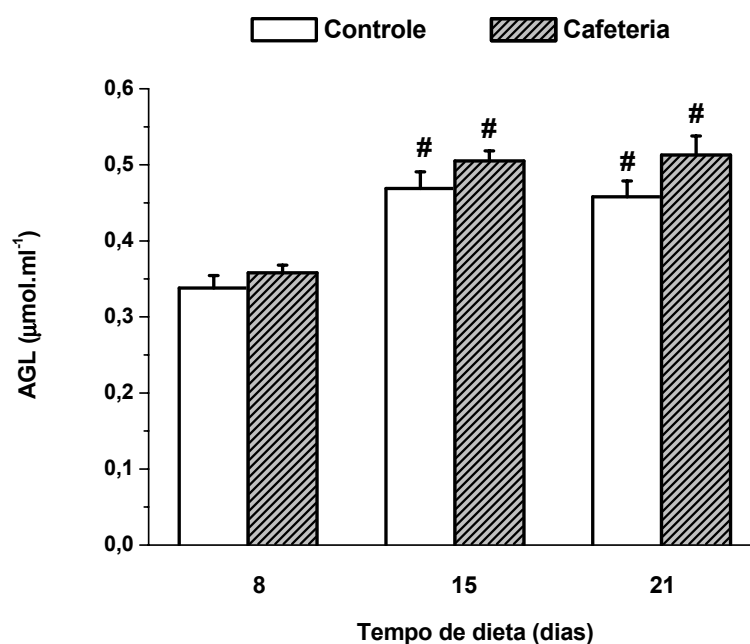


Figura 6 – AGL plasmáticos (μmol.ml⁻¹) de ratos alimentados com a dieta cafeteria e animais controles. Os valores representam a média ± EPM de 8 a 22 animais. #P<0,05 vs 8 dias.

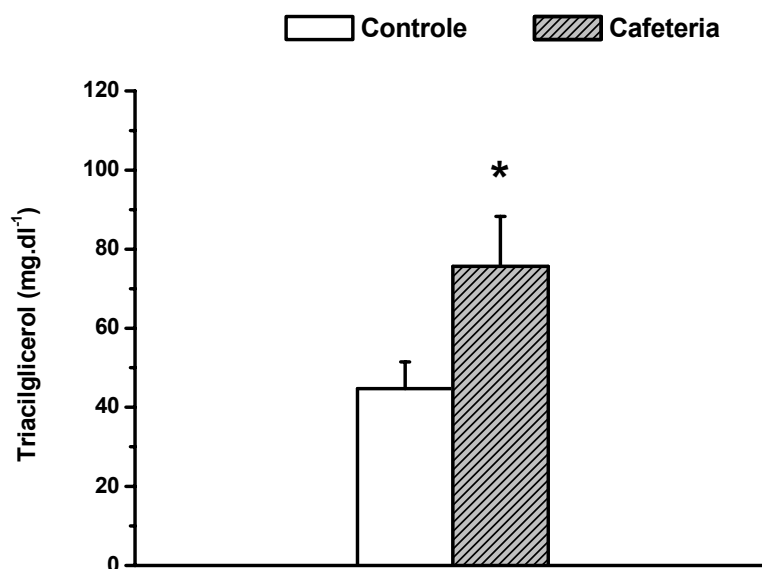


Figura 7 – TAG plasmático (mg.dl⁻¹) de ratos alimentados com a dieta cafeteria e com a dieta controle. Os valores representam a média ± EPM de 10 animais por grupo. *P<0,05 vs controle.

4.3) Teste de tolerância à glicose (GTT)

A fim de determinar o efeito da dieta cafeteria na concentração plasmática de glicose, foi realizado um teste de tolerância à glicose (GTT) em ratos controles e alimentados com essa dieta durante 40, 50, 60 e 90 dias.

Após jejum de 12h, a concentração plasmática de glicose obtida em cada um dos tempos de coleta e a porcentagem da redução dessa concentração com o decorrer do tempo não sofreu alterações entre os dois grupos estudados em todo o período avaliado.

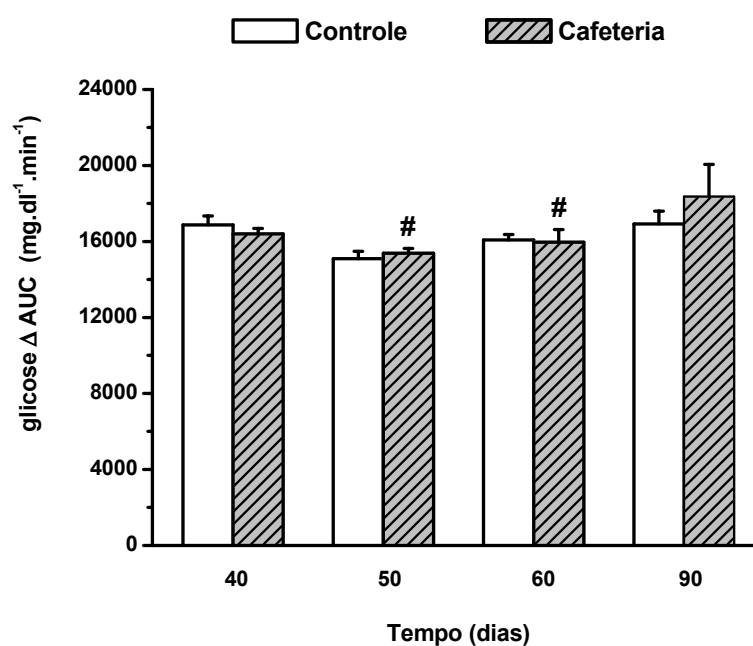


Figura 8 – Concentração de glicose plasmática no teste de tolerância à glicose de ratos alimentados com a dieta cafeteria e com a dieta controle. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. # $P < 0,05$ vs 90 dias.

4.4) Peso de diferentes depósitos do TAB

Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram aumento de aproximadamente 3 vezes, após 8 e 10 dias de dieta e aumento de 4 vezes após 21 dias no peso dos tecidos RETRO e EPI , quando comparado aos animais controles. (Figuras 9 e 10). A variação do peso dos tecidos de cada grupo, ao longo do tempo estudado, não foi avaliada.

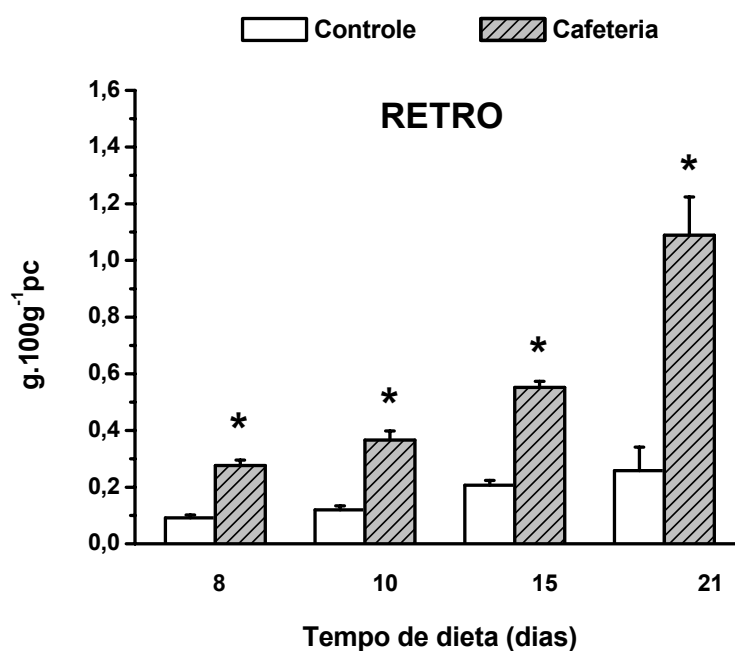


Figura 9 – Efeito da dieta cafeteria no peso do TAB RETRO de ratos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 a 20 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

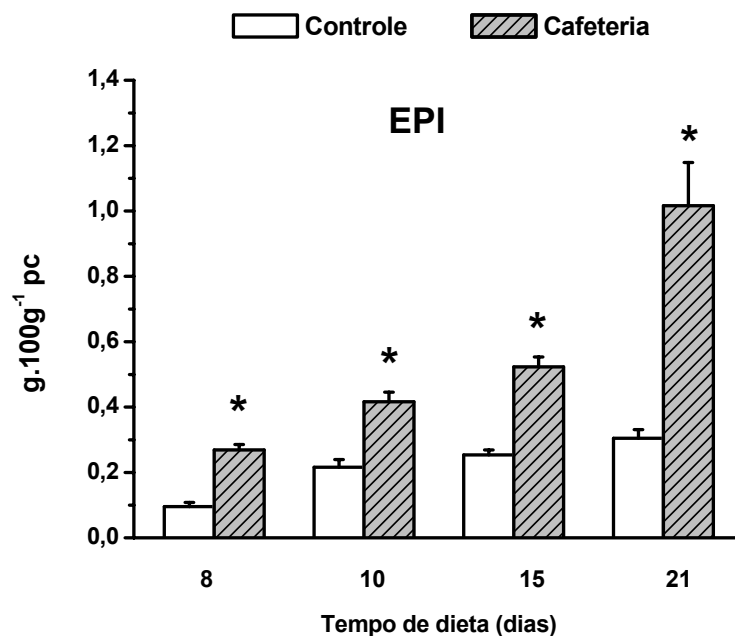


Figura 10 – Efeito da dieta cafeteria no peso do TAB EPI. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 a 20 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.5) Lipídios totais no TAB RETRO e EPI

Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram um aumento de aproximadamente 31%, 10% e 8% no conteúdo de gordura do RETRO, e de 52%, 18% e 5% no EPI, em relação ao grupo controle, após 10, 15 e 21 dias de dieta (Figuras 11 e 12). A variação no conteúdo dos tecidos de cada grupo, ao longo do tempo estudado, não foi avaliada.

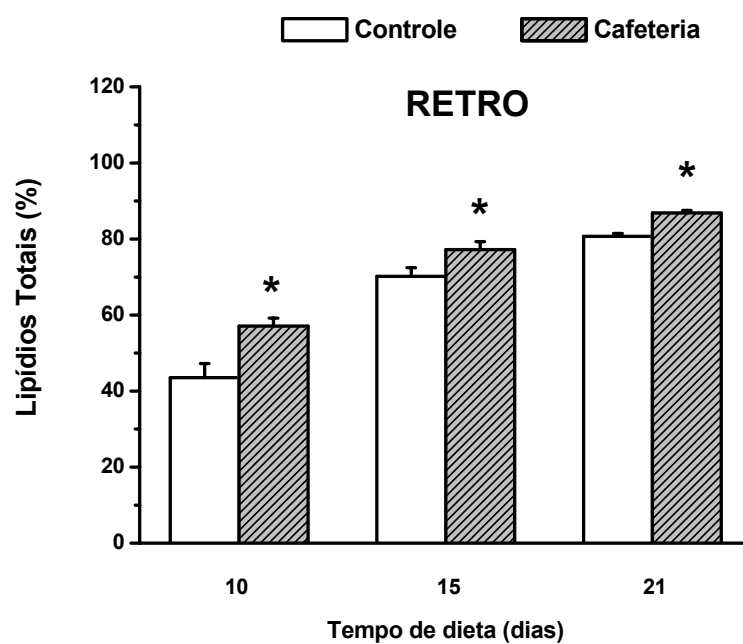


Figura 11 – Efeito da dieta cafeteria no conteúdo de gordura do RETRO. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 a 22 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

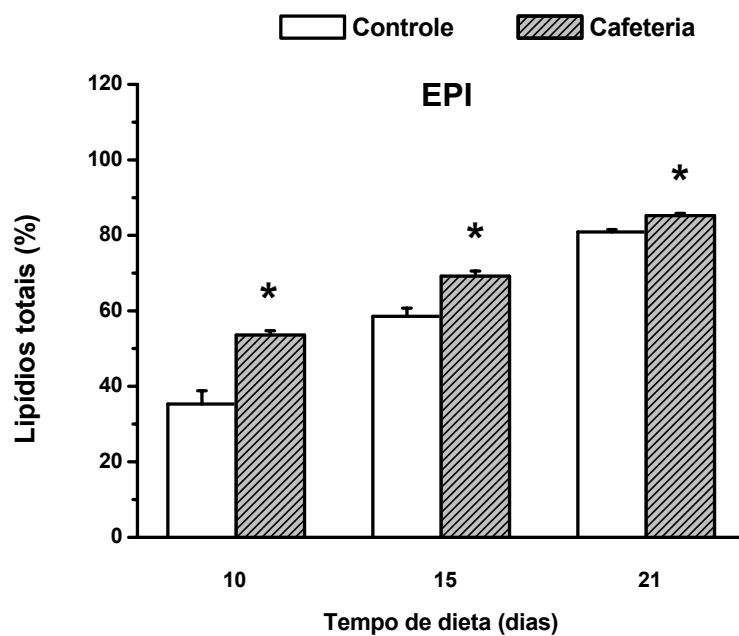


Figura 12 – Efeito da dieta cafeteria no conteúdo de gordura do EPI. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 a 22 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.6) Lipídios totais em músculos esqueléticos

A dieta cafeteria não alterou o conteúdo lipídico dos músculos EDL e *tibialis* anterior. Entretanto, nos músculos *soleus* e *gastrocnemius*, induziu um aumento de 55% e 18%, respectivamente, no conteúdo lipídico, comparado com os controles (Tabela 3 e Figura 13).

Tabela 3 – Conteúdo lipídico de músculos esqueléticos de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Músculos	Lipídios totais (%)	
	Controle	Cafeteria
EDL	1,61 ± 0,15 (15)	1,79 ± 0,14 (20)
<i>Tibialis</i>	1,67 ± 0,28 (11)	1,69 ± 0,16 (15)
<i>Soleus</i>	2,48 ± 0,16 (17)	3,85 ± 0,29 (23) *
<i>Gastrocnemius</i>	2,26 ± 0,10 (14)	2,67 ± 0,12 (15)*

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

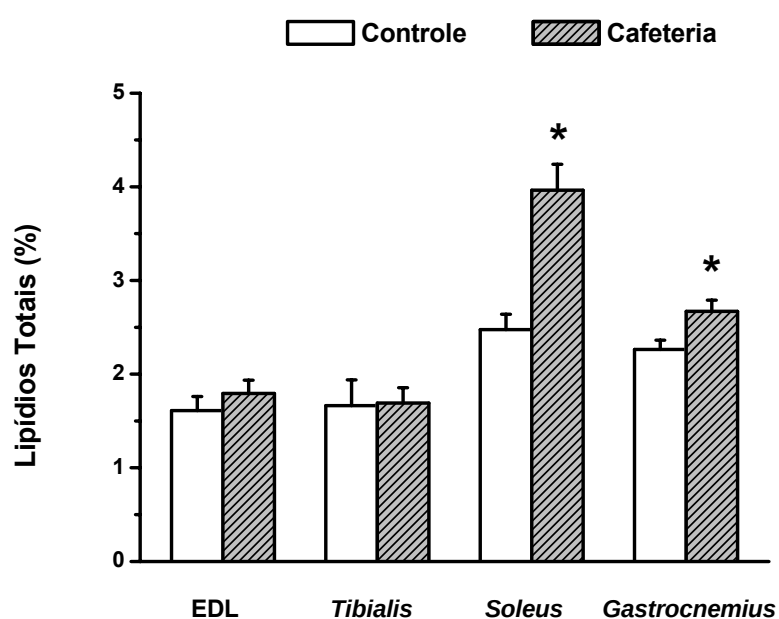


Figura 13 – Efeito da dieta cafeteria no conteúdo de gordura de músculos esqueléticos. Os valores representam a média ± EPM de 14 a 24 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.7) Peso e concentração de proteínas totais da musculatura esquelética

Ao final de 21 dias de dieta foi observado que ratos alimentados com a dieta cafeteria apresentaram uma redução significativa no peso dos músculos EDL (10%), *tibialis* (12%) e *soleus* (14%). Entretanto, nenhuma diferença foi observada no peso dos músculos *gastrocnemius* quando comparado com os controles (Tabela 4 e Figura 14).

Tabela 4 – Peso da musculatura esquelética de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tecidos	Peso dos músculos (mg.100g ⁻¹ pc)	
	Controle	Cafeteria
EDL	46,70 ± 1,03 (15)	41,97 ± 0,68 (15)*
<i>Tibialis</i>	170,51 ± 3,27 (12)	149,56 ± 5,00 (16)*
<i>Soleus</i>	52,70 ± 1,00 (17)	45,20 ± 1,40 (24)*
<i>Gastrocnemius</i>	440,93 ± 14 (6)	426,20 ± 5,00 (11)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados.

* $P < 0,05$ vs controle.

