



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Larissa Yuri Ishizu

**“EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A
LACTATOGÊNESE, LIPOGÊNESE E LIPÓLISE EM TECIDO
ADIPOSO ISOLADO DE HUMANOS EUTRÓFICOS E OBESOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Larissa Yuri Ishizu
e aprovada pela Comissão Julgadora.
D. Grassi

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Is3e	<p>Ishizu, Larissa Yuri, 1986- Expressão de genes envolvidos com a lactatogênese, lipogênese e lipólise em tecido adiposo isolado de humanos eutróficos e obesos / Larissa Yuri Ishizu. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Dora Maria Grassi Kassinse. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 4. Metabolismo dos carboidratos. 5. Metabolismo dos lipídeos. I. Grassi-Kassinse, Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Expression of genes involved in lactatogenesis, lipogenesis and lipolysis in eutrophic and obese human isolated adipose tissue

Palavras-chave em Inglês:

Obesity

Adipose tissue

Real-time polymerase chain reaction

Carbohydrate metabolism

Lipid metabolism

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Dora Maria Grassi Kassinse [Orientador]

Carlos Alberto da Silva

Miguel Arcanjo Areas

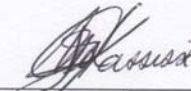
Data da defesa: 14-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 14 de fevereiro de 2012

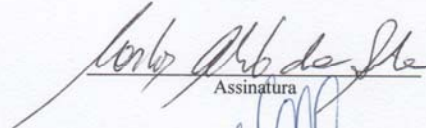
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Dora Maria Grassi Kassis (Orientadora)



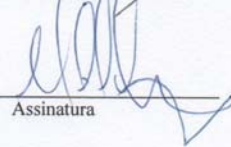
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Assinatura

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves

Assinatura

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Assinatura

“O pensamento é supremo. Pensar acertadamente é criar. Todas as coisas emanam de um desejo e todas as súplicas sinceras são atendidas. Tornamo-nos tal quando nossos corações estão a isso resolvidos. Mantenha o seu queixo para dentro e a cabeça firme. Nós somos deuses em forma de crisálidas.”

Elbert Hubbard

J.C.L.

AGRADECIMENTOS

Devo confessar primeiramente, que esses anos dedicados ao mestrado me trouxeram muito aprendizado e sabedoria, não só referente ao exercício acadêmico em si, mas também – e principalmente – no que se refere ao fortalecimento dos alicerces da minha personalidade. Quando a realização de um trabalho depende de inúmeros fatores e pessoas, tem-se um ganho incomensurável, no fluxo que se dá entre os seres humanos, o que justamente escancara a mente frente à multiplicidade de personalidades, opiniões, linhas de raciocínio e filosofias, de forma que quando ela se rende a uma nova idéia, ela realmente nunca volta ao seu tamanho original. E todos estes relacionamentos me conduziam, invariavelmente, a mim mesmo, frente a frente, cara a cara, como espelhos implacáveis, me trazendo muitos dos traços e nuances por mim, até então, desconhecidos.

Desta forma, os agradecimentos são aqui dirigidos para todos os mestres, que contribuíram para a aprendizagem, no seu sentido mais amplo. Evoluir é necessário. Crescer é dolorido.

Agradeço, primeiramente, a todas as pessoas que de formas variadas constituíram verdadeiros obstáculos à realização deste trabalho, e porque não oportunidades, sem as quais eu jamais teria exercitado minha paciência, compreensão, fé, perseverança, força moral, caráter, dignidade, e confiança em Deus e na minha capacidade. Enfim, devo muito a elas pelo que sou hoje.

Agradeço em especial à Josi, e a toda equipe do Laboratório de Gastroenterologia Experimental, chefiada pelo admirável professor Lício, referência em pesquisa de ponta no Brasil. Agradeço não só pela disponibilização da estrutura do laboratório para a realização dos ensaios moleculares, mas principalmente pela orientação proveniente dessa tão brilhante e dedicada aluna de doutorado que é a Joseane, que nos ensinou pacientemente e com maestria a técnica central desse trabalho. Mais do que isso: ela também ensinou que instruir é um ato de doação, que deve ser feito de corpo e alma, da maneira mais generosa possível, sem esperar algo em troca.

Agradeço à professora Valéria Quitete, ao Fábio Montico e toda equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução, pelo empréstimo do galão de nitrogênio, sem o qual eu não teria conseguido as amostras provenientes do Hospital de Sumaré. Sem dúvida, forneceram uma peça fundamental que assim preenchia as lacunas referentes à conservação e à segurança necessários para o transporte de um material em nitrogênio, tão vulnerável a degradações. Certamente aprendi a me organizar frente ao imperativo da articulação de diversos fatores, como dias específicos para o enchimento do galão, cirurgias de Sumaré, e devolução em tempo ágil ao laboratório de origem, para uso compartilhado.

Agradeço ao professor Lancelotti e à Luciana Hollanda pela atenção, disponibilidade e orientação nos momentos iniciais da execução deste trabalho, que certamente forneceram as primeiras luzes na longa trilha pelo aprendizado da sua técnica principal. Aprendi acima de tudo, a ter critérios mais rígidos, minúcia e cautela durante a prática científica para a obtenção de resultados que satisfizessem as devidas exigências requeridas quanto à confiabilidade, para a execução de um trabalho competitivo e respeitado no meio científico.

Agradeço a todos os voluntários da pesquisa, os quais em momento tão delicado em suas vidas quanto à saúde, se disponibilizaram, sempre de modo gentil, e muitas vezes bem humorado e irreverente, a doar parte da sua gordura durante as cirurgias, e a colaborar com a realização da antropometria e anamnese. Confesso que esta experiência foi umas das mais enriquecedoras, frente a minha personalidade, antes mais tímida e retraída, e que fora desafiada a desenvolver a postura típica de profissional da saúde, mais confiante, paciente, calma, disponível e tolerante.

Agradeço à Camis, e à Aline, do Laboratório de Genética do Câncer, chefiado pela professora Carmen Silvia Passos, pelo uso do seu fantástico aparelho Nanodrop, o qual propiciou mais rapidez, praticidade e confiabilidade em nossos resultados.

Agradeço aos doutores Pareja, Bruno Geloneze e Chaim, à nutricionista Danizinha e a toda equipe formada por médicos, residentes e enfermeiras que possibilitaram meu acesso ao Hospital das Clínicas, aos pacientes, e aos seus dados clínicos em prontuário. O que presenciei foi a realização de um trabalho assiduamente competente de profissionais que muitas vezes abdicaram de suas vidas para a promoção da saúde e do bem-estar de outros seres humanos.

Agradeço ao Dr. Henrique Silveira, e a toda equipe médica do Hospital de Sumaré, pelo fornecimento das amostras provenientes de eutróficos. Agradeço em especial pela simpatia, atenção e disponibilidade sempre presentes na personalidade deste médico tão íntegro e ético.

Agradeço à ajuda financeira imprescindível da Pós-Graduação do Instituto de Biologia, na compra dos materiais essenciais para a execução do presente estudo, e à bolsa fornecida pelo CNPq.

Agradeço ao professor Parada e ao Laboratório de Neurobiologia, que permitiram o uso do politron, outro aparelho essencial para a execução deste trabalho. Agradeço especialmente ao Andrezinho, que se destacou pela sua prontidão em ajudar, e pela sua agilidade intelectual, contribuindo com idéias operacionais de suma relevância.

Agradeço à professora Cristina e ao Laboratório de Nutrição e Câncer pelas inúmeras vezes em que estava em busca de auxílio técnico e intelectual, sendo prontamente amparada pelo seu pessoal,

que além de muito competente, demonstram ser muito acolhedores. Aliás, trata-se de um dos laboratórios mais férteis no ramo das amizades.

Agradeço imensamente à professora Denise por ter disponibilizado seu vasto conhecimento bioquímico para nos auxiliar na estruturação e consolidação das idéias e perguntas centrais do presente estudo. Certamente, foi esta a etapa em que o projeto estava intelectualmente maduro.

Agradeço aos meninos do laboratório, Tim e Guto, que não mais estão presentes, e ao Danilinho e Gustavo, o nosso “estági...”. Trabalhar com essas figuras é colorir o revestimento espesso e grave imposto pela concepção tradicional de trabalho com nuances mais vivas e irreverentes. O trabalho mais fluido, sem o peso da sisudez, somada a doses generosas de objetividade, praticidade e pensamento sintético, com foco, começo, meio e fim, o tornam muitas vezes exequível e rentoso. Obrigada por deixarem o ar do laboratório mais leve.

Agradeço a minha querida irmã científica, a Marcela, que ingressou no mestrado comigo na mesma época, um dos motivos pelos quais iniciamos projetos relacionados e paralelos: ela com ratos e eu com seres humanos. Quem via aquela dupla dinâmica, andando de um lugar para o outro, poderia sugerir erroneamente um descompasso entre personalidades, mas que na verdade revelava-se como uma conjunção harmônica entre opostos de modo semelhante ao que ocorre com fenômenos naturais perfeitamente sincronizados pelo Universo: ela, o claro, o diurno, a energia em plena atividade; eu, o escuro, o noturno, o repouso confiante. Eu, yin; ela, yang. Ela, cheia de energia e iniciativa, um tanto ansiosa, prestes a fazer acontecer. Eu, um oceano de placidez e prudência, sempre à espera da chegada daquele momento exato de agir. Nem uma, nem outra. O meio-termo perfeito alcançado somente pela união. Encontro. Agradeço por você ter estado sempre lá, com dia e hora marcados: quinta-feira, às 7:00h no laboratório, para nós virarmos juntas o galão de nitrogênio, e irmos correndo para o HC. Agradeço também pelas risadas essenciais para atenuar algumas pedras pontudas que encontramos pelo caminho. Agradeço pela injeção de energia tão necessária para movimentar meu temperamento, antes, passivo como o ar, agora, flexível como a água.