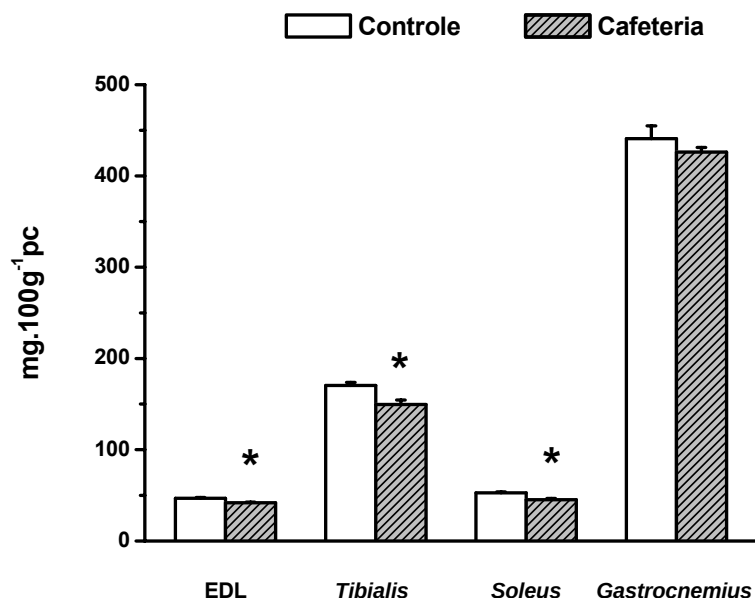


Figura 14 – Efeito da dieta cafeteria no peso de músculos esqueléticos de ratos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 14 a 24 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

Nossos dados demonstram que animais alimentados com a dieta cafeteria apresentam uma redução de 7%, 13% e 11% no conteúdo protéico dos músculos EDL, *tibialis*, e *soleus*, respectivamente, sem alterar o conteúdo protéico do músculo *gastrocnemius* (Tabela 5 e Figura 15).

Tabela 5 – Conteúdo protéico de músculos esqueléticos de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tecidos	Proteínas totais (mg.100 mg ⁻¹)	
	Controle	Cafeteria
EDL	10,2 $\pm$ 0,4 (6)	9,5 $\pm$ 0,5 (7)*
<i>Tibialis</i>	14,9 $\pm$ 0,6 (6)	12,9 $\pm$ 0,3 (7)*
<i>Soleus</i>	10,1 $\pm$ 0,3 (7)	9,0 $\pm$ 0,3 (10)*
<i>gastrocnemius</i>	14,7 $\pm$ 1,3 (4)	14,2 $\pm$ 6,2 (6)

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados.

* $P < 0,05$ vs controle.

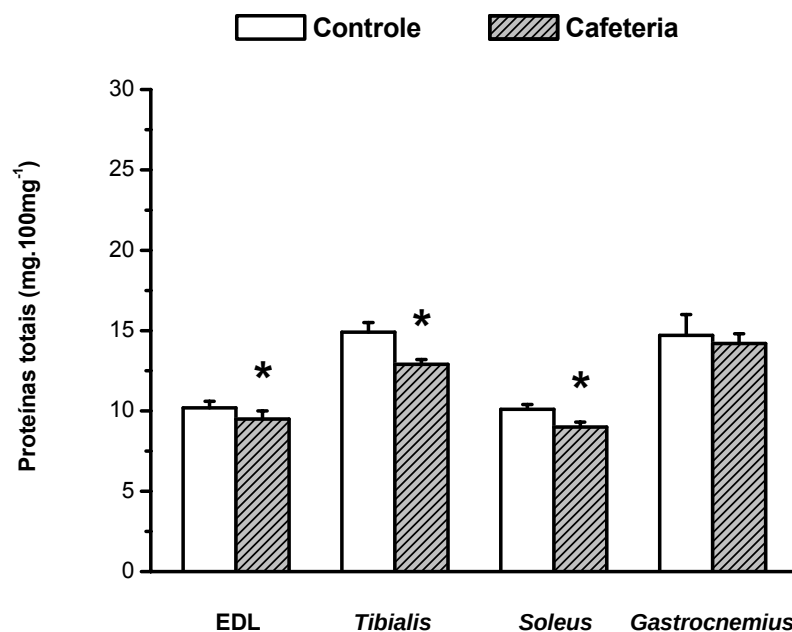


Figura 15 – Efeito da dieta cafeteria no conteúdo protéico da musculatura esquelética de ratos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 a 10 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.8) Metabolismo de proteínas, *in situ*, em músculo esquelético

4.8.1) Tirosina liberada pela musculature esquelética

Com o objetivo de verificar o efeito da dieta cafeteria no metabolismo protéico *in situ* na musculatura esquelética de ratos, a concentração intersticial de tirosina foi avaliada indiretamente pela técnica da microdiálise. Os resultados foram calculados pela diferença entre as concentrações de tirosina intersticial, no músculo *Tibialis*, e no sangue arterial. A figura 16 mostra que o índice I – A, calculado a partir dos valores de recuperação do cateter, foi de $30,3 \pm 2,02$ nmol/ml no grupo controle e de $49,3 \pm 4,14$ nmol/ml no grupo cafeteria indicando que os ratos cafeteria apresentaram um aumento significativo de 63% na liberação de tirosina muscular em relação aos controles. A

concentração de tirosina no interstício ($107,2 \pm 3,64$ vs $134,9 \pm 6$ nmol/ml) foi sempre maior que a sua concentração arterial ($75,8 \pm 2,8$ vs $86,5 \pm 3,6$ nmol/ml) em ambos os grupos (tabela 6 e figura 16) indicando liberação de tirosina pelos músculos.

Tabela 6 – Tirosina liberada pelo tecido muscular, *in situ*, após 90 minutos de microdiálise, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

	Tirosina (nmol.ml ⁻¹)	
	Controle	Cafeteria
Intersticial	$107,2 \pm 3,6$ (11)	$134,9 \pm 6,0$ (13)*
Arterial	$75,8 \pm 2,8$ (11)	$86,5 \pm 3,6$ (13)*
Índice I – A	$30,3 \pm 2,0$ (11)	$49,3 \pm 4,1$ (13)*

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P < 0,05$ vs controle.

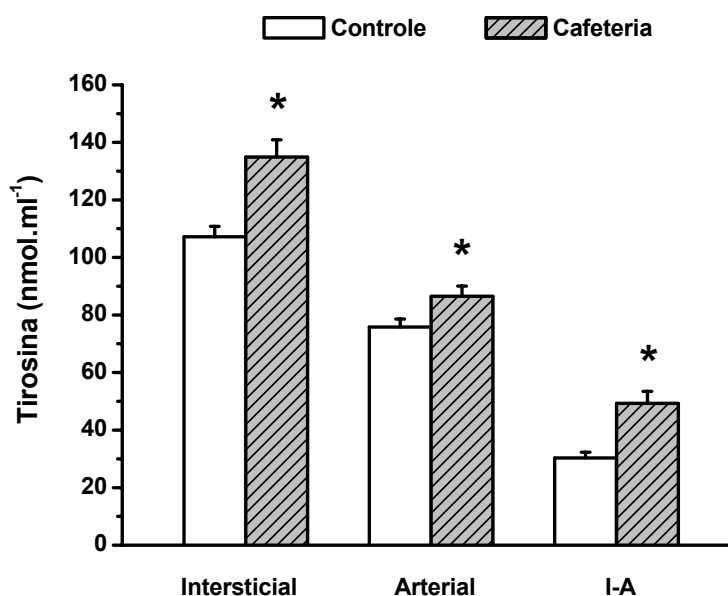


Figura 16 – Concentração intersticial (I), arterial (A) e índice I – A de tirosina em músculos de ratos alimentados com a dieta cafeteria ou controle. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 11 a 13 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.8.2) Extração fracional de etanol na musculatura esquelética – medida do fluxo sanguíneo local no tecido muscular

Como é sabido, o espaço intersticial é influenciado não apenas pelo metabolismo celular, mas também pela microcirculação, e, portanto, a concentração de uma substância em particular depende do metabolismo celular, bem como, do fluxo sanguíneo local. Assim sendo, embora tenha apresentado diferença significativa após 30 minutos de perfusão de etanol, nossos resultados demonstram que ratos alimentados com uma dieta cafeteria não apresentam alteração no fluxo sanguíneo muscular perfundido ao longo do tempo, quando comparado com os animais controles (figura 17). Esses resultados são importantes para validar os achados que animais alimentados com a dieta cafeteria apresentam aumento de liberação de tirosina do tecido muscular, independentemente da alteração da microcirculação local.

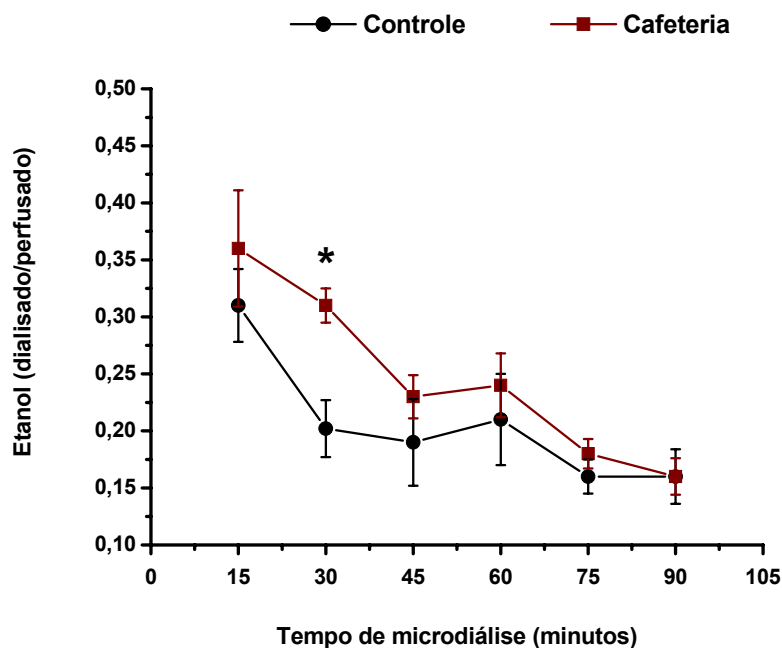


Figura 17 – Efeito da dieta cafeteria na extração fracional de etanol no músculo *tibialis* de ratos. Os valores representam a média ± EPM de 6 a 7 animais. * $P < 0,05$ vs controle.

4.9) Atividade lipolítica, *in situ*, do TAB

4.9.1) Glicerol liberado pelo TAB

Confirmando os achados *in vitro*, pudemos observar em experimentos *in situ*, no RETRO, que ratos alimentados com a dieta cafeteria apresentam um aumento na atividade lipolítica basal quando comparado com os animais controles. A concentração intersticial de glicerol foi maior que a concentração arterial indicando liberação de glicerol pelo RETRO para o interstício em ambos os grupos. O grupo cafeteria apresentou aumento das concentrações de glicerol liberado no interstício e no plasma em relação ao controle, cujos valores foram mantidos constantes ao longo de todo o período avaliado. O aumento observado foi de ~ 62%, avaliado pela diferença no índice I-A que foi de $0,948 \pm 0,140$ mM de glicerol nos animais cafeteria e de $0,577 \pm 0,053$ mM de glicerol nos animais controles, após 90 minutos de microdiálise. (Tabela 7 e Figura 18).

Tabela 7 – Glicerol liberado pelo tecido adiposo branco retroperitoneal, *in situ*, após 30 (A), 60(B) e 90(C) minutos de microdiálise, em ratos controles e alimentados com uma dieta cafeteria.

		Glicerol (mM)	
		Controle	Cafeteria
Tempo (minutos)	I	$0,809 \pm 0,079$ (12)	$1,116 \pm 0,101$ (10)*
	A	$0,135 \pm 0,014$ (14)	$0,262 \pm 0,030$ (10)*
	I-A	$0,600 \pm 0,081$ (14)	$0,938 \pm 0,130$ (10)*
60	I	$0,749 \pm 0,050$ (12)	$1,196 \pm 0,145$ (7)*
	A	$0,150 \pm 0,016$ (14)	$0,231 \pm 0,021$ (9)*
	I-A	$0,575 \pm 0,034$ (13)	$0,955 \pm 0,120$ (6)*
90	I	$0,742 \pm 0,070$ (11)	$1,192 \pm 0,158$ (8)*
	A	$0,125 \pm 0,010$ (8)	$0,198 \pm 0,014$ (8)*
	I-A	$0,577 \pm 0,053$ (11)	$0,948 \pm 0,140$ (8)*

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. * $P \leq 0,05$ vs controle.

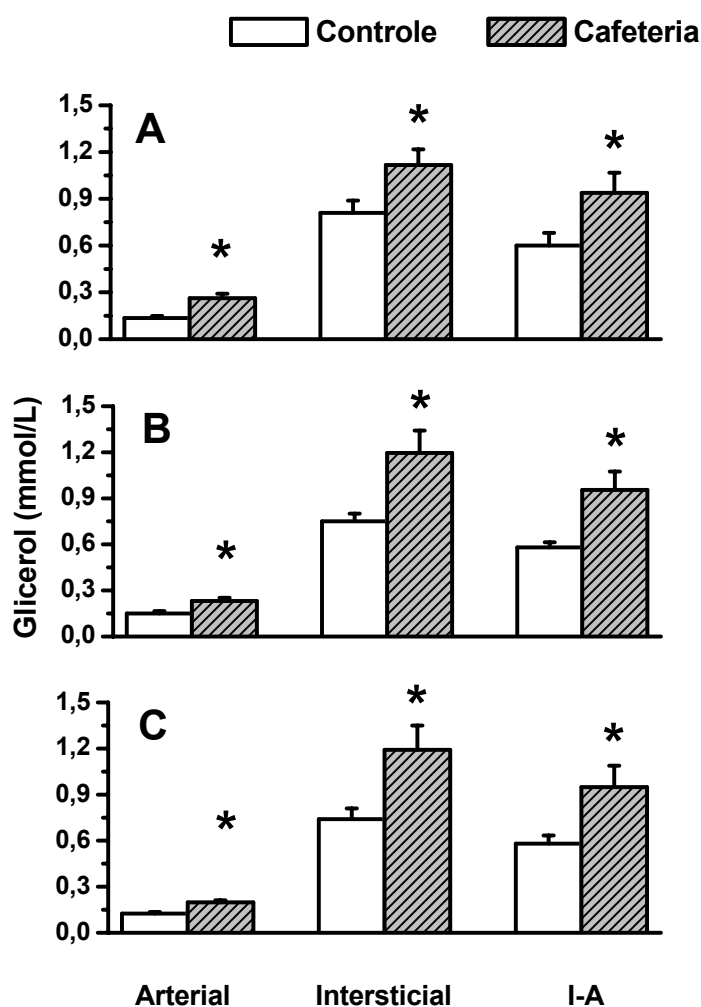


Figura 18 – Efeito da dieta cafeteria na atividade lipolítica, *in situ*, após 30 (A), 60 (B) e 90 (C) minutos de microdiálise no TAB RETRO. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 a 14 animais por grupo. *P<0,05 vs controle.

Nossos resultados demonstram que ratos alimentados com uma dieta cafeteria não apresentam alteração no fluxo sanguíneo local ao longo do tempo, quando comparado com os animais controles, indicando que as alterações metabólicas observadas na microdiálise não foram influenciadas pelo fluxo sanguíneo local (Tabela 8 e Figura 19).

Tabela 8 – Efeito da dieta cafeteria na extração fracional de etanol do tecido adiposo branco inguinal de ratos alimentados.

Tempo (minutos)	Etanol (dialisado/perfusado)	
	Controle	Cafeteria
20	0,847 ± 0,038	0,696 ± 0,075
40	0,759 ± 0,050	0,704 ± 0,039
60	0,746 ± 0,038	0,714 ± 0,044
80	0,740 ± 0,050	0,670 ± 0,057
100	0,702 ± 0,053	0,703 ± 0,052
120	0,730 ± 0,042	0,722 ± 0,035

Os valores representam a média ± EPM de 4 a 5 animais por grupo.

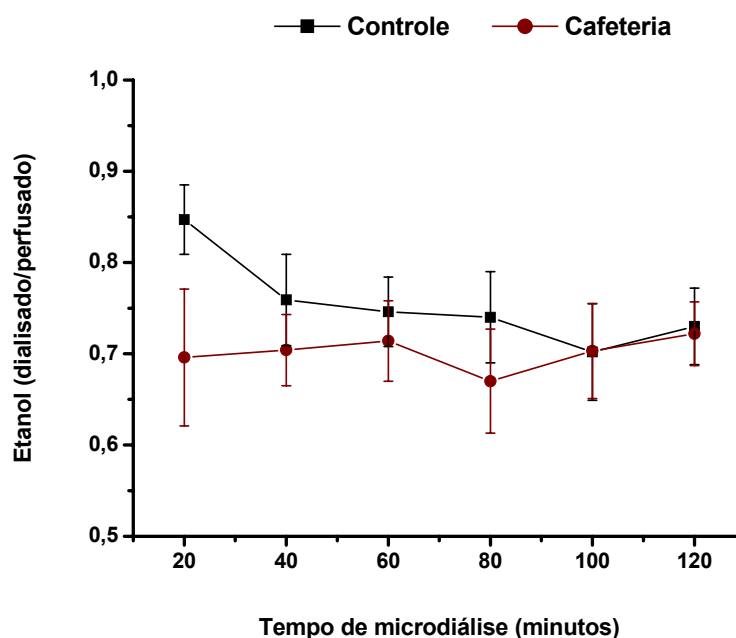


Figura 19 – Efeito da dieta cafeteria na extração fracional de etanol no TAB inguinal. Os valores representam a média ± EPM de 4 a 5 animais por grupo.