Agradeço a meu querido e saudoso Luiz. E é claro aos seus “cafézes”. O Luiz é uma daquelas personalidades pictóricas inesquecíveis, adornadas de poesia no canto, no andar e no olhar. De sambista de raiz, à cientista aplicado, o Luiz injeta melatonina em seus ratos, recitando Adoriran Barbosa. E posso afirmar com muita segurança, de que foi o fundador da socialização embasada no *Coffea arabica*, evento esse consagrado no “02”, que atrai gente à beça, em torno de assuntos extra-acadêmicos, e nem por isso, menos relevantes. Agradeço por você adornar o ambiente científico sisudo do laboratório com pura arte e inspiração. Luiz, você é o nosso patrimônio artístico e cultural!

Agradeço ao estimado professor Miguel. Miguel, pai científico do Luiz, é “geneticamente” inesquecível. O professor Miguel, à semelhança do seu nome, emite influências angélicas que diluem a austeridade acadêmica, deixando o ar mais leve e fácil de sorver. E cura as nossas lamentações com uma generosa dose de humor. Ele faz piada de tudo. Tudo mesmo. Sobre a nossa solterice “encalhada”, os maridos que traem com as secretárias, as anedotas de Clodolino e é claro, a suposta “gravidez” da Fernanda. Mas engana-se quem pensa que esta é a sua principal virtude. Como toda pessoa bem humorada, é dotado de uma inteligência ímpar, e de opiniões sólidas e bem fundamentadas. É extremamente difícil debater algum assunto com o professor Miguel, pois ele tem a intrigante habilidade do questionamento, de modo a nos lançar dúvidas sobre nossas próprias crenças. Aliás, é este único e singular traço que o consagra como um verdadeiro mestre. Ele não dá o peixe: ensina a pescar. Ele não responde a perguntas: mas induz a vários outros questionamentos, que, como por passe de mágica, conduzem a resposta. A sua resposta. Ele inverte o conceito tradicional de aprendizado, nos levando a ainda mais perguntas, pois como todo sábio, conhece o combustível para o progresso. Agradeço pelo constante estímulo daquilo que nos caracteriza como ilimitados.

Agradeço à nossa querida Gabi, mascote do laboratório e inesperadamente esposa dedicada. Quem diria que aquela moça espivitada, que acabara de sair da casa dos pais, no interior, rumo a tão desejada liberdade, fosse se tornar, quase que do dia para noite, uma “senhora” tão comprometida com seu futuro acadêmico e com suas obrigações matrimoniais. A Gabi é retrato da juventude responsável, da combinação irresistível entre força de convicção e determinação unidirecionada, de forma que os seus objetivos não têm outra escolha, senão se render a ela. Obrigada por me inspirar a lavrar arduamente o terreno da vida, ao mostrar que seus frutos tiveram início com uma semente bem pequenina, regada cuidadosamente todos os dias.

Agradeço à querida amiga Fernanda. A Fer é uma daquelas pessoas imprescindíveis para a resolução de qualquer problema. Ela abre caminhos e desata nós como ninguém. Exponha o problema mais complexo, e ela revelará a solução mais óbvia, e prática, e nem por isso, menos genial, à semelhança da mãe natureza, que norteia-se pela simplicidade, na resolução dos seus dilemas. O seu pensamento tem um caminhar reto e nada titubeante. Agradeço por ter me apresentado esta perspectiva mais simples e reveladora sobre a vida.

Agradeço a minha amada amiga Aline. Se os estudos em física fossem tão avançados de modo a caracterizar a personalidade das pessoas, certamente a descreveriam como uma espécie de força propulsora. A Aline não cabe em si, à semelhança de um corpo estelar. Como uma estrela, ela brilha e se expande indefinidamente. Ela se funde com as pessoas, e de forma mágica transforma o ambiente.

Agradeço por ter me acolhido em seu lar, quando eu não mais dispunha da minha antiga morada, pelas nossas intermináveis reflexões espirituais, filosóficas e metafísicas, pelas risadas histéricas de estresse, pelos cafés com chocolate (80% cacau, diga-se de passagem), pelos aconselhamentos nutricionais, jantares nutritivos, e pelos pães com Nutella.

Agradeço ao nosso querido e singular Clodolino. Eu diria que este sim é o nosso mascote. Ele é a coexistência harmônica entre perfeitos opostos. Trata-se de uma daquelas pessoas, que apesar de coroadas com o véu da experiência e do amadurecimento, conservam a pureza de uma criança. E isto é muito evidente para quem se atenta aos seus olhos. Existe uma certa poesia em seu olhar, quando instigado pelas perguntas da Ciência, um brilho muito peculiar que liberta a pureza de uma mente sempre aberta a novas descobertas, sem vícios enrijecidos pelos tempos. Muito obrigada por nos revelar o aprendizado contínuo como fórmula para constante renovação e juventude.