4.9.2) Atividade lipolítica, *in vitro*, do TAB

A lipólise *in vitro* foi avaliada pelos valores de glicerol e de AGL liberados por fragmentos de TAB no meio de incubação. O conteúdo de DNA de fragmentos de tecido de ambos os grupos foram determinados e os valores de glicerol e de AGL liberados pelo tecido foram corrigidos pela média do conteúdo de DNA dos fragmentos em questão (Tabela 9).

Tabela 9 – Conteúdo de DNA de fragmentos de TAB RETRO e EPI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tecidos	DNA ($\mu\text{g DNA}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	
	Controle	Cafeteria
Retroperitoneal	200 $\pm$ 21	114 $\pm$ 9*
Epididimal	262 $\pm$ 33	173 $\pm$ 22*

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 8 a 15 animais.
* $P < 0,05$ vs controle.

4.9.2.1) Lipólise basal, *in vitro*

O RETRO de ratos cafeteria apresentou um aumento de 29% na atividade lipolítica basal, avaliada pela liberação de glicerol para o meio de incubação, quando comparado com os controles. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na lipólise basal do EPI (Tabela 10 e Figura 20).

Tabela 10 – Glicerol liberado por fragmentos de TAB RETRO e EPI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tecidos	Glicerol (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)	
	Controle	Cafeteria
Retroperitoneal	13,21 ± 0,77 (18)	17,04 ± 1,44 (22)*
Epididimal	12,62 ± 0,84 (22)	14,24 ± 0,75 (19)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle.

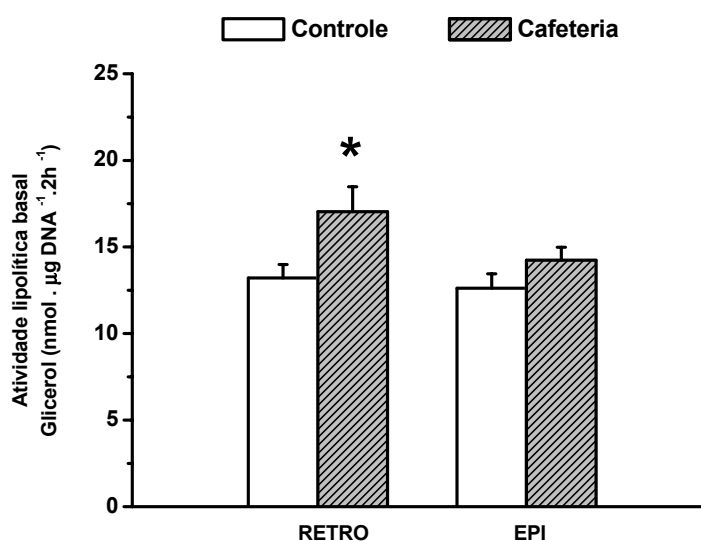


Figura 20 – Efeito da dieta cafeteria na atividade lipolítica basal, *in vitro*, do TAB de ratos. Os valores representam a média ± EPM de 18 a 22 amostras. *P<0,05 vs controle.

A dieta cafeteria induziu um aumento de 152% e 27% na liberação de AGL para o meio de incubação do RETRO e EPI respectivamente, quando comparados com os controles (Tabela 11 e Figura 21).

Tabela 11 – Ácidos graxos livres liberados por fragmentos de TAB RETRO e EPI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria.

Tecidos	Ácidos graxos livres (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)	
	Controle	Cafeteria
Retroperitoneal	14,48 ± 1,75 (17)	30,09 ± 1,93 (20)*
Epididimal	4,75 ± 0,40 (15)	6,01 ± 0,42 (18)*

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle.

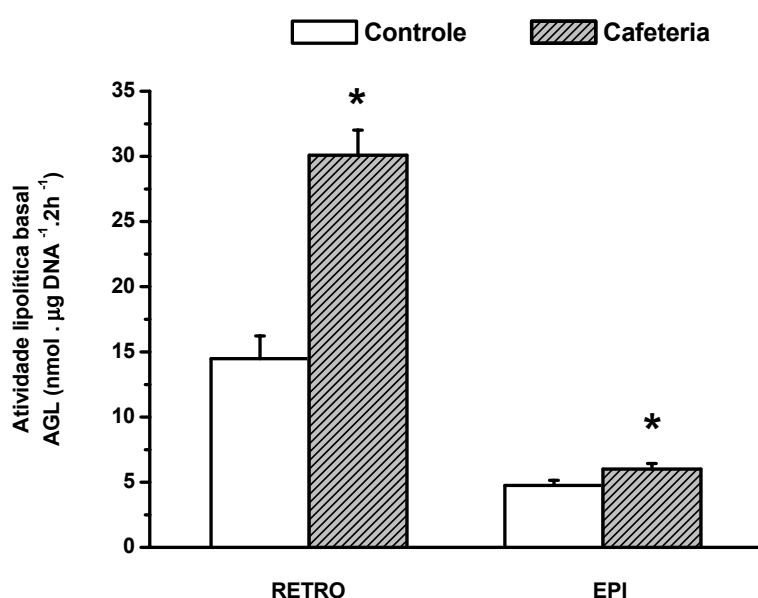


Figura 21 – Efeito da dieta cafeteria na lipólise basal, *in vitro*, de fragmentos de TAB RETRO e EPI. Os valores representam a média ± EPM de 15 a 20 amostras; *P≤0,05 vs controle.

4.9.2.2) Efeito da NOR na atividade lipolítica do TAB

Sabendo-se que as catecolaminas exercem um papel lipolítico clássico na lipólise, o presente trabalho avaliou possíveis alterações na resposta do TAB de ratos alimentados com a dieta cafeteria, frente a diferentes concentrações de NOR. Na tabela 12 estão apresentados os valores médios de glicerol liberado pelo RETRO para o meio de incubação. Verificou-se que a dieta cafeteria promoveu um aumento na lipólise basal de 64%, e de 114%, 86%, 108% e 48% na lipólise estimulada pela NOR nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente, em relação aos animais controles.

Ao analisarmos os resultados em termos de acréscimo em relação ao nível basal de glicerol, os efeitos do hormônio são significativamente maiores nos ratos alimentados com a dieta cafeteria do que nos animais que receberam a dieta padrão (Tabela 12 e Figura 22).

Tabela 12 – Glicerol ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g DNA}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$) liberado por fragmentos de TAB RETRO, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de diferentes concentrações de NOR.

	Controle	Δ	Cafeteria	Δ
	Basal	$2,97 \pm 0,52$ (11)	$4,86 \pm 0,63$ (9)*	
	(10^{-7})	$15,01 \pm 1,49$ (8)#	$32,15 \pm 1,95$ (8)*#	27,3
NOR	(10^{-6})	$53,20 \pm 1,35$ (8)#	$98,79 \pm 2,01$ (5)*#	93,9
(M)	(10^{-5})	$54,47 \pm 1,78$ (5)#	$113,53 \pm 2,28$ (8)*#	108,7
	(10^{-4})	$51,71 \pm 1,52$ (4)#	$76,47 \pm 2,8$ (6)*#	71,6

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

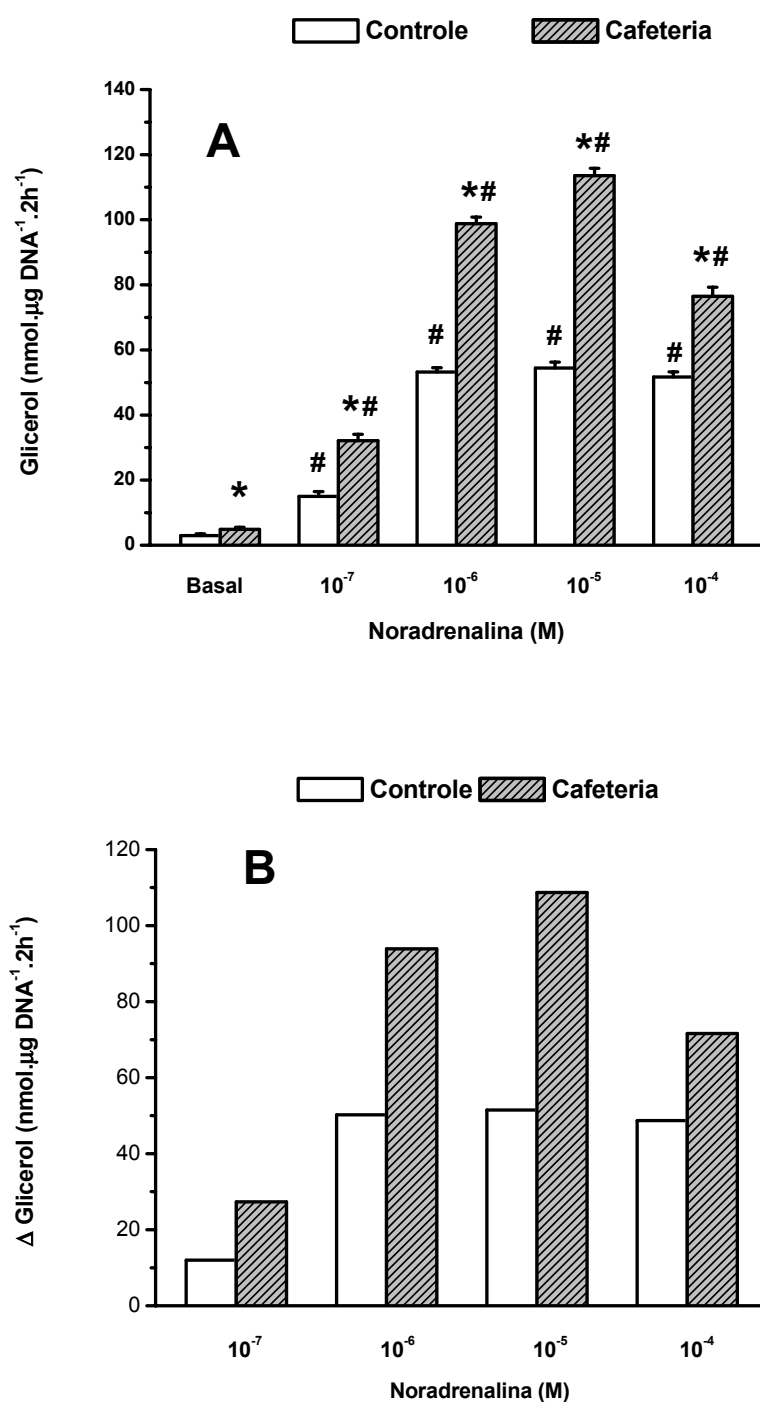


Figura 22 – **A** - Efeito de diferentes concentrações de NOR na lipólise em fragmentos de RETRO de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. **B** - Diferenças dos valores de glicerol obtidos na presença da NOR. Os valores representam a média ± EPM de 6 a 12 amostras por grupo.*P≤0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

Corroborando os achados na liberação de glicerol para o meio de incubação, a dieta cafeteria promoveu um aumento na liberação de AGL de 142% em meio basal e de 171%, 95%, 100% e 13% no meio contendo NOR nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente, em relação aos animais controles. No que concerne à magnitude de aumento em relação aos valores basais, semelhante ao observado com a liberação de glicerol, o efeito do hormônio foi maior nos animais cafeteria comparado com os animais controles (Tabela 13 e Figura 23).

Tabela 13 – AGL (nmol.µg DNA⁻¹.2h⁻¹) liberados por fragmentos de RETRO, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de diferentes concentrações de NOR.

		Controle	Δ	Cafeteria	Δ
NOR (M)	Basal	12,64 ± 2,42 (12)		30,58 ± 3,59 (12)*	
	(10⁻⁷)	23,51 ± 3,85 (12)#	10,9	63,62 ± 6,26 (10)*#	33,0
	(10⁻⁶)	59,51 ± 2,22 (11)#	46,9	115,95 ± 4,82 (7*)#	85,4
	(10⁻⁵)	72,64 ± 1,97 (10)#	60,0	145,28 ± 4,05 (9)*#	114,7
	(10⁻⁴)	52,05 ± 1,25 (8)#	39,0	59,03 ± 1,33 (6)*#	28,5

Os valores representam a média ± erro padrão da média. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

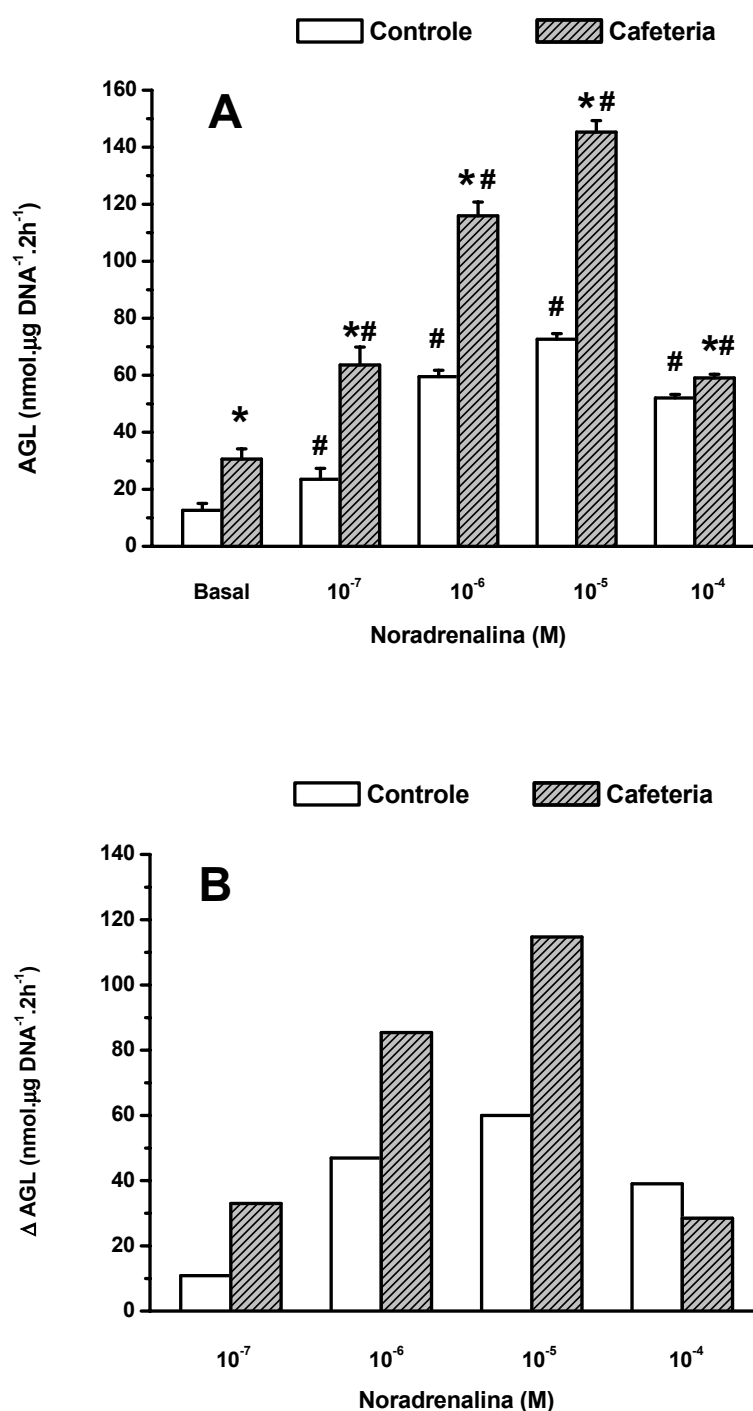


Figura 23 – **A** - Efeito de diferentes concentrações de NOR na lipólise em fragmentos de RETRO de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. **B** – Diferenças dos valores de AGL obtidos na presença da NOR. Os valores representam a média ± EPM de 5 a 12 amostras por grupo.*P≤0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

Como podemos verificar, o mesmo fenômeno foi observado no EPI em relação à liberação de glicerol (Tabela 14 e Figura 24) e de AGL (Tabela 15 e Figura 25) para o meio de incubação quando o efeito da dieta cafeteria foi avaliado (com exceção do meio sem estímulo). A dieta promoveu um aumento de 92%, 43%, 92% e 56% na liberação de glicerol e de 132%, 67%, 44%, 89% na liberação de AGL na lipólise estimulada pela NOR nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente, em relação aos animais controles.

Ao se analisar o efeito da NOR, em termos de acréscimo, em relação aos valores basais, também se observa um aumento na liberação dos metabólitos em questão, nos animais que receberam a dieta cafeteria.

Tabela 14 – Glicerol ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g DNA}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$) liberado por fragmentos de TAB EPI, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de diferentes concentrações de NOR.

		Controle	Δ	Cafeteria	Δ
NOR (M)	Basal	$3,49 \pm 0,49$ (12)		$4,36 \pm 1,00$ (12)	
	(10^{-7})	$22,06 \pm 0,98$ (8)#	18,6	$42,26 \pm 2,33$ (9)*#	37,9
	(10^{-6})	$57,82 \pm 1,26$ (6)#	54,3	$82,39 \pm 2,33$ (8)*#	78,0
	(10^{-5})	$46,05 \pm 2,28$ (4)#	42,6	$88,24 \pm 2,93$ (4)*#	83,9
	(10^{-4})	$49,22 \pm 1,39$ (6)#	45,7	$76,73 \pm 3,64$ (6)*#	72,4

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. * $P < 0,05$ vs controle; # $P < 0,05$ vs basal.

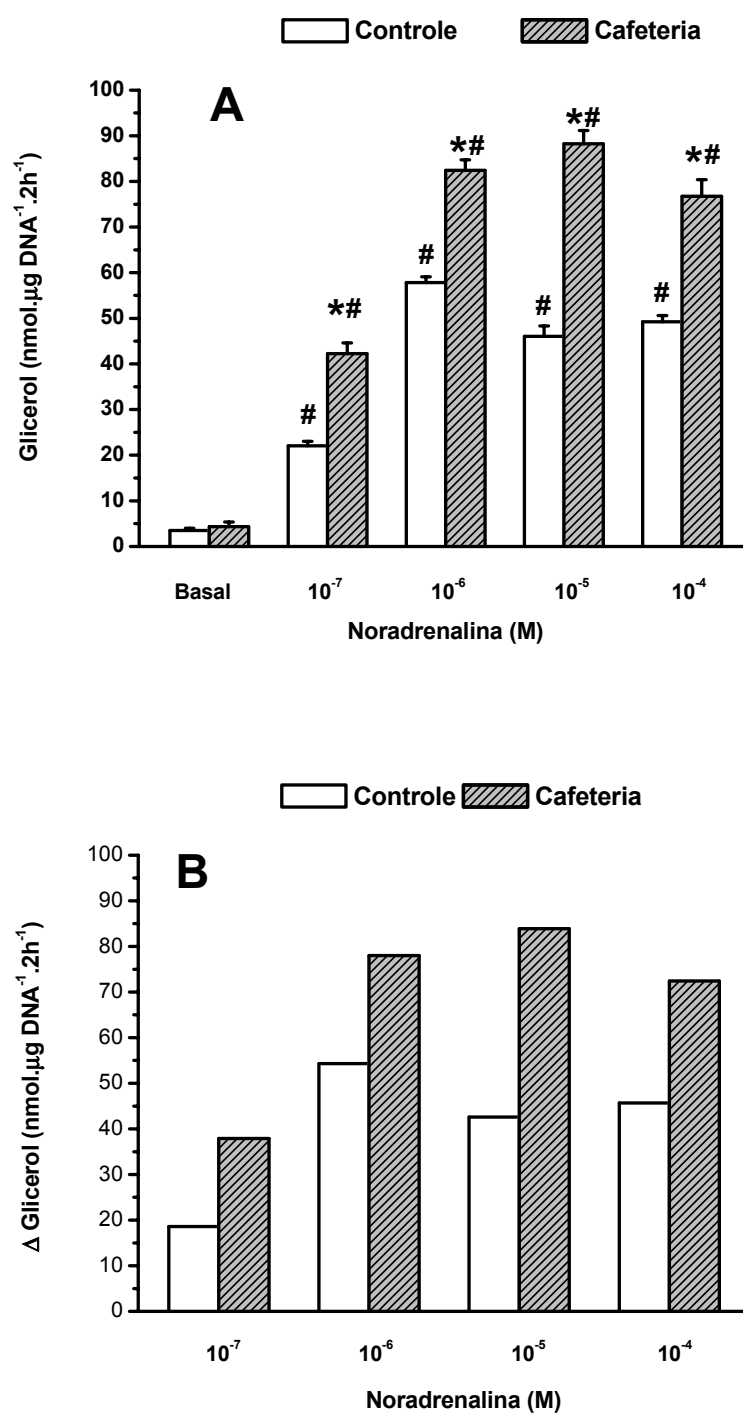


Figura 24 – **A** - Efeito de diferentes concentrações de NOR na lipólise em fragmentos de EPI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. **B** – Diferenças dos valores de glicerol obtidos na presença da NOR. Os valores representam a média ± EPM de 4 a 12 amostras por grupo.*P≤0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

Tabela 15 – AGL (nmol.µg DNA⁻¹.2h⁻¹) liberado por fragmentos de TAB EPI, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de diferentes concentrações de NOR.

		Controle	Δ	Cafeteria	Δ
NOR (M)	Basal	5,27 ± 0,53 (12)		5,99 ± 0,44 (12)	
	(10⁻⁷)	20,27 ± 1,27 (6)#	15,0	47,07 ± 1,27 (4)*#	41,1
	(10⁻⁶)	45,52 ± 1,74 (4)#	40,3	76,15 ± 2,04 (4)*#	70,2
	(10⁻⁵)	52,50 ± 1,55 (8)#	47,2	75,49 ± 1,10 (6)*#	69,5
	(10⁻⁴)	73,21 ± 3,71 (12)#	67,9	138,26 ± 6,05 (12)*#	132,27

Os valores representam a média ± erro padrão da média. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

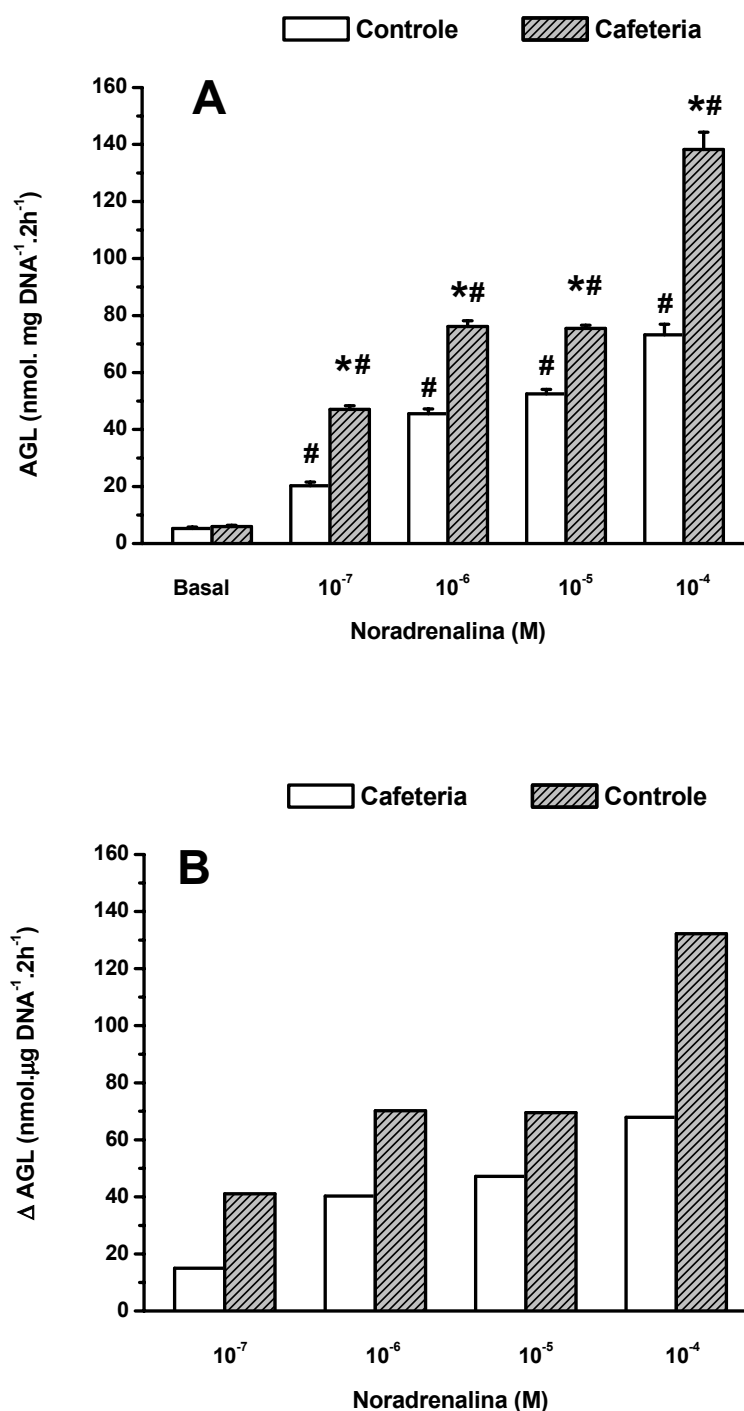


Figura 25 – A - Efeito de diferentes concentrações de NOR na liberação de AGL de fragmentos de EPI de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria. **B** – Diferenças dos valores de AGL obtidos na presença da NOR. Os valores representam a média ± EPM de 5 a 12 amostras por grupo. *P≤0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

4.9.2.3) Efeito de agentes lipolíticos na atividade lipolítica do TAB

A figura 26 mostra o efeito da dieta cafeteria na resposta lipolítica do RETRO e do EPI quando incubados na presença de diferentes agentes lipolíticos. Comparando-se aos efeitos obtidos nos animais controles, no RETRO, a liberação de glicerol em resposta à ação dos agentes lipolíticos aumentou, nos animais cafeteria, em 53% e 47% para o IBMX e para o DBAMPc, respectivamente, e em 59% para a THEO. Entretanto, não se observou alterações na liberação de glicerol frente à ação da FSK, na concentração utilizada no presente estudo (Tabela 16 e Figura 26).

Em relação ao EPI, como podemos observar, a dieta cafeteria promoveu uma maior liberação de glicerol em resposta a presença dos agentes lipolíticos no meio de incubação. Esse aumento foi de 61%, 19% e de 51% para o IBMX, para o DBAMPc e para a THEO, respectivamente. Contudo, diferente do ocorrido para o tecido RETRO, a concentração de FSK utilizada foi suficiente para promover um aumento na liberação de glicerol de 87% neste tecido (Tabela 18 e Figura 28).

A liberação de AGL pelo RETRO (Tabela 17 e Figura 27) nos animais cafeteria também aumentou em 95%, 125% e 84% para o IBMX, para o DBAMPc e para a THEO, respectivamente. Entretanto, contrariando a resposta obtida para o glicerol a FSK promoveu um aumento de 91% na liberação de AGL, nos animais cafeteria quando comparados com os animais controles. Resposta semelhante foi observada no EPI (Tabela 19 e figura 29) de ratos cafeteria que apresentaram um aumento, na liberação de AGL, de 136%, 27% e 68% para o IBMX, para o DBAMPc e para a THEO, respectivamente. Em relação à FSK, esta foi capaz de promover um

aumento de 127% na liberação de AGL para o EPI de animais cafeteria comparado com os controles.

Quando analisamos os resultados em termos de acréscimo em relação ao nível basal, tanto o glicerol quanto o AGL se encontram aumentados, nos animais cafeteria, quando comparados com os controles, em ambos os tecidos (Tabelas 16-19 e Figuras 26-29 B).

Tabela 16 – Glicerol liberado por fragmentos de TAB RETRO, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de agentes lipolíticos.

Condição de incubação	Glicerol (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)			
	Controle	Δ	Cafeteria	Δ
Basal	12,99 ± 0,86 (7)		19,08 ± 2,29 (8) *	
IBMX (10⁻⁴M)	57,79 ± 3,67 (4) #	44,8	88,20 ± 5,82 (8) *#	69,1
DBcAMP (10⁻³M)	74,49 ± 4,49 (7) #	61,5	109,54 ± 3,95 (7) *#	90,5
THEO (10⁻²M)	35,27 ± 1,95 (6) #	22,3	56,08 ± 2,65 (7) *#	37,0
FSK (10⁻⁵M)	31,08 ± 3,35 (7) #	18,1	34,42 ± 2,57 (7) #	15,3

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de animais utilizados. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

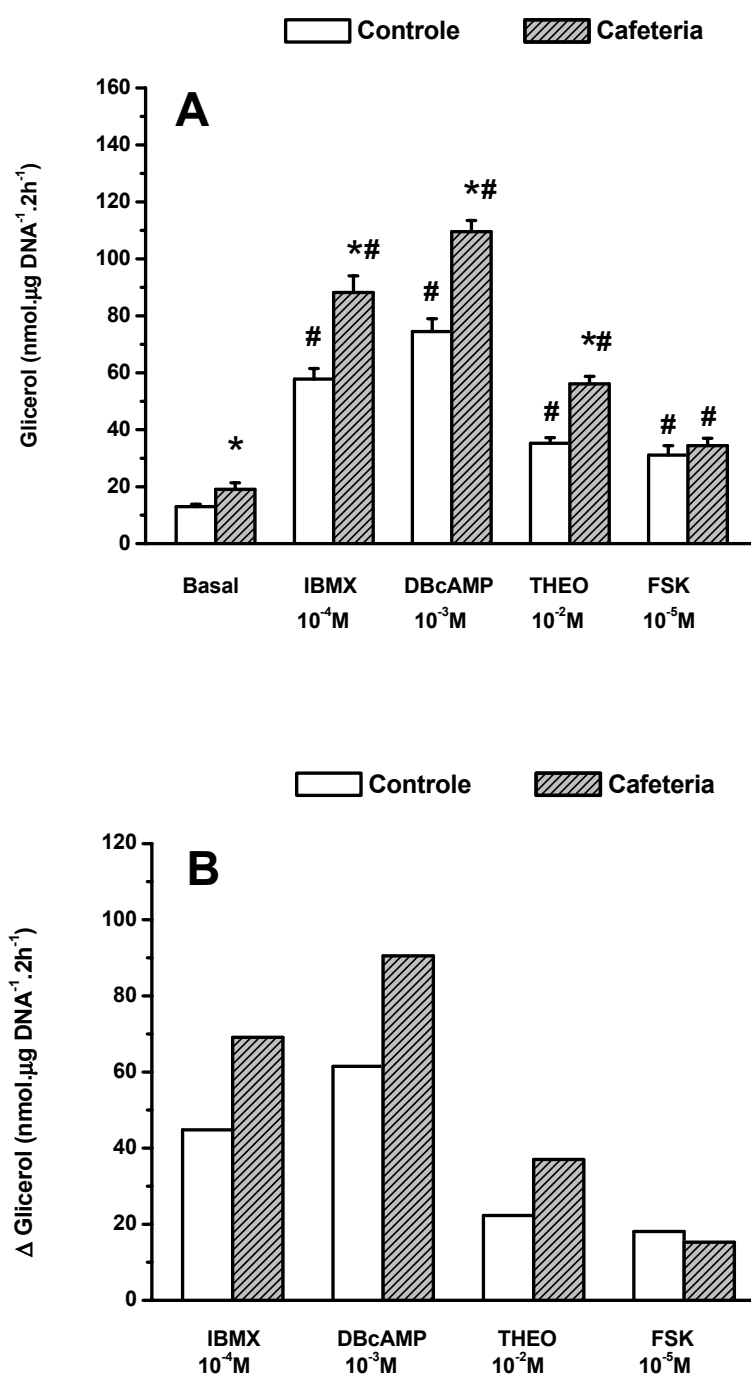


Figura 26 – A - Efeito da dieta cafeteria na lipólise, de fragmentos de RETRO de ratos, incubados na presença de agentes lipolíticos. **B** – Diferenças dos valores de glicerol obtidos na presença dos agentes lipolíticos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 4 a 8 amostras por grupo. * $P \leq 0,05$ vs controle; # $P < 0,05$ vs basal.

Tabela 17 – AGL liberado por fragmentos de RETRO, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de agentes lipolíticos.

Condição de incubação	AGL (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)			
	Controle	Δ	Cafeteria	Δ
Basal	7,44 ± 1,13 (7)		23,00 ± 2,79 (8) *	
IBMX (10⁻⁴M)	55,73 ± 5,21 (8) #	48,3	108,73 ± 10,79 (8) *#	85,7
DBcAMP (10⁻³M)	53,11 ± 3,43 (7) #	45,7	119,57 ± 11,27 (8) *#	96,6
THEO (10⁻²M)	66,86 ± 4,57 (8) #	59,4	122,71 ± 6,74 (6) *#	99,7
FSK (10⁻⁵M)	28,60 ± 3,31 (8) #	21,2	54,72 ± 5,84 (7) *#	31,7

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P≤0,05 vs controle; #P≤0,05 vs basal.