Agradeço a nossa estimada professora Dora. A Dora é a sábia matriarca do Labeest. Questões existenciais? Está perdido? Precisando de aconselhamento? Marque um horário com a Dora, e ela resolve todos os seus dilemas. Mas marque com um pouco de antecedência, pois como ser conectado ao mundo das idéias, todos almejam a perfeição na forma de resolução de problemas. Todas as verdades também são ditas. Para todos. Porém ela é revestida de uma sutileza etérea, quase sagrada, de forma que a mais implacável das verdades se dissolve em reflexão. Já dizia o professor Miguel, que “levar uma bronca da professora Dora é praticamente como receber um elogio”. O poder, como potencial, definitivamente está nas mãos dos possuidores de grandes idéias, mas a linguagem é o meio pelo qual ele é utilizado. Desta forma, presenciei a abertura de muitas portas, através da combinação mágica de certas palavras. Obrigada por mostrar que tudo é possível.

Agradeço ao meu pai, de nome Shigeru, com significado de “árvore frondosa”. O caráter arbóreo se impõe austeramente no ambiente, de modo a adaptar todo um ecossistema para nutrir sua grandiosidade. Sábia é essa natureza que concebe tais espécies arbóreas a fim de que elas resguardem este ecossistema da aridez do sol, da rispidez da chuva e dos ventos, numa relação de interdependência. Os galhos, quando secam, quebram e deixam marcas abruptas, que logo são compensadas pelo nascimento de um jovem galho verde. As raízes são bem estabelecidas e profundas, para sustentar a sua gravidade. E depois da tempestade, que levou muitas folhas, flores e galhos, as sementes brotam verdejantes. Agradeço por absolutamente tudo, todos esses anos. Principalmente pelos valores. Do respeito, dignidade, hombridade, honestidade, determinação, dedicação e força, muita força. Gambaré!

Agradeço a minha irmã Andrea. A Andrea não pára um minuto. Quando pequena, estava ela lá, com 7 anos, cuidando da sua mais nova irmãzinha. Desde então, ia de lá pra cá, se construindo e

desconstruindo, se desdobrando e se reiventando a cada dia, como dotada de uma permanência onipresente sempre mutável e extremamente adaptável. Essa substância flexível da qual ela é constituída serve para preencher lacunas. E todos almejam uma nesga dessa substância multi-uso e sem prazo de validade. Trabalhadora nata, irmã dedicada, filha assídua e ser humano imprescindível. Obrigada por ter me pedido de presente de Natal!

Agradeço a minha mãe Bernadete. Quem a presencia, tem a impressão de ser envolto por uma brisa fresca da manhã. Essa volatilidade expande para além dos limites inalcançáveis pelos seres mais densos. O tempo? Iminigo para muitos, é guardado por ela em recipiente hermeticamente fechado, em lugar secreto, onde, aliás, tem vários deles. Ela é o tratamento ideal para enfermidades metafísicas: alivia aflições, satiriza a tragédia, ameniza o mau humor, deixando vestígio de riso. Obrigada por tornar a vida mais leve.

Agradeço ao Charlinho, meu cunhado. Eu o conheço há 12 anos, mas é como se ele tivesse sido concebido no nosso seio familiar. O Charlinho é exemplo para os homens de nossa época, dotado de hombridade, cavalheirismo, iniciativa, responsabilidade, amadurecimento precoce, postura imponente e um aperto de mão firme. O seu apelido no diminutivo é atribuído, sem sombra de dúvidas, a sua essência frágil de menino, que revela-se no olhar. Não creio que exista um casal mais perfeito que o Charlinho e a Andrea. Obrigada por fazer parte da família.

Agradeço a todos os meus amigos. A todos mesmo, considerados em sentido amplo. Não somente àqueles em que geralmente a palavra “amizade” é aplicada pelos mais cétricos e ortodoxos, que adotam diretrizes quase matemáticas para definir os elegidos da sua estima: X anos de contato + participação relevante em algum momento oneroso do passado + convívio que no mínimo seja semanal = 1 daqueles poucos que totalizam os dedos de uma só mão. Amizade, definitivamente não se define: se sente. E este sentimento se expande para além dos limites físicos impostos pelos corpos, como se nessa expansão as almas se fundissem temporariamente, e retornassem modificadas. Deste modo, estes agradecimentos são dirigidos também aos amigos ocasionais e passageiros, e nem por isso menos relevantes, que por algum momento, através de atitudes, palavras ou simplesmente de um olhar, me resgataram da ilusão egóica do isolamento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xvi
Lista de tabelas.....	xix
Lista de Figuras.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Sujeitos experimentais.....	24
3.2. Coleta de tecido no momento da cirurgia.....	25
3.3. Isolamento de adipócitos e morfometria.....	25
3.4. Q-PCR.....	26
3.4.1. Extração de RNA total.....	26
3.4.2. cDNA.....	27
3.4.3. Reações do Q-PCR.....	27
3.4.4. Validação da eficiência dos genes de interesse.....	28
3.4.5. Análise estatística dos resultados.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7. ANEXOS.....	87
7.1. Anexo I: termo de consentimento livre e esclarecido.....	87
7.2. Anexo II: documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.....	89

RESUMO

Dados do Laboratório de Estudo do Estresse revelaram que a produção de lactato por adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos e obesos mórbidos está sob estímulo de adrenoceptores α_1 . Observou-se também hiperlactatemia no jejum de obesos mórbidos, aumento na liberação de lactato e na lipólise basal e estimulada em adipócitos viscerais isolados destes indivíduos, comparados com eutróficos. Porém dados de nosso laboratório e da literatura sugerem uma relação antagônica entre lipólise e lactatogênese, da qual participa o receptor GPR81, o qual está envolvido com lactato, inibindo a lipólise. Dados da literatura também sugerem a supressão da lipogênese e maior lipólise basal e estimulada dos adipócitos de obesos, com aumento da expressão da aquaporina 7, pelo qual o glicerol gerado na lipólise, é liberado. Por outro lado, estudos da literatura relatam a ocorrência da reesterificação dos produtos liberados após a lipólise de triacilgliceróis (TAGs) no tecido adiposo, na obesidade. Possivelmente, este seria o processo que promoveria a manutenção de grandes estoques de TAGs no tecido adiposo, apesar da maior lipólise e menor lipogênese. Frente aos nossos dados funcionais e os presentes na literatura sobre tecido adiposo visceral na obesidade, o objetivo deste estudo foi detectar alterações no metabolismo glicídico e lipídico neste tecido isolado de humanos obesos, em comparação com eutróficos, sob o enfoque da expressão gênica. Para tanto, quantificamos a expressão de genes envolvidos com a lactatogênese (lactato desidrogenase A, LDHA), lipogênese (acetil-CoA carboxilase, ACACA; glicerol quinase, GK; lipoproteína lipase, LPL) e lipólise (lipase hormônio sensível, LIPE; fosfodiesterase 3b, PDE3b; aquaporina 7, AQP7), e o gene relacionado com a inibição da lipólise via lactato (receptor-órfão acoplado à proteína G 81, GPR81) através do Real-Time PCR. Os resultados obtidos mostraram que o tecido adiposo de mulheres obesas expressa significativamente 49% a mais o gene LIPE e 66% a mais o gene LPL o de que mulheres eutróficas ($p < 0,05$), enquanto que no tecido adiposo de homens não foi encontrada diferença significativa, apenas uma tendência a aumento do gene LPL nos obesos, comparados com eutróficos. Os adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens obesos são morfometricamente maiores que os provenientes de eutróficos tendo como provável fator o aumento da expressão de LPL sem ser acompanhado de alterações na expressão de LIPE. Por outro lado, os adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres obesas não apresentaram alterações morfométricas quando comparados aos adipócitos isolados de eutróficas, estes resultados são explicados pela análise da expressão dos genes LPL e LIPE do tecido adiposo desta região que se apresentou significativamente elevada em obesas. Desta forma, para este tecido estudado, existem alterações, dependente de gênero, que devem ser consideradas para estudos futuros sobre a obesidade. Neste trabalho, com as condições e a população estudada, referente a

obesos e eutróficos de ambos os gêneros, podemos indicar as seguintes conclusões: a expressão de enzimas relacionadas à lipólise e a lipogênese em adipócitos isolados da região visceral de obesos é dependente do gênero enquanto que não há alterações significativas na expressão gênica relacionada à lactatogênese.

Abstract

Previous data from the Laboratory of Stress Study showed that lactate production by adipocytes isolated from visceral adipose tissue of human normal and morbidly obese is under α_1 -adrenoceptor stimulation. It was also observed hyperlactatemia in fasting from morbidly obese, an increase basal and stimulated lactate and glycerol production in visceral adipocytes isolated from these individuals, compared with normal weight. But data from our laboratory and the literature suggest an antagonistic relationship between lipolysis and lactatogênese, which participates in the GPR81 receptor, which is involved with lipolysis inhibition by lactate. Literature data also suggest the suppression of lipogenesis and increased basal and stimulated lipolysis in adipocytes of obese, with increased expression of aquaporin 7, whereby the glycerol generated in lipolysis, is released. Furthermore, published studies have reported the occurrence of re-esterification of the products released after lipolysis triacylglycerols (TAGs) in adipose tissue, in obesity. Possibly, this would be the process that would promote the maintenance of large stocks of TAGs in adipose tissue, despite the increased lipolysis and reduced lipogenesis. Front of our functional data and the literature on visceral adipose tissue in obesity, the aim of this study was to detect changes in glucose and lipid metabolism in this tissue isolated from obese humans, compared with normal weight, with a focus on gene expression. To this end, we quantified the expression of genes involved in lactatogênese (lactate dehydrogenase A LDHA), lipogenesis (acetyl-CoA carboxylase, ACACA, glycerol kinase, GK, lipoprotein lipase, LPL) and lipolysis (hormone sensitive lipase, LIPE; phosphodiesterase 3b, PDE3b; aquaporin 7 AQP7), and the gene related to the inhibition of lipolysis via lactate (orphan receptor-G protein coupled 81, GPR81) using Real-Time PCR. The results showed that adipose tissue isolated from obese women expressed significantly 49% more gene LIPE and 66% more LPL gene than women with normal weight ($p < 0.05$), whereas in men no significant difference was found, only a tendency towards increased LPL gene in obese compared with normal weight. The isolated adipocytes visceral adipose tissue of obese men morphometrically are larger than those from normal weight bearing as the most probable cause increased expression of LPL without being accompanied by alterations in the expression of LIPE. Moreover, the isolated adipocytes visceral adipose tissue of obese women showed no morphological changes compared to normal weight of isolated adipocytes. These results are explained by analysis of gene expression of LPL and LIPE adipose tissue in this region which was significantly higher in obese women. Thus, there are changes, in this tissue studied, dependent on gender, which should be considered for future studies on obesity. In this work, the conditions and the population studied, referring to obese and normal for both genders, we can state the following conclusions: the expression of enzymes related to lipolysis and lipogenesis in