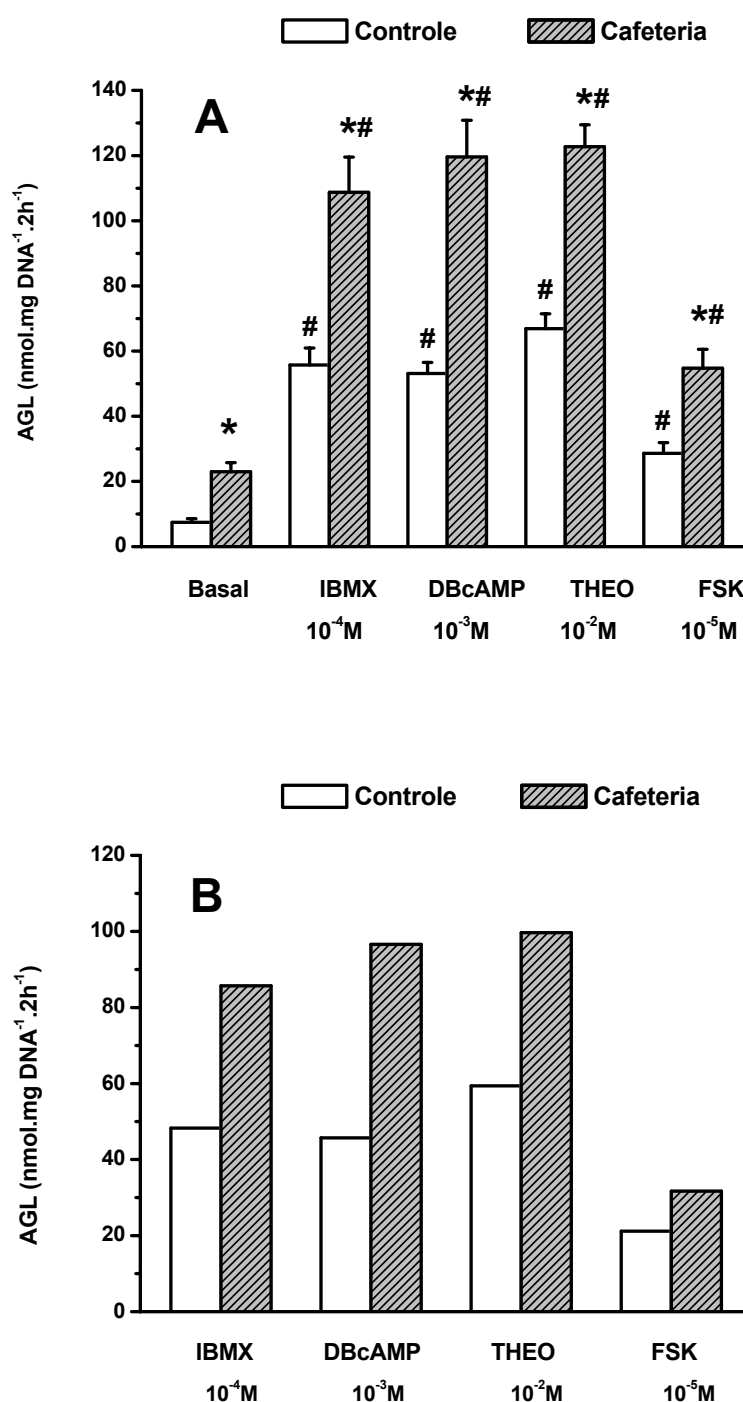


Figura 27 – A - Efeito da dieta cafeteria na lipólise, de fragmentos de RETRO incubados na presença de agentes lipolíticos. **B** – Diferenças dos valores de AGL obtidos na presença dos agentes lipolíticos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 a 8 amostras por grupo. * $P \leq 0,05$ vs controle; # $P \leq 0,05$ vs basal.

Tabela 18 – Glicerol liberado por fragmentos de EPI, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria, incubados na presença de agentes lipolíticos.

Condição de incubação	Glicerol (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)			
	Controle	Δ	Cafeteria	Δ
Basal	12,1 ± 1,01 (8)		14,95 ± 1,24 (7)	
IBMX (10⁻⁴M)	49,00 ± 3,38 (4) #	36,9	78,96 ± 4,71 (8) *#	64,0
DBcAMP (10⁻³M)	54,18 ± 3,06 (6) #	42,1	64,61 ± 2,50 (6) #	49,7
THEO (10⁻²M)	49,49 ± 1,80 (8) #	37,4	74,73 ± 3,02 (7) *#	59,8
FSK (10⁻⁵M)	26,31 ± 3,24 (8) #	14,2	49,12 ± 3,65 (4) *#	34,2

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

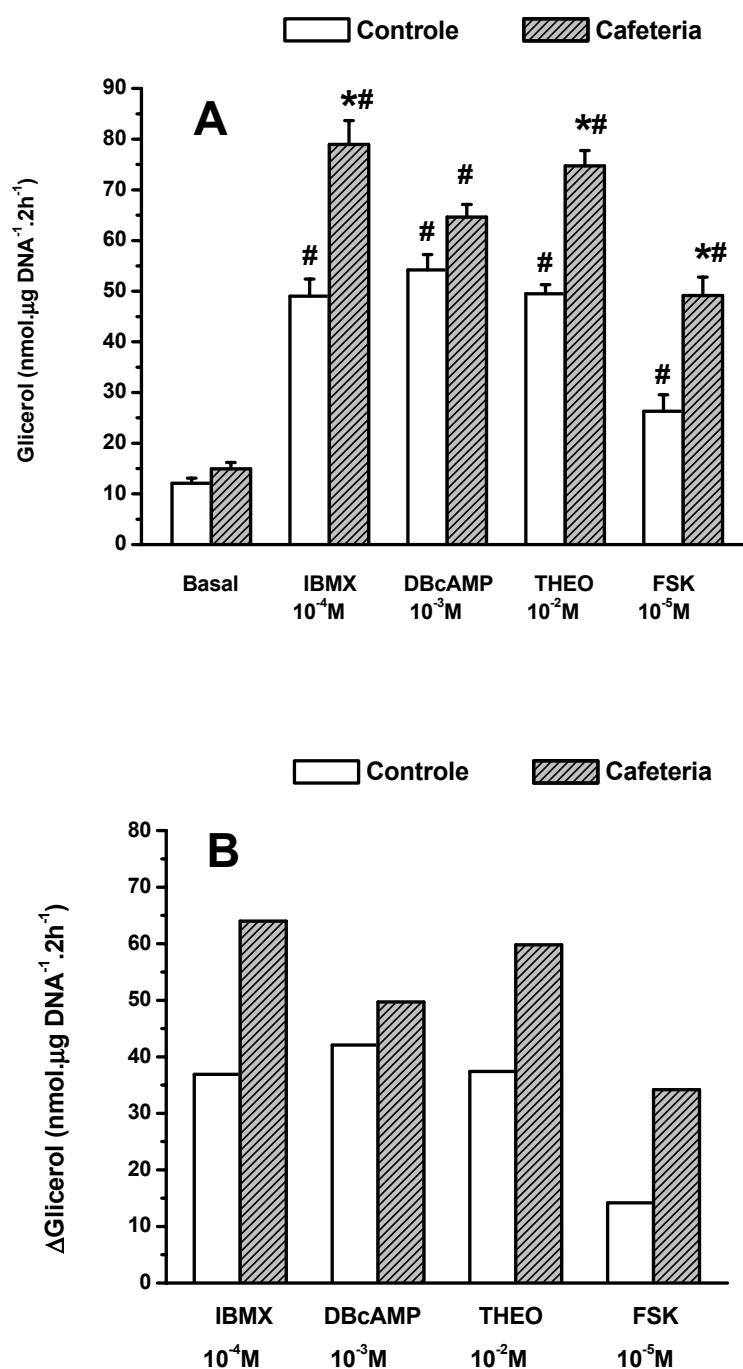


Figura 28 – A - Efeito da dieta cafeteria na lipólise, de fragmentos de EPI de ratos, incubados na presença de agentes lipolíticos. **B** – Diferenças dos valores de glicerol obtidos na presença dos agentes lipolíticos. Os valores representam a média ± EPM de 4 a 8 amostras por grupo. *P<0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

Tabela 19 – AGL liberado por fragmentos de TAB EPI, de ratos controles e alimentados com a dieta cafeteria incubados na presença de agentes lipolíticos intracelulares.

Condição de incubação	AGL (nmol.µg DNA ⁻¹ .2h ⁻¹)			
	Controle	Δ	Cafeteria	Δ
Basal	3,97 ± 0,55 (8)		6,02 ± 0,90 (7)	
IBMX (10⁻⁴M)	32,26 ± 0,67 (6) #	28,3	76,28 ± 2,95 (4) *#	70,3
DBcAMP (10⁻³M)	32,28 ± 1,20 (5) #	28,3	40,88 ± 4,14 (4) *#	34,9
THEO (10⁻²M)	62,33 ± 1,90 (4) #	58,4	104,62 ± 5,09 (4) *#	98,6
FSK (10⁻⁵M)	16,18 ± 1,56 (8) #	12,2	36,78 ± 6,30 (4) *#	30,8

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o total de amostras avaliadas. *P≤0,05 vs controle; #P≤0,05 vs basal.

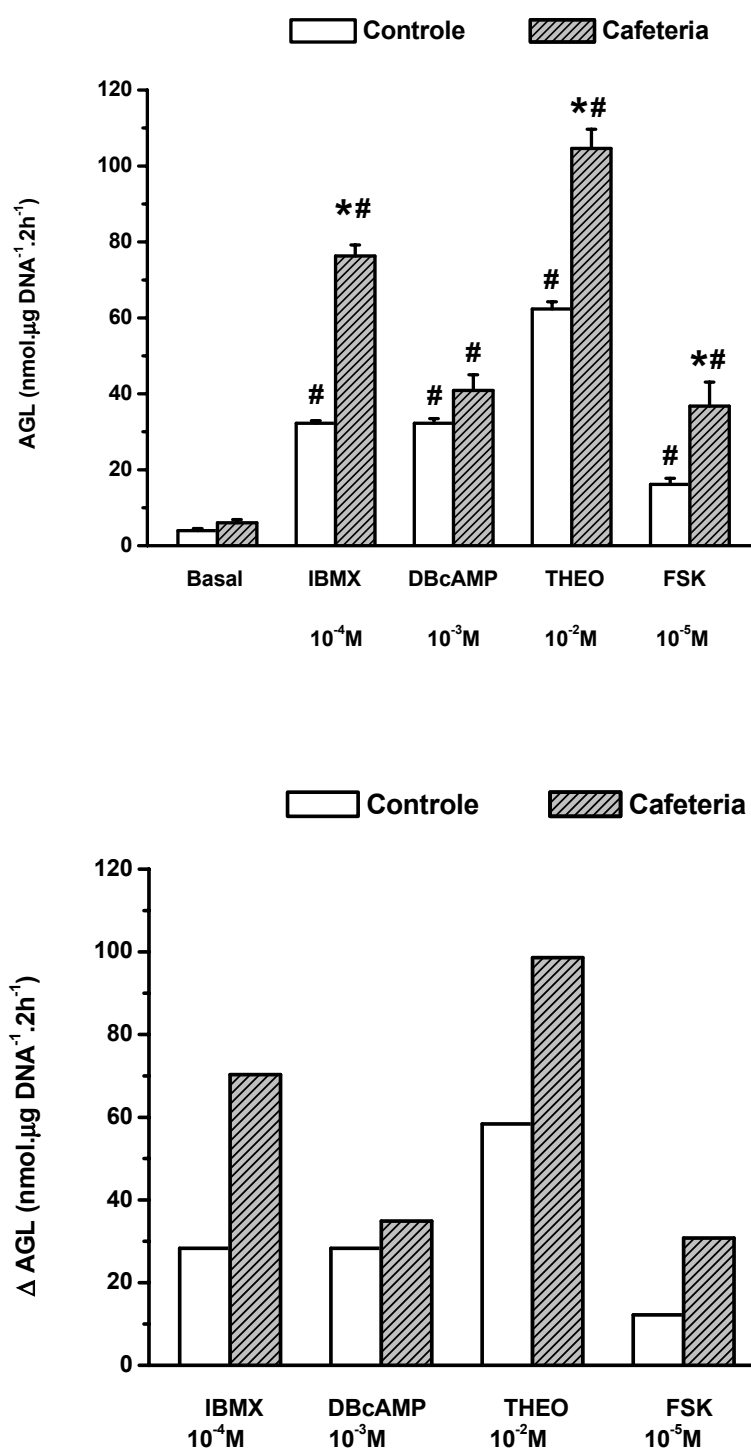


Figura 29 – A - Efeito da dieta cafeteria na lipólise, de fragmentos de EPI de ratos, incubados na presença de agentes lipolíticos. **B** – Diferenças dos valores de AGL obtidos na presença dos agentes lipolíticos. Os valores representam a média ± EPM de 4 a 8 amostras por grupo. *P≤0,05 vs controle; #P<0,05 vs basal.

Discussão

5) Discussão

A composição e o peso corporal dependem da ingestão e do gasto energético. O desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto energético pode resultar em deposição de gordura e obesidade. Schrauwen & Westerterp (2000), relatam que dietas hiperlipídicas desempenham um papel importante na adiposidade e na prevalência da obesidade. Esses autores ainda ressaltam que há uma relação estreita entre o balanço energético e a massa gordurosa, e que as dietas hiperlipídicas levam a um balanço positivo em curto tempo devido à perda de ajuste da oxidação em relação à ingestão de gordura, e a longo prazo, o acúmulo de lipídios pode ocasionar um aumento de peso.

A influência da dieta sobre o metabolismo lipídico no TAB e TAM de ratos é uma linha de investigação que vem sendo desenvolvida há vários anos em nosso laboratório e a dieta cafeteria tem sido utilizada como modelo hiperinsulinêmico no estudo da regulação da via gliceroneogênica desses animais. Nestes estudos foi observado que os ratos que receberam a dieta cafeteria durante 3 semanas tiveram uma ingestão calórica média de $70 \text{ Kcal.100g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enquanto os animais controles consumiram em média $50 \text{ Kcal.100g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Este aumento, de $\sim 40\%$ foi decorrente de um maior consumo de calorias provenientes de lipídios (145%) e de carboidratos (45%). Em consequência a uma maior ingestão calórica, os ratos cafeteria apresentaram aumento de lipogênese e da massa adiposa em comparação aos controles (Chaves *et al.*, 2006; Frasson, 2010).

No presente trabalho, observamos que a dieta cafeteria, apesar de promover adiposidade não induziu uma diferença no ganho de peso corporal de ratos, submetidos à 3 semanas de dieta (Figura 4) semelhante ao observado por Chaves

et al. (2006). Entretanto, resultados referentes ao peso corporal de ratos mantidos sob dieta cafeteria são conflitantes na literatura (Schrauwen & Westerterp, 2000; Prada *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2006; Zambon *et al.*, 2009). Essa discrepância entre os resultados de diferentes trabalhos provavelmente se deve ao tempo de manutenção dos ratos na referida dieta, bem como à idade do animal em que foi iniciado o tratamento ou ainda à composição dessas diferentes dietas, embora todas sejam hiperlipídicas e hipercalóricas (Kusunoki *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2000).

Trabalho prévio deste laboratório (Chaves *et al.*, 2006) demonstrou que os níveis plasmáticos de insulina de ratos submetidos à dieta cafeteria por 3 semanas, no estado alimentado, apresentam um aumento significativo em relação ao observado em ratos controles. Essa hiperinsulinemia é um indicativo da resistência dos tecidos periféricos a esse hormônio e provavelmente foi decorrente da adição de sacarose (20%) na água ingerida por esses animais, fato este também observado em ratos alimentados com dietas hipercalóricas similares (Davidson *et al.*, 1993; Rizkalla *et al.*, 1987).

Como é sabido, a resistência à insulina promove uma redução na utilização de glicose pelos tecidos periféricos, hidrólise elevada de TAG armazenado e aumento na mobilização e dos níveis plasmáticos de AG. Foi verificado no presente estudo que apesar de induzir a hiperinsulinemia, a dieta cafeteria não alterou os níveis plasmáticos de AGL (Figura 6 e Tabela 2) corroborando estudos anteriores de nosso laboratório (Chaves *et al.*, 2006). Embora em períodos iniciais de administração da dieta, tenha sido observado um aumento significativo da glicemia nos animais cafeteria, o aumento concomitante nos níveis plasmáticos de insulina foi suficiente para a manutenção da glicemia em níveis normais até o final do período

avaliado (Figura 5). Além disso, nós observamos no presente trabalho que ratos alimentados com a dieta cafeteria por tempo mais prolongado (40, 50, 60, e 90 dias) não apresentam alteração na curva de tolerância à glicose (Figura 8). Confirmando dados já encontrados em nosso laboratório, no presente trabalho foi observado uma elevação nos níveis plasmáticos de TAG dos ratos cafeteria quando comparados aos controles (Figura 7). Corroborando nossos achados, Prada *et al.*, 2005 observaram, em ratos machos Wistar, alimentados com uma dieta cafeteria por 10 ou 30 dias, um aumento nos níveis plasmáticos de TAG, hiperinsulinemia e nenhuma alteração da concentração plasmática de glicose. Estudos realizados em humanos utilizando uma dieta cafeteria mais palatável têm confirmado a ocorrência de adiposidade e resistência à insulina.

Contudo, Prada *et al.*, 2005 demonstraram que a instalação da resistência à insulina em ratos que receberam uma dieta cafeteria por 10 ou 30 dias, é tecido-específica e a hiperinsulinemia compensatória é evidente apenas quando a sinalização da insulina é prejudicada no fígado, mesmo quando a resistência à insulina já é observada no músculo e no hipotálamo após 10 dias na dieta. Para avaliar os mecanismos pelos quais o aumento da massa adiposa induzida pela dieta está associada com a resistência à insulina, Prada *et al.* (2005) avaliaram a regulação e a sensibilidade a este hormônio através do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, os quais permitiram isolar os componentes da ação da insulina e associar esses dados com a cascata de sinalização desse hormônio em cada tecido. A sinalização da insulina foi então avaliada pela ativação da quinase c-jun N-terminal (JNK) e a fosforilação em Ser³⁰⁷ de IRS-1 no fígado, músculo, tecido adiposo epididimal, e hipotálamo, permitindo integrar de uma forma temporal, dados da ação funcional com a sinalização da insulina.

Uma clara redução (30%) na utilização de glicose estimulada pela insulina pelos tecidos periféricos foi detectada apenas após 42 dias de administração da dieta cafeteria em ratos por Davidson *et al.*, 1993. No EPI de ratos alimentados por 10 ou 30 dias com uma dieta cafeteria foi observado um significativo aumento no transporte de glicose induzido pela insulina (Prada *et al.*, 2005). Contudo, não foi observado aumento na expressão das proteínas envolvidas na sinalização da insulina, nos passos iniciais sugerindo que o mecanismo molecular que contribui para este aumento no transporte de glicose provavelmente é posterior à Akt, devido a não ter sido detectada nenhuma alteração na via IRS/PI3-K/Akt. Além disso, músculos de camundongos nocautes para o gene do receptor da insulina, exibem aumento de massa gordurosa e da atividade de transporte de glicose estimulada pela insulina no EPI (Michael *et al.*, 2000). Corroborando esse achado, Chaves *et al.*, 2006 demonstraram que a utilização de glicose, *in vivo*, e a síntese de AG, aumentam no TAB (EPI e RETRO) de animais alimentados por 3 semanas com a dieta cafeteria. Esses resultados indicam que uma redução no transporte de glicose muscular, devido a uma resistência periférica à insulina, deve ser parcialmente compensada por aumento na atividade de transporte de glicose no TAB, e que os altos níveis plasmáticos da insulina são suficientes para superar qualquer resistência à sua ação nesse tecido (Prada *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2006), preservando assim a normoglicemia dos ratos cafeteria. Além disso, tais achados fornecem evidências de que a resistência à insulina é tecido-específica, instalando-se primeiro no hipotálamo e na musculatura esquelética, atenuando o efeito anorexigênico da insulina e reduzindo o transporte de glicose muscular, respectivamente, e por último no fígado, diminuindo a inibição da liberação de glicose hepática. Dessa forma, alterações na sinalização da PI3-K/ Akt no hipotálamo, músculo e fígado, mas não

no TAB deve levar ao desenvolvimento da adiposidade e resistência à insulina induzida pela dieta cafeteria (Prada *et al.*, 2005).

Em contraste ao aumento observado de massa adiposa, a ausência de alteração no peso corporal de animais cafeteria quando comparado com os animais controles, motivou nossos estudos relacionados ao metabolismo da massa muscular, uma vez que os músculos esqueléticos correspondem a 40~45% do peso corporal total. Foi observado que a dieta cafeteria não alterou o conteúdo lipídico dos músculos *extensor digitorum longus* (EDL) e *tibialis* anterior, que possuem predominantemente fibras glicolíticas, de contração rápida. Entretanto, nos músculos *soleus* e *gastrocnemius*, (com predominância de fibras do tipo I), houve um aumento no conteúdo lipídico quando comparado com os controles (Tabela 3 e Figura 13). Essas medidas não nos permitem concluir se o aumento da gordura em alguns tipos de músculos de ratos na dieta cafeteria ocorre no tecido adiposo que existe entre as fibras ou se esse aumento ocorre no interior da célula muscular ou ainda em ambas as localizações. Foi também verificado no presente trabalho uma redução significativa no peso e no conteúdo de proteínas nos músculos EDL, *tibialis* e *soleus*, e nenhuma alteração desses parâmetros no músculo *gastrocnemius* (Figuras 14 e 15; Tabelas 4 e 5). Tendo em vista a diminuição no conteúdo de proteínas nos músculos *tibialis* (13%) e a redução também observada em outros músculos estudados, decidimos avaliar a proteólise na musculatura esquelética desses animais.

Inicialmente, tentativas foram feitas para estudar a atividade proteolítica total em músculo *soleus* e EDL de ratos jovens alimentados com a dieta cafeteria durante curto período de tempo: 8, 10 e 15 dias (dados não apresentados). Período no qual o tamanho dos músculos ainda era adequado para os estudos de incubação *in vitro*

e avaliação das vias proteolíticas lisossomal, dependente de cálcio e ubiquitina proteassoma. Contudo, não foi observada nesses animais jovens, submetidos à 2 semanas de dieta cafeteria, nenhuma alteração na atividade proteolítica muscular em relação aos animais controles. Considerando a metodologia de incubação de músculos íntegros “*in vitro*”, que só permite a utilização de músculos pequenos, não foi possível avaliar a proteólise *in vitro*, de músculos em ratos maiores, devido à espessura dos mesmos que não estariam apropriadas para as medidas das vias proteolíticas não permitindo que ocorressem trocas efetivas de metabólitos e oxigênio com o meio de incubação. Entretanto, estudos realizados em camundongos, submetidos a uma dieta hiperlipídica durante um tempo mais prolongado (5 meses), demonstraram que os músculos *soleus* e EDL desses animais, quando incubados *in vitro*, apresentaram aumento na proteólise total em relação aos animais que receberam a dieta padrão (Zhou *et al.*, 2007). Além disso, Wang *et al.*, 2006 demonstraram em músculos *soleus*, EDL, e *plantaris* de camundongos obesos db/db (com deficiência no receptor da leptina), uma redução no peso associada a um aumento na proteólise total nos músculos desses animais em relação aos controles. Esses mesmos autores observaram ainda uma redução na área das fibras do músculo *gastrocnemius*, e demonstraram que essa atrofia muscular em camundongos db/db era decorrente da ativação de caspases e da via proteolítica ubiquitina-proteassoma, avaliada por um aumento na atividade peptidásica semelhante à quimiotripsina. Esses dados nos levaram a investigar, pela técnica de microdiálise, o efeito da dieta cafeteria no metabolismo protéico *in situ*, no músculo *tibialis* anterior, de ratos submetidos à dieta hipercalórica por 3 semanas. Verificamos um aumento de 63% na liberação de tirosina em relação aos ratos controles (tabela 6 e figura 16) sem alteração no fluxo sanguíneo, o que poderia

influenciar o resultado obtido (Figura 17). Tais achados corroboram dados na literatura que observaram realmente ocorrer perda de massa magra em animais obesos submetidos a dietas hiperlipídicas. A perda de massa magra associada com a obesidade parece ser decorrente do aumento na circulação de citocinas, como o TNF α e outras, que podem causar resistência à insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996; Kimmel *et al.*, 1998; Rui *et al.*, 2001 e Stentz *et al.*, 2004). Existem evidências de que a diminuição da resposta à insulina na musculatura esquelética leva à degradação protéica, devido à ativação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma, envolvendo a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas neste sistema (Price *et al.*, 1996; Mitch *et al.*, 1999). Esses dados são relevantes já que a estimulação da degradação protéica por aumento da atividade da via ubiquitina-proteassoma em condições catabólicas, tais como idade, acidose, doença renal crônica ou tumores são frequentemente associadas com resistência à insulina (DeFronzo *et al.*, 1979; Hasselgren *et al.*, 1987; Dardevet *et al.*, 1994 e Kobayashi *et al.*, 2005). Outros autores demonstraram que a diminuição na atividade da PI3K e, por conseguinte de Akt fosforilada, aumenta a expressão de enzimas E3 ligases como a atrogina-1 e MuRF1 no músculo esquelético (Lee, *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004).

Wang *et al.*, 2006 verificaram que a perda de massa muscular que ocorre em camundongos obesos e resistentes à insulina deve-se, em parte, a defeitos na sinalização insulínica causados pela inibição do substrato do receptor 1 da insulina (IRS-1). Zhou *et al.*, 2007 observaram que o tratamento de células musculares C2C12 com AGL *in vitro* por 48 h reduzia a sinalização IRS-1/Akt no músculo e acelerava a degradação de proteínas e que este efeito podia ser revertido com a adiponectina, que age como um fator endógeno de sensibilização à insulina (Scherer

et al., 1995 e Gil-Campos *et al.*, 2004), sendo produzido em abundância em indivíduos magros e saudáveis. Além disso, Wang *et al.*, (2006) verificaram que, como esperado, os níveis de adiponectinas, em camundongos obesos db/db estão mais baixos em relação aos controles. Dessa forma, esses estudos fornecem evidências de um possível mecanismo que controla a massa muscular através de um *cross-talking* entre o tecido adiposo e a musculatura esquelética envolvendo a adiponectina. Talvez nos animais cafeteria, os níveis de adiponectina estejam mais baixos em relação aos animais controles podendo causar em algum tecido o aumento da resistência à insulina. A realização de experimentos, incluindo o teste de tolerância à insulina, bem como a verificação dos níveis de adiponectinas é necessária para esclarecer o envolvimento da administração da dieta cafeteria na redução da sensibilidade à insulina nesses animais.

Assim podemos sugerir, em face de nossos achados e em conjunto com os dados da literatura, que a adiposidade induzida pela dieta cafeteria afeta a manutenção da massa magra seja por desordens relacionadas ao mecanismo de ação da insulina seja por fatores relacionados à inflamação e à função do TAB na produção e liberação de adipocinas.

No presente trabalho foi observado que a dieta cafeteria administrada por apenas 8 dias já é capaz de induzir adiposidade em ratos, pois promoveu um aumento significativo no peso do TAB RETRO e EPI quando comparado aos animais controles (Figuras 9 e 10). Tais achados são similares àqueles encontrados por Rozen *et al.*, 1994 e Bernardes *et al.*, 2004. Além disso, em estágios iniciais da administração da dieta também promoveu um aumento no percentual de gordura desses tecidos, quando comparado com o grupo alimentado com a dieta padrão (Figuras 11 e 12). Chaves *et al.* (2006) utilizando o mesmo tipo de dieta do presente

trabalho, também observaram aumento dos estoques de gordura nos tecidos EPI, RETRO, bem como nos tecidos mesentérico e inguinal.

Além disso, Chaves (*et al.*, 2006) demonstraram que a administração da dieta cafeteria por 3 semanas foi capaz de ativar a produção de glicerol-3-P a partir de dihidroxiacetona na via glicolítica, devido ao aumento na utilização de glicose *in vivo*. A fosforilação direta do glicerol também foi ativada pela dieta cafeteria, como indicado pelo aumento na atividade da GyK e na velocidade de incorporação de ^{14}C -glicerol em glicerol de TAG tanto no RETRO quanto no EPI (Chaves *et al.*, 2006; Frasson, 2010). Também foi verificado que apesar do aumento simultâneo dos níveis plasmáticos de insulina e da velocidade de renovação de NOR no TAB, que atuam de forma distinta na regulação da atividade da LPL, a atividade desta enzima se encontra aumentada nos animais que receberam a dieta cafeteria quando comparado com os animais controles. Portanto, estes dados indicam que todas essas adaptações em resposta à dieta favoreceram a adiposidade nesses animais.

Dessa forma, após confirmarmos que a dieta cafeteria é capaz de promover a perda de massa magra, e adiposidade, nosso interesse se voltou para a investigação da atividade lipolítica do TAB, para verificarmos se o aumento da massa adiposa observada em nossos animais ocorria, não só pelo aumento da lipogênese, mas também por alterações na lipólise. Outro objetivo foi verificar a importância fisiológica da ativação do SNS neste tecido, uma vez que estudos deste laboratório têm demonstrado que em situações como o jejum e a exposição ao frio de 4°C, aumentam a atividade simpática nos vários depósitos de TAB (Garófalo *et al.*, 1996; Migliorini *et al.*, 1997) enquanto no RETRO e no EPI, de ratos adaptados à dieta hiperprotéica, livre de carboidratos (Boschini 2006; Frasson 2010), esta atividade está reduzida. Também foi observado em nosso laboratório aumento do

fluxo simpático no RETRO, e no EPI de animais alimentados com a dieta cafeteria, apesar de que neste último tecido o efeito é menos pronunciado (Chaves *et al.*, 2006).

Classicamente, o 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 NOR e consequentemente aumentando a lipólise, mobilizando assim os AGs armazenados como TAG. Além da lipólise, a participação do SNS é importante no controle da utilização de glicose, de glicerol-3-P, atividade da gliceroquinase e da diferenciação e proliferação celular.

Os dados do presente trabalho mostram que a dieta cafeteria promoveu aumento da atividade lipolítica do RETRO ocorrendo aumento na liberação de glicerol e de AGL para o meio de incubação. Entretanto, o mesmo não foi observado no EPI (Tabelas 10-11; Figuras 20-21). Portanto, o aumento da atividade lipolítica do RETRO, observado no presente trabalho, corrobora o achado prévio deste laboratório que demonstra um aumento no fluxo simpático para este tecido.

Como já é sabido, ratos cafeteria apresentam uma maior deposição de lipídios nos adipócitos levando à hipertrofia da célula adiposa em comparação com as células de ratos controles. Assim sendo, tornou-se interessante expressar a atividade lipolítica do tecido adiposo de nossos experimentos utilizando a medida do conteúdo de DNA dos fragmentos de tecido incubados de ambos os grupos como representativa do número de células, uma vez que há diferença no número de células entre os tecidos adiposos dos grupos estudados (Tabela 9). Embora não tenha sido mensurado em nosso trabalho, dados da literatura fornecem evidências

de que as células dos animais alimentados com a dieta cafeteria, por 15 dias, apresentam um diâmetro maior que as células controles, tanto no EPI ($\sim 71,0 \pm 1,0$ μm nos animais cafeteria e $\sim 48,9 \pm 0,9$ μm nos animais controles) quanto no RETRO ($\sim 75,7 \pm 1,34$ μm nos animais cafeteria e $\sim 51,4 \pm 0,99$ μm nos animais controle) (Lladó *et al.*, 2000; 2002). Além disso, durante nossos experimentos, foi observado que células adiposas isoladas de animais que receberam a dieta cafeteria são mais sensíveis ocorrendo um aumento na lise dessas células. Contudo, Lladó *et al.*, 2000 & 2002 não observaram diferença na lipólise basal das células adiposas do EPI e RETRO de ratos alimentados durante 15 dias com a dieta cafeteria, quando comparados com os controles. Estudo recente de Gaidhu *et al.*, 2010, mostrou que em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica por oito semanas, há um aumento na lipólise basal do tecido adiposo EPI e inguinal em relação aos controles. Contudo, embora haja resultados contraditórios, alguns trabalhos mostram existir uma correlação direta entre a lipólise e o tamanho do adipócito (Smith 1970; Goldrick *et al.*; 1970; Hartman *et al.*, 1971; Knittle *et al.*, 1972; Ogundipe *et al.*, 1974; Arner *et al.*, 1979; Berger *et al.*, 1999). Dessa forma, o aumento da atividade lipolítica basal, no tecido RETRO, nos nossos animais alimentados com a dieta cafeteria não seria inesperado, contudo a mesma relação não é verdadeira para o EPI sugerindo que apenas o tamanho das células não é um fator suficiente para explicar o aumento da atividade lipolítica observado nos animais cafeteria.

O TAB quando incubado *in vitro*, apresenta uma tendência a manter o mesmo padrão metabólico que possuía *in vivo*, refletindo no meio de incubação, as condições do ambiente em que ele se encontrava no momento de sua remoção. Ainda assim nem sempre é possível extrapolar os resultados de estudos *in vitro* para situações *in vivo*, já que o tecido e as células são removidas de seu local natural, e

das interações dinâmicas e complexas de fatores parácrinos, hormonais e neurais que controlam os processos celulares.