adipocytes isolated from visceral fat of obese people is dependent on the gender while not there are significant changes in enzyme expression related to lactatogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- A – Absorbância
- ABHD - Proteína 5 Contendo Domínio de Hidrolase α/β
- ACACA – Gene da Acetil-CoA Carboxilase
- ACC – Acetil-CoA Carboxilase
- AGL – Ácido Graxo Livre
- AQP – Aquaporina
- AR – Receptor Adrenérgico
- ATGL - Lipase de Triacilgliceróis
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BSA - Albumina Sérica Bovina
- cDNA – Ácido Desoxirribonucléico Complementar
- cm – Centímetro
- CoA – Coenzima A
- Ct – Threshold Cycle
- DAG – Diacilglicerol
- EPM – Erro Padrão da Média
- FAS – Ácido Graxo Sintase
- FATP - Proteína Transportadora de Ácido Graxo
- g – Força Centrífuga Relativa
- g – Grama
- GK – Glicerol Quinase
- GLUT – Transportador de Glicose
- GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclico
- GPR – Receptor Acoplado à Proteína G
- HE – Homem Eutrófico
- HO – Homem Obeso
- HOMA – Modelo de Avaliação Homeostática
- HSD – Hidroxi-Esteróide Desidrogenase
- HSL – Lipase Sensível a Hormônio
- IDL - Lipoproteínas de Densidade Intermediária

IL – Interleucina
IMC – Índice de Massa Corpórea
IRS – Substrato do Receptor de Insulina
Kg – Quilograma
KR - Krebs Ringer
KRBA – Krebs-Ringer Bicarbonato Albumina
KR-HEPES – Krebs Ringer Hepes
L – Litro
LABEEST – Laboratório de Estudo do Estresse
LDH – Lactato Desidrogenase
LIPE – Gene da Lipoproteína Lipase
LPL – Lipoproteína Lipase
M – Molar
m² – Metro ao quadrado
MAG – Monoacilglicerol
MCP - Proteína Atrativa de Monócitos
ME – Mulher Eutrófica
mg – Miligrama
MGL - Lipase de Monoacilglicerol
min – Minuto
mL – Mililitro
MO – Mulher Obesa
NCEP – National Cholesterol Education Program
ng – Nanograma
nm – Nanomolar
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAI -Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PDE – Fosfodiesterase
PI3-K – Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA – Proteína Quinase A
PKG – Proteína Quinase G

PPAR - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma

Q-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro

s – Segundo

TAG – Triacilglicerol

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UCP – Proteína Desacopladora

VLDL - Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa

WHO – World Health Organization

AMPc – Adenosina Monofosfato Cíclico

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

µm² – Micrômetro ao Quadrado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade (anos) e índice de massa corpórea ($\text{IMC} = \text{kg}/\text{m}^2$) dos indivíduos analisados.....	29
Tabela 2 -	Medidas antropométricas dos voluntários obesos (cm, kg e % de gordura).....	30
Tabela 3 -	Diâmetro (μm) e Área (μm^2) de adipócitos isolados de Homens Eutróficos (HE), Mulheres eutróficas (ME), Homens Obesos (HO) e Mulheres Obesas (MO).....	31
Tabela 4 -	Análise das amostras de RNA extraído de homens eutróficos (HE) e obesos (HO) e mulheres eutróficas (ME) e obesas (MO), em Nanodrop.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fotomicrografias obtidas de microscópio óptico em aumento de 10 vezes, de adipócitos isolados de epiplon em câmara de *Mallassez*, proveniente de a) Homem Eutrófico; b) Mulher Eutrófica; c) Homem Obeso; d) Mulher Obesa.....31
- Figura 2 -** Fotografia de gel de agarose com amostras de RNA extraído de tecido adiposo de epiplon de homens obesos (HO) e mulheres eutróficas (ME) e obesas (MO) de eutróficos e obesos mórbidos.....33
- Figura 3 -** Expressão gênica de LIPE em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).....35
- Figura 4 -** Expressão gênica da PDE3b em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e obesos (HO, n=5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).....39
- Figura 5 -** Expressão gênica da AQP7 em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e obesas (MO, n= 8); b) expressão gênica em tecido adiposo de homens obesos (HO, n=5) e mulheres obesas (MO, n=8).....41
- Figura 6 -** Expressão gênica de ACACA em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=3) e mulheres obesas (MO, n= 8); b) expressão gênica em tecido adiposo de homens obesos (HO, n=4) e mulheres obesas (MO, n=8).....43