Dessa forma, avaliamos então a lipólise basal *in situ* pela técnica de microdiálise. Uma das vantagens do uso da técnica de microdiálise em estudos do metabolismo tissular é que ela permite avaliar o estado funcional do tecido em diversas situações, através do exame *in situ* do líquido intersticial no animal intacto, *in vivo*, portanto em condições muito próximas da fisiológica. Utilizando esta técnica, confirmamos os achados *in vitro*, que o RETRO, de ratos alimentados com a dieta cafeteria apresenta um aumento de 62% na atividade lipolítica basal quando comparado com o controle (Tabela 7 e Figura 18). Nossos resultados também demonstram que ratos alimentados com a dieta cafeteria não apresentam alteração no fluxo sanguíneo local ao longo do tempo, quando comparado com os animais controles, indicando que as alterações observadas na microdiálise não foram influenciadas pelo fluxo sanguíneo e devem, portanto representar alterações locais no metabolismo lipídico neste tecido (Tabela 8 e Figura 19). Em experimentos de microdiálise no tecido adiposo subcutâneo de humanos saudáveis, Navegantes *et al.*, 2003 demonstraram, em um modelo de estimulação simpática fisiológica induzida por pressão negativa dos membros inferiores, que ocorre um aumento significativo na lipólise do tecido adiposo subcutâneo de humanos, equivalente à lipólise induzida por exercícios (Borsheim *et al.*, 2000) ou estímulos elétricos regionais pela inervação simpática (Dodt *et al.* 1999). Contudo, em uma situação de hiperinsulinemia, esses mesmos autores observaram ocorrer uma redução ao efeito antilipolítico da insulina no tecido adiposo subcutâneo, sugerindo que o aumento da lipólise é mediado por ativação neural simpática direta no tecido, sem, contudo poder descartar uma ativação adrenal concomitante. Demonstraram assim que o efeito

lipolítico simpático é preponderante, apesar da hiperinsulinemia e da concomitante ativação da fosfodiesterase do AMPc mediada pela insulina (Navegantes *et al.*, 2003).

No presente trabalho, o aumento na atividade lipolítica basal do RETRO observado nos ratos cafeteria hiperinsulinêmicos provavelmente foi devido ao aumento da estimulação simpática (alto *turnover* de NOR) neste tecido, apesar do aumento na utilização de glicose, na lipogênese e na atividade da LPL e da GyK em relação aos animais controle, observado em estudo anterior de nosso laboratório (Chaves *et al.*, 2006). Corroborando nosso achado, em uma situação oposta em que ratos que receberam por 15 dias uma dieta hiperprotéica (HP) apresentando baixos níveis plasmáticos de insulina e menor *turnover* de NOR (Boschini 2006; Frasson 2010), Martins-Afférri *et al.*, 2004 demonstraram em experimentos de microdiálise que a lipólise basal (diferença I – A) do tecido adiposo subcutâneo abdominal é menor quando comparada com os ratos controles.

Como é sabido, as catecolaminas são capazes de estimular a lipólise pela ativação dos adipócitos pelos receptores β adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3), primeiramente através da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a ativação da LHS. No entanto, podem também através dos receptores α_2 , diminuir a mobilização de lipídios através da inibição da produção de AMPc e indiretamente manter os estoques de lipídios (Carey *et al.*, 1998; Lafontan *et al.*, 1993). Além disso, o número e os tipos de receptores α e β variam entre os tecidos e as espécies, sendo que em roedores o efeito lipolítico das catecolaminas ocorre principalmente pela ativação dos receptores β_3 .

Após a verificação que o tecido adiposo de ratos cafeteria apresentam uma atividade lipolítica basal maior que a dos controles e sabendo-se do efeito clássico

exercido pelas catecolaminas na lipólise, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta deste tecido frente a diferentes concentrações de NOR. Foi verificado que a NOR promove um maior aumento da lipólise nos adipócitos de animais que receberam a dieta cafeteria quando comparado com os controles.

O efeito da NOR na estimulação da liberação de AGL e glicerol do tecido adiposo RETRO e EPI de ratos submetidos à dieta cafeteria foi maior do que o observado em ratos controles (Tabelas 12 - 15; Figuras 22 - 25). Os animais utilizados nestes experimentos *in vitro* apresentaram peso corporal (~ 270 g) cerca de 23% superior ao peso dos animais utilizados nos experimentos anteriores *in vitro*. Observamos que em termos quantitativos, a liberação de glicerol para o meio de incubação foi menor do que àquela observada em outros experimentos de lipólise basal. Este fato não foi, entretanto observado para os AGL liberados para o meio de incubação. A concentração de AGL foi semelhante àquela já observada em experimentos anteriores e provavelmente se deve à diminuição no processo de reesterificação ou oxidação dos mesmos no TAB de ratos mais velhos (Caparotta *et al.*, 1983). Contudo, o efeito qualitativo na resposta lipolítica não foi prejudicado

e provavelmente os efeitos observados quantitativamente foram devido ao maior tamanho dos adipócitos presentes nos fragmentos dos tecidos incubados.

Interessante que ratos submetidos à dieta HP por 15 dias apresentam níveis plasmáticos de insulina reduzidos, além de redução no *turnover* de NOR, no tamanho dos adipócitos e na lipólise basal e estimulada, e representam uma situação totalmente oposta a dos ratos cafeteria utilizados no presente estudo.

Receptores adrenérgicos α_2 (antilipolíticos) e β (lipolíticos) coexistem na mesma célula adiposa, e a relação funcional entre esses receptores presentes no adipócito deve determinar se a atividade que predomina no TAB são a síntese e o

depósito de gordura ou a liberação de AGs ativados pelas catecolaminas, desempenhando, portanto, um importante papel na regulação do balanço energético (Soloveva *et al.* 1997).

Vários estudos em roedores têm demonstrado que receptores adrenérgicos α_2 estão aumentados com a hipertrofia das células adiposas no estado de obesidade (Lafontan *et al.*, 1995; Carpene *et al.* 1990 & 1998). Em adipócitos de humanos obesos o número de receptores α_2 , a relação α/β_3 , e a resposta mediada por α_2 , se encontram aumentadas, embora seja demonstrado que estes resultados são dependentes da região analisada (Lafontan *et al.* 1995; Galitzky *et al.*, 1990; Mauriege *et al.*, 1991 & 1995; Berman *et al.*, 1998).

Nossos achados frente à resposta lipolítica na presença de NOR sugerem que a responsividade dos receptores não foi afetada pela dieta. Embora não tenhamos avaliado a expressão do conteúdo dos receptores adrenérgicos no presente trabalho, devido à magnitude da resposta dos fragmentos de TAB quando expostos ao hormônio lipolítico, e ao aumento do fluxo simpático verificado anteriormente nesses tecidos, podemos sugerir que a resposta mediada pelos receptores β , nos animais cafeteria, é preponderante à resposta mediada pelos receptores α , resultando em aumento da lipólise estimulada pelas catecolaminas para ambos os tecidos avaliados. Entretanto, experimentos de *binding* de receptores são necessários para validar esta hipótese.

Além de mudanças nos receptores, alterações na cascata de sinalização das catecolaminas podem interferir na atividade lipolítica do TAB. Dessa forma, nosso interesse foi avaliar a resposta lipolítica do TAB de ratos cafeteria frente a diferentes agentes lipolíticos.

Quando analisamos os resultados em termos de acréscimo em relação ao nível basal, tanto a liberação de glicerol quanto de AGL para o meio de incubação, na presença de agentes lipolíticos, se encontram aumentados nos animais cafeteria quando comparados com os controles, em ambos os tecidos.

No presente estudo não foi observada alteração na liberação de glicerol, pelo tecido RETRO, frente à ação da FSK (Tabela 16 e Figura 26). Ao que se refere à liberação de AGL por esse tecido, frente à ação da FSK, a dieta cafeteria promoveu um aumento em relação aos controles (Tabela 17 e Figura 27). Diferentemente, para o tecido EPI, a concentração de FSK utilizada foi suficiente para promover um aumento na liberação de glicerol e de ácidos graxos livres para o meio de incubação (Tabelas 18 - 19; Figuras 28 - 29). Corroborando nossos achados, no estudo de Gaidhu *et al.*, 2010 foi observado um aumento na lipólise estimulada por FSK no EPI e inguinal de camundongos que receberam uma dieta hiperlipídica durante 8 semanas. Diferentemente dos nossos achados, outros autores têm demonstrado que a administração da dieta cafeteria, por 15 dias, em ratos machos Wistar, induz uma redução significativa (40-60%) na lipólise estimulada *in vitro* pela NOR, CGP12177A (agonista β_3 adrenérgico e antagonista β_1 e β_2 adrenérgico), BRL37344 (agonista β_3 adrenérgico) e FSK associado a um aumento no conteúdo de adrenoceptores do tipo α_2 -A e uma diminuição no conteúdo de β_3 (Lladó *et al.*, 2002).

Em relação à ação do análogo do AMPc nossos dados demonstram uma resposta aumentada em relação à liberação de AG e glicerol para o meio de incubação em ambos os tecidos. Além disso, a mesma resposta de estímulo foi observada quando incubados na presença de THEO e IBMX. Dados da literatura têm demonstrado que a administração de uma dieta semipurificada rica em lipídios promove uma diminuição na hidrólise dos TAG em adipócitos isolados do RETRO

em resposta a agentes β adrenérgicos e que nenhuma alteração ocorre quando os adipócitos são incubados com dB-AMPC e FSK (Portillo *et al.*, 1999). Diferente dos achados obtidos no RETRO, a dieta cafeteria (15 dias) não promoveu alteração na atividade lipolítica máxima do EPI induzida pela NOR, pelo BRL 37344, pela FSK e pelo dB-AMPC, mas aumentou os níveis de mRNA do receptor β_3 adrenérgico em adipócitos isolados desse tecido (Lladó *et al.*, 2000). Esses dados demonstram que o TAB de diferentes regiões do organismo apresentam diferenças funcionais corroborando nossos achados que demonstram que o RETRO é mais responsivo a agentes lipolíticos como a NOR, IBMX e dB-AMPC em relação ao EPI, enquanto este último é mais responsivo à THEO e à FSK.

Estudos mostram que a fosforilação da LHS *in vitro* promove um aumento de 2 vezes da atividade da enzima sobre substratos emulsificados, um pequeno aumento quando comparado ao aumento de 50 vezes na hidrólise de TAG, induzida por estimulação de adipócitos (Londos *et al.*, 1999). Com base em diversos estudos, foi sugerido que esta discrepância é devida em parte a translocação da LHS do citosol para o glóbulo lipídico, e ainda a alterações na superfície do glóbulo, atribuídas à movimentação por fosforilação das perilipinas, permitindo o acesso da LHS ao seu substrato. Ainda reforçando essa idéia, em experimentos com catecolaminas, AMPC e FSK, semelhantes aos deste trabalho, foi demonstrado que a ativação da lipólise ocorre sem alteração do conteúdo ou da atividade da LHS. Gaidhu *et al.*, 2010 verificaram que a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica em camundongos alterou componentes da cascata lipolítica no TAB. Estes mesmos autores verificaram *down-regulation* da LHS e das perilipinas, e *up-regulation* para a ATGL e CGI-58. Foi verificado que a dieta hiperlipídica promoveu uma inibição na fosforilação da LHS, a qual é necessária para a lipólise mediada pela PKA. A *up-*

regulation da ATGL, promovida pela alimentação com uma dieta hiperlipídica, combinada com aumento da expressão de seu co-ativador CGI-58 provavelmente aumentou a hidrólise de TAG e formação de DAG culminando no aumento da lipólise basal observada nesses animais.

Ao analisarmos o efeito da dieta cafeteria pela comparação dos efeitos obtidos pela NOR e agentes lipolíticos observamos que os adipócitos dos animais cafeteria apresentam maior responsividade frente a agentes lipolíticos, *in vitro*. E mesmo em face de uma situação hiperinsulinêmica, o aumento do *turnover* de NOR que representa aumento na atividade simpática no TAB provavelmente promove um aumento da lipólise basal, *in vivo*. Embora essas alterações tenham sido observadas, apenas a ação do SNS e da insulina são insuficientes para explicar essas respostas tornando-se interessante avaliar a atividade das lipases desses dois tecidos e os níveis de outros hormônios como glicocorticóides e hormônios tireoidianos (visto que estes últimos modulam a lipólise por redução da atividade da fosfodiesterase do AMPc) (Engfeldt *et al.*, 1982; Wahrenberg *et al.*, 1986).

Considerando o exposto, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a administração da dieta do tipo cafeteria em ratos por 3 semanas promoveu aumento:

- do peso dos tecidos adiposos branco RETRO e EPI e diminuição do conteúdo de proteínas dos músculos EDL, *soleus* e *tibialis anterior*.
- da lipólise basal no tecido adiposo RETRO tanto *in situ* como *in vitro* e estimulada por hormônios (*in vitro*) em ambos os tecidos.
- do catabolismo protéico avaliada pela técnica de microdiálise.

Apesar da hiperinsulinemia ter sido capaz de manter a normoglicemia, parece ter ocorrido resistência à insulina na musculatura esquelética (devido ao aumento do catabolismo protéico) mas não no tecido adiposo (mesmo com o aumento da lipólise, pois esse efeito parece ser devido a atividade preponderante do SNS) nesses animais alimentados com a dieta cafeteria.

Os resultados deste estudo confirmam a noção de que diferenças regionais marcantes existem na composição do TAB que, por sua vez, determina a amplitude e a modalidade de sua expansão com a alimentação *ad libitum*. Estes dados sugerem que, em adição a fatores sistêmicos (por exemplo, hormonais, tais como insulina e outros fatores de crescimento), existe controle regulatório específico local que deve modular o crescimento regional do TAB. Nossos dados ainda sugerem que o aumento da lipólise estimulada é devido a uma maior responsividade dos adipócitos dos animais cafeteria. Contudo, experimentos adicionais são necessários para verificar se estes achados indicam uma maior sensibilidade dos receptores β_3 , nos ratos cafeteria. O aumento da resposta aos agentes lipolíticos poderia ser explicada por um aumento na atividade da LHS, ATGL, ou no conteúdo de CGI-58 induzidos pela adaptação à dieta cafeteria e/ou ainda alterações nos processos intracelulares de ativação da lipólise.

Estes resultados demonstram que apesar do aumento na utilização de glicose, na lipogênese e na atividade da LPL, induzidas pela hiperinsulinemia, ainda assim há comprovadamente uma maior atividade lipolítica no TAB sugerindo que a estimulação simpática (alto *turnover* de NOR) no tecido dos animais cafeteria é preponderante à ação antilipolítica da insulina. Provavelmente a manutenção da adiposidade verificada nesses animais é devido ao aumento da síntese *de novo* de AG associado ao aumento da atividade da GyK no TAB dos animais cafeteria.

Referências Bibliográficas

6) Referências Bibliográficas

Arner,P.; Engfeldt,P.; Östman,J. Relation between lipolysis, cAMP e fat-cell size in human adipose tissue during fasting and in diabetes mellitus. *Metabolism*. 1979, 28(3):198.

Bhanot S, McNeill JH. Insulin and Hypertension, a casual relationship? *Cardiovascular Res*.1996;31:212-21.

Bailey, J.L.; Zheng, B.; Hu, Z.; Price, S.R.; Mitch, W.E. Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2006, 17:1388-1394.

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*. 1974, 10: 187-197.

Beardsall, K.; Yuen, K.; Willians, R.; Dunger, D. Applied physiology of glucose control. *Curr. Paediatr*. 2006, 16: 434-438.

Berger, J.J.; Barnard, R.J. Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J.Appl.Physiol*. 1999, 87(1):227-232.

Berman, D.M.; Nicklas, B.J.; Rogus, E.M.; Dennis, K.E.; Goldberg, A.P. Regional differences in adrenoceptor binding and fat cell lipolysis in obese, postmenopausal women. *Metabolism*. 1998, 47:467-73.

Bernardes, D.; Manzoni, M.S.J.; Souza, C.P.; Tenório, N.; Dâmaso, A.R. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras Educ Fis Esp*. 2004; 18(2):191-200.

Bernt, E.; Gutman, I. in *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U. ed.). 1974, 3:1499-1502, Academic Press.

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.

Borsheim, E.; Lönnroth, P.; Knardahl, S.; Jansson, P.-A. No difference in the lipolytic response to β -adrenoceptor stimulation in situ but a delayed increase in adipose tissue blood flow in moderately obese compared with lean men in the postexercise period. *Metabolism*. 2000, 49:579-587.

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, 66 p. 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*. 1998, 47 (10): 1217-1221.

Caparrotta, L.; Fassina, G.; Gaion, R.M.; Tessari, F. Age related changes in the antilipolytic effects of nicotinic acid in rat adipose tissue. *Br. J. Pharmac.* 1983, 80:663-670.

Carey G.B. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol*. 1998, 441:157-170.

Carpene, C.; Bousquet-Melou, A.; Galitzky, J.; Berlan, M.; Lafontan, M. Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, e beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann NY Acad Sci*. 1998, 839:186-9.

Carpene, C.; Rebourcet, M.C.; Guichard, C.; Lafontan, M.; Lavau, M. Increased alpha 2-adrenergic binding sites and antilipolytic effect in adipocytes from genetically obese rats. *J Lipid Res*. 1990, 31:811-9.

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.

Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: Evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002;51:439-42.

Chaves, V.E.; Frasson, D.; Martins-Santos, M.E.S.; 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*. 2006, 136: 2475-2480.

Chevalier, S.; Burgess, S.C.; Malloy, C.R.; Gougeon, R.; Marliss, E.B.; Morais, J.A. The greater contribution of gluconeogenesis to glucose production in obesity is related to increased whole-body protein catabolism. *Diabetes*. 2006, 55:675-681.

Chopra, M.; Galbraith, S.; Darnton-Hill, I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ*. 2002, 80:952-958.

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.

Corssmit, E.P.; Romijn, J.A.; Sauerwein, H.P. Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism*. 2001, 50 (7):742-755.

Dardevet, D.; Sornet, C. Attaix, D.; Baracos, V.E.; Grizard, J. Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. *Endocrinology*. 1994, 134:1475-1484.

Davidson, M.B.; Garvey, D. Studies on mechanisms of hepatic insulin resistance in cafeteria-fed rats. *Am J Physiol*. 1993, 264:E18-23.

Dax, E.M.; Partilla, J.S.; Gregerman, R.I. Mechanism of the age-related decrease of epinephrine-stimulated lipolysis in isolated rat adipocytes: β -adrenergic receptor binding, adenylate cyclase activity, and cyclic AMP accumulation. *J Lipid Res*. 1981, 22:934-943.

DeFronzo, R.A.; Beckles, A.D. Glucose intolerance following chronic metabolic acidosis in man. *Am J Physiol*. 1979, 236:E328-E334.

DiGirolamo, M.; Fine, J.B.; Tagra, K.; Rossmanith, R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1998; 274:1460-1467.

Dodt, C.; Lönnroth, P.; Fehm, H.L.; Elam, M. Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans. *J Physiol*. 1999, 521 (Pt2):545-552.

Doretto, A.L. Controle da degradação e da síntese de proteínas em músculos de ratos submetidos à dieta rica em proteínas. Ribeirão Preto, 1995, 91 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Duarte F.O. Adaptações metabólicas a dois tipos de treinamento moderado de natação, contínuo e intermitente, em ratos machos adultos alimentados com dieta normocalórica e hipercalórica. São Carlos, 2001. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.

Duarte, A.C.G.O.; Fonseca, D.F.; Manzoni, M.S.J.; Soave, C.F.; Sene-Fiorese, M.; Dâmaso, A.R.; Cheik, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev. Nutr.* [online]. 2006, 19(3):341-48.

Engfeldt, P.; Arner, P.; Bolinder, J.; Wennlund, A.; Östman, J. Phosphodiesterase activity in human adipose tissue in hyper- and hypothyroidism. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1982, 54:625-629.

Erwin, B.G.; Stoscheck, C.M.; Florini, J.R. A rapid fluorimetric method for the estimation of DNA in cultured cells. *Anal. Biochem.* 1981, 110:291-294.

Estadella, D.; Oyama, L.M.; Dâmaso, A.R.; Ribeiro, E.B.; Oller do Nascimento, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004, 20(2): 218-24.

Felig, P. Starvation. *Endocrinol.* (ed. L.J. DeGroot), 1979: 1927-1940.

Flatt, J.P. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr.* 1987, 45:296-306.

Flatt, J.P. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61:952-9.

Frasson, D. Papel do sistema nervoso simpático no controle das vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo epididimal de ratos. Ribeirão Preto, 2010, 135 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Foretz, M.; Guichard, C.; Ferre, P.; Foufelle, 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.

Frühbeck, G., Gomez-Ambrozi, J.; Muruzábel, F. J & Burrell, M. A. The adipocyte: model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy and metabolic regulation. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280: E827 – E847.

Gaidhu, M.P.; Anthony, N.M.; Patel, P.; Hawke, T.J.; Ceddia, R.B. Disregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: The role of ATGL, HSL, and AMPK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010. 1-26.

Galitzky, J.; Larrouy, D.; Berlan, M.; Lafontan, M. New tools for human fat cell alpha-2A adrenoceptor characterization. Identification on membranes and on intact cells using the new antagonist [3H]RX821002. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990; 252:312-9.

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.

Gil-Campos, M.; Canete, R.R.; Gil, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr*. 2004, 23:963-974.

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.

Goldberg, A.L.; Tischler, M.E.; DeMartino, G.; Griffin, G. Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Fed. Proc.* 1980, 39:31-36.

Goldrick, R.B.; McLoughlin, G.M. Lipolysis and lipogenesis from glucose in human fat cells of different sizes. *J. Clin Invest*. 49:1213, 1970.

Goodman, M.N. Myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle is diminished in rats with chronic streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*. 1987, 36: 100-5.

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.

Hansen, P.A.; Gulve, E.A.; Holloszy, J.O. Suitability of 2-deoxyglucose for in vitro measurement of glucose transport activity in skeletal muscle. *J appl Physiol*. 1994; 76:979-985.

Hartman, A.D.; Cohen, A.I.; Richane, C.J.; HSU, T. Lipolytic response and adenyl cyclase activity of rat adipocytes as related to cell size. *J. Lipid Res*. 12:498, 1971.

Hasselgren, P.O.; Warner, B.W.; James, J.H.; Takehara, H.; Fischer, J.E. Effect of insulin on amino acid uptake and protein turnover in skeletal muscle from septic rats. Evidence for insulin resistance of protein breakdown. *Arch Surg.* 1987, 122:228-233.

Hickner, R.C.; Rosdahl, H.; Borg, L.; Ungerstedt, U.; Jorfeldt, L.; Henriksson, J. The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in rat skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol Scand.* 1992; 176:87-97.

Hibuse, T.; Maeda, N.; Nagasawa, A.; Funahashi, T. Aquaporins and glycerol metabolism. Review. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006, 1004-1011.

Hillgartner, F.B.; Salati, L.M.; Goodridge, A.L. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acids synthesis. *Physiol. Reviews.* 1995, 75(1):47-76.

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

Hotamisligil, G.S.; Peraldi, P.; Budavari, A.; Ellis, R.; White, M.F.; Spiegelman, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996, 271:665-668.

James, W.P.T. Energy requirements and obesity. *Lancet.* 1983, 2:386-389.

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.

Jefferson, L.S.; Rannels, D.E.; Munger, B.L.; Morgan, H.E. Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle. *Fed. Proc.* 1974, 33:1098-1104.

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. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high protein diet. *Am. J. Physiol.* 1980, 239:R437-R444.

Kettelhut, I.C.; Leopold, B.; Tawa Jr., N.E.; Goldberg, A.L. Protein deficiency and lack of pituitary hormones reduce both lysosomal and ATP-dependent (nonlysosomal) proteolytic processes in skeletal muscle. *Fed Proc.* 1984b, 2 (4): A564.

Kettelhut, I.C.; Wing, S.S.; Goldberg, A.L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes*. 1988b, 4(8):751-772.

Kim, C.H.; Youn, J.H.; Park, J.Y.; Hong, S.K.; Park, K.S.; Park, S.W.; Suh, K.I.; Lee, K.U. Effects of high fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol*. 2000; 278(6):E977-84.

Kimmel, P.L.; Phillips, T.M.; Simmens, S.J.; Peterson, R.A.; Weihs, K.L.; Alleyne, S.; Cruz, I.; Yanovski, J.A.; Veis, J.H. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1998, 54:236-244.

Knittle, J.L.; Ginsberg-Fellner, F. Effect of weight reduction on in vitro adipose tissue lipolysis and cellularity in obese adolescents and adults. *Diabetes*. 1972, 21:754.

Kobayashi, S.; Maesato, K.; Moriya, H.; Ohtake, T.; Ikeda, T. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2005, 45:275-280.

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.

Kusunoki, M.; Storlien, L.H.; MacDessi, J.; Oakes, N.D.; Kennedy, C.; Crisholm, D.J.; Kraegen, E.W. Muscle glucose uptake during and after exercise is normal in insulin-resistant rats. *Am J Physiol*. 1993; 264(27):E167-72.

Lafontan, M.; Berlan, M.L. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of Lipid Research*. 1993, 34:1057-1091.

Lafontan, M.; Berlan, M.L. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev*. 1995; 16:716-38.

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

Lass, A.; Zimmermann, R.; Haemmerle, G.; Riederer, M.; Schoiswohl, G.; Schweiger, M.; Kienesberger, P.; Strauss, J.G.; Gorkiewicz, G.; Zechner, R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome, *Cell. Metab.* 3. 2006; 309-319.

Lee, S.W.; Dai, G.; Hu, Z.; Wang, X.; Du, J.; Mitch, W.E. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol.* 2004, 15:1537-1545.

Lemos, C.M. Efeito do pd 153035, um inibidor tirosina quinase na sinalização da insulina e metabolismo da glicose. Campinas, 2006. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Lladó, I.; Estrany, M.E.; Rodriguez, E.; Amengual, B.; Roca, P.; Palou, A. Effects of cafeteria diet feeding on β 3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *International Journal of obesity.* 2000, 24:1396-1404.

Lladó, I.; Rodríguez-Cuenca, S.; Pujol, E.; Monjo, M.; Estrany, M.E.; Roca, P.; Palou, A. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. *Obesity Research.* 2002, 10:296-305.

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.

Londos, C.; Brasaemle, D.L.; Schultz, C.J.; Adler-Wailes, D.C.; Levin, D.M.; Kimmel, A.R.; Pondinone, C.M. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann. N.Y. Academ.Sci.* 1999, 892:155-168.

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.* 2004, 134:2919-2923.

Mauriege, P.; Després, J.P.; Prud'homme, D. Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J Lipid Res.* 1991, 32:1625-33

Mauriege, P.; Prud'homme, D.; Lemieux, S.; Tremblay, A.; Després, J.P. Regional differences in adipose tissue lipolysis from lean and obese women: existence of postreceptor alterations. *Am j Physiol.* 1995; 269:E341-E50.

Michael, M.D.; Kulkarni, R.N.; Postic, C.; Previs, S.F.; Schulman, G.I.; Magnuson, M.A.; Kahn, C.R. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* 2000; 6:87-97.

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

Mitch, W.E.; Bailey, J.L.; Wang, X.; Jurkovitz, C.; Newby, D.; Price, S.R. Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting. *Am J Physiol.* 1999, 276:C1132-C1138.

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.

Mustonen, A.; Puukka, M.; Pyykönen, T.; Nieminen, P. Adaptations to fasting in the American Mink (*Mustela vison*): Nitrogen metabolism. *J.Comp.Physiol.* 2005, 175:357-363.

Navegantes, L.C.C.; Sjöstrand, M.; Gudbjörnsdottir, Strindberg, L.; Elam, M.; Lönnroth, P. Regulation and counterregulation of lipolysis in vivo: different roles of sympathetic activation and insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88 (11): 5515-5520.

Oakes, N.D.; Cooney, G.J.; Camilleri, S.; Chisholm, D.J.; Kraegen, E.W. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes.* 1997, 46:1768-74.

Ogundipe, O.O.; Bray, A. The influence of diet and fat cell size on glucose metabolism, lipogenesis and lipolysis in the rat. *Horm. Metab. Res.* 1974, 6:351.

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.

Opazo, J.C.; Soto-Gamboa, M.; Bozinovic, F. Blood glucose concentration in caviomorph rodents. *Comp. Biochem. Physiol.* 2004, 137A: 57-64.

Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*. 2000 ,16(10):903-8. Review

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: Molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:165-9

Popkin, B.M. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr.* 2001, 131:871S-873S.

Prada, P.O.; Zecchin, H.G.; Gasparetti, A.L.; Torsoni, M.A.; Ueno, M.; Hirata, A.E.; Amaral, M.E.C.; Höer, N.F.; Boschero, A.C.; Saad, M.J.A. Western diet modulates insulin signaling, activity and IRS-1Ser³⁰⁷ phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. 2005; 146(3):1576-87.

Price, S.R.; Bailey, J.L.; Wang, X.; Jurkovitz, C.; England, B.K.; Ding, X.; Phillips, L.S.; Mitch, W.E. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathways by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest.* 1996, 98:1703-1708.

Rizkalla, S.W.; Mandenoff, A.; Betoulle, D.; Boillot, J.; Apfelbaum M. Decreased insulin binding to adipocytes precedes both hyperinsulinemia and decreased insulin binding to erythrocytes in cafeteria-fed rats. *Int. J. Obes.* 1987, 11: 493-505.

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

Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428:493-521.

Roselino, J.E.S. Aspectos do metabolismo intermediário em aves granívoras e carnívoras. Ribeirão Preto, 1975. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Rozen, R.; Brigant, L.; Apfelbaun, M. Effects of cycles of food restriction followed by ad libitum refeeding on body composition and energy expenditure in obese rats. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59(3):560-5.

Rui, L.; Aguirre, V.; Kim, J.K.; Shulman, G.J.; Lee, A.; Corbould, A.; Dunaif, A.; White, M.F. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser³⁰⁷ via distinct pathways. *J Clin Invest.* 2001;107:181-189.

Sandri, M.; Sandri, C.; Gilbert, A.; Skurk, C.; Calabria, E.; Picard, A.; Walsh, K.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004. 117:399-412.

Schrauwen, P.; Westerterp, K.R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 2000; 84(4):417-27.

Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995, 270:26746-26749.

Siew, E.D.; Pupim, L.B.; Majchrzak, K.M.; Shintani, A.; Flakoll, P.J.; Ikizler, T.A. Insulin resistance is associated with skeletal muscle protein breakdown in non-diabetic chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2007, 71:146-152.

Soloveva, V.; Graves, R.A.; Rasenick, M.M.; Spiegelman, B.M.; Ross, S.R. Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:27-38.

Stentz, F.B.; Umpierrez, G.E.; Cuervo, R.; Kitabchi, A.E. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes.* 2004, 53:2079-2086.

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.

Stitt, T.N.; Drujan, D.; Clarke, B.A.; Panaro, F.; Timofeyeva, Y.; Kline, W.O.; Gonzalez, M.; Yancopoulos, G.D.; Glass, D.J. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FoxO transcription factors. *Mol Cell.* 2004,14:395-403.

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.

Ungerstedt U. Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man. *J Internal Medicine* 1991; 365-73.

Vázquez-Vela, M.E.F., Torres N, Tovar A.R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 2008, 39(8):715-28.

Veiga, J.A.S.; Roselino, E.S.; Linder, C.; Migliorini, R.H. Effects of fasting and adrenalectomy on the kinetics of glucose metabolism in granivorous and carnivorous bird. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1982, 15: 175-180.

Waalkes, T.P.; Uderfriend, S.A. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissue. *J Lab Clin Med* 1957; 50:733-736.

Wahrenberg, H.; Engfeldt, P.; Arner, P.; Wennlund, A.; Östman, J. Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: findings in hyper- and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986, 63:631-638.

Wajchenberg, B.L. Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2000;44(1): 13-20.

Wang, X.; Hu, Z.; Hu, J.; Du, J.; Mitch, W.E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology.* 2006, 147:4160-4168.

Welle, S.; Barnard, R.R.; Statt, M.; Amatruda, J.M. Increased protein turnover in obese women. *Metabolism.* 1992, 41:1028-34.

Welle, S.; Statt, M.; Barnard, R.; Amatruda, J.M. Differential effect of insulin on whole-body proteolysis and glucose metabolism in normal-weight, obese, and reduced-obese women. *Metabolism.* 1994, 43:441-5.

Yeo, R.; Sawdon, M. Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesth. Intens. Care. Med.* 2007, 8(7):295-298.

Yu, B.P.; Bertrand, H.A.; Masoro, E.J. Nutrition-aging influence of catecholamine-promoted lipolysis. *Metabolism.* 1980, 29:438-444.

Zambon, L.; Duarte, F.O.; Freitas, L.F.; Scarmgnani, F.R.R.; Damaso, A.; Duarte, A.C.G.O.; Sene-Fiorese, M. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev. Nutr.* [on line]. 2009, 22(5): 707-15.

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.

Zhou, Q.; Du, J.; Hu, Z.; Walsh, K.; Wang, X.H. Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and fatty acids. *Endocrinology.* 2007, 148(12):5696-5705.

Zimmermann, R.; Lass, A.; Haemmerle, G.; Zechner, R. Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis – review. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009, 1791: 494-500.

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.* 2004, 306: 1383-1386.

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](#)