- Figura 7 -** Expressão gênica da GK em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).....46
- Figura 8 -** Expressão gênica da LPL em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=5) e mulheres obesas (MO, n=8).....49
- Figura 9 -** Expressão gênica de GPR81 em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 4); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).....52
- Figura 10 -** Expressão gênica de LDHA em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n=5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=6).....54

1. INTRODUÇÃO

Obesidade: definição e classificação

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma enfermidade crônica complexa de origem multifatorial, caracterizada por acúmulo anormal ou excessivo de gordura, na forma de triacilgliceróis (TAGs) no tecido adiposo. É considerada pela mesma organização como a “epidemia do século XXI” devido ao número crescente de indivíduos obesos e pelo grau da obesidade que os acomete.

A obesidade é uma das desordens endócrino-metabólicas mais importantes para a saúde pública, já que é fator de risco para diversas doenças, como o diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, a síndrome metabólica e alguns tipos de câncer (WHO, 2011). A OMS classifica a obesidade pelo cálculo do índice de massa corpórea (IMC), que é a divisão da massa de um indivíduo em quilogramas, pela sua altura em metros, ao quadrado (kg/m^2). Indivíduos normais (eutróficos) têm IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 . Os obesos têm IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 . A obesidade é ainda subdividida em diferentes graus, sendo I ($30 \geq \text{IMC} \geq 34,9$), II ($35 \geq \text{IMC} \geq 39,9$) e III também designada de severa ou mórbida ($\text{IMC} \geq 40$). Os indivíduos abaixo do peso têm IMC inferior a 18 kg/m^2 e os com sobrepeso tem IMC entre 25 e 29,9 kg/m^2 . O IMC é o valor mais utilizado para se identificar a obesidade e o sobrepeso, o qual pode ser aplicado para ambos os sexos, e para todas as idades, nos adultos. Porém a detecção da obesidade por este índice nem sempre é fidedigna, pois não corresponde ao mesmo grau de adiposidade em diferentes indivíduos (WHO, 2011), já que não distingue entre massa adiposa e massa muscular como no caso de excesso de gordura corporal, o IMC não avalia a distribuição da adiposidade no organismo (EGGER, 1992).

Obesidade Visceral x Obesidade Subcutânea

Mais importante que categorizar um indivíduo em sobrepeso ou obesidade, é averiguar a distribuição da adiposidade no organismo, já que a adiposidade intra-abdominal (ou visceral) teria maior impacto no desenvolvimento da resistência à insulina, e conseqüentemente da síndrome metabólica, dentre outras alterações patológicas (DESPRÉS, 1998; GIORGINO et al., 2005) e a morbidade (LAPIDUS et al., 1984) associadas à obesidade.

A obesidade intra-abdominal – e não a obesidade embasada no IMC – é um dos sintomas mais prevalentes na síndrome metabólica (GRUNDY et al., 2004; DESPRÉS & LEMIEUX, 2006), definida

como um conjunto de sintomas que predis põem a doenças cardiovasculares e ao diabetes (GRUNDY et al., 2004). Desde 1956, Vague já relatava diferenças na distribuição da gordura corporal em homens e mulheres e a associação da adiposidade visceral, superior, ou andróide (por ser mais recorrente em homens) a alterações metabólicas, como no metabolismo glicêmico e a dislipidemia, se comparada à adiposidade subcutânea, periférica, glúteo-femoral, ou ginóide (mais comum em mulheres). Atualmente, utilizam-se os termos “obesidade em maçã” e “em pêra” para designar, respectivamente, estes dois tipos de excessiva adiposidade.

A maior importância da gordura visceral, se comparada à subcutânea, na fisiopatogênese de alterações cardiometabólicas é atribuída a diferenças funcionais desses dois tipos de adiposidade. A gordura visceral está mais propensa à lipólise, pois expressa maior número de receptores de glicocorticóides, além de ser mais sensível a catecolaminas e apresenta menor expressão de IRS-1, sendo assim menos sensível a ação da insulina (MONTAGUE & O'RAHILLY, 2000). O excesso de gordura visceral apresenta um estado hiperlipolítico, liberando altas concentrações de ácidos graxos livres (AGLs) na circulação. Este estado pode resultar em deposição ectópica de gordura em vários órgãos (fígado, músculo esquelético, pâncreas, rins, coração e artérias), o que pode levar à resistência à insulina e/ou secreção prejudicada de insulina (BANERJI et al., 1995; KOYAMA et al., 1997), além de estresse oxidativo, estresse do retículo endotelial e apoptose. Esta condição é denominada “lipotoxicidade” (SCHAFFER, 2003). Especificamente no fígado, a exposição a grandes concentrações de ácidos graxos livres, através da circulação portal, prejudicaria a função hepática, o que resultaria em hiperinsulinemia, intolerância à glicose e à hipertrigliceridemia (DESPRÉS & LIMIEUX, 2006). A gordura subcutânea, por outro lado, parece ter uma função metabolicamente protetora, já que apresenta alta atividade da lipoproteína lipase (LPL), que hidrolisa TAGs circulantes, permitindo a entrada de AGLs no adipócito, e baixas taxas de lipólise basal e estimulada (REBUFFE-SCRIVE et al., 1985), o que protegeria os órgãos de altas concentrações de AGLs, tendo uma maior capacidade de armazenamento de AGLs que a gordura visceral.

A gordura visceral também apresenta a enzima 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase-1 (HSD-1), responsável pela conversão da corticosterona circulante em cortisol, mais ativa se comparada a mesma enzima no depósito subcutâneo. A gordura visceral, mais sensível ao cortisol, estaria assim mais susceptível aos efeitos deste hormônio, dentre os quais, podemos citar: aumento na expressão de adrenocptores β_2 , aumento na expressão de Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma PPARs (PPARs alpha, gama e delta são uma família de fatores de transcrição ativadas por ligantes que regulam o balanço energético, incluindo o metabolismo lipídico), e de lipoproteína lipase e em

contrapartida, diminuição da expressão de adrenoceptor β_1 além de diminuição de GLUT-4 e de IRS-1. (FARIAS-SILVA et al., 2002; STEWART, 2005).

A gordura visceral apresenta também maior produção de adipocinas inflamatórias, do que a subcutânea, como o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que contribuem para a resistência à insulina, e para o estado pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-hipertensivo da obesidade visceral (DESPRÉS & LIMIEUX, 2006). A proteína atrativa de monócitos-1 (MCP-1), também secretada pelo adipócito, atrai macrófagos, os quais se infiltram no tecido adiposo e produzem citocinas, o que contribui para a perpetuação do quadro inflamatório crônico na obesidade central (WEISBERG et al., 2003).

Além dos efeitos metabólicos, haveria o efeito mecânico ocasionado pela pressão intra-abdominal exercida sobre os rins, pelo excesso de gordura visceral, a qual comprometeria o fluxo sanguíneo renal, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona nos rins, e que por conseguinte, elevaria a pressão arterial (HALL et al., 2004; WAHBA & MAK, 2007). Já foi descrita a síntese de proteínas do sistema renina-angiotensina pela gordura visceral, o que também contribuiria para este processo (ENGELI et al., 2003; GOOSSENS et al., 2003; WAHBA & MAK, 2007).

Outros métodos de medição da obesidade

As medidas antropométricas são os métodos mais utilizados na determinação da adiposidade, da sua distribuição e riscos associados, na prática médica, pois são facilmente aplicáveis e não necessitam de material e pessoal especializado. No entanto, apresentam algumas limitações quanto à indiferenciação entre as gorduras visceral e subcutânea, e à grande variação intra- e inter-examinador (MOLARIUS & SEIDELL, 1998; ONAT et al., 2004). Frente às críticas ao IMC, outras medidas complementares têm sido propostas, dentre as quais, destacam-se as pregas cutâneas, a circunferência da cintura, a razão cintura-quadril e o diâmetro sagital (LOHMAN et al., 1998; KONING et al., 2007). O mais amplamente utilizado, na literatura, para inferição da gordura visceral é a circunferência da cintura, já que por se tratar de uma única medida, estaria menos susceptível a variações na mensuração e a variabilidades étnicas. Consideram-se então os valores a partir de 88 e 102 cm como associados a fatores de risco cardiometabólicos elevados, respectivamente para mulheres e homens (NCEP – ATP III, 2001).

Outras técnicas mais especializadas e precisas de determinação da adiposidade têm sido utilizadas na prática clínica e na pesquisa. Podemos destacar a tomografia computadorizada, a

ressonância nuclear magnética, a bioimpedância (YOSHIZUMI et al., 1999) e o DEXA (*dual energy x-ray absorptiometry*) (PARADISI et al., 1999).

Evolução do tecido adiposo no *Homo sapiens*

O tecido adiposo é exclusivo de animais vertebrados. Estes devem manter mais ou menos constantes baixas concentrações plasmáticas de glicose, ao passo que não podem armazenar grandes quantidades de glicogênio, sendo que neste, a quantidade de energia estocada é menor do que na gordura. Supõe-se que os depósitos de tecido adiposo tenham evoluído da necessidade de maior controle sobre o armazenamento e fornecimento de energia para atender a demanda energética nos animais. O tecido adiposo permitiu então a estes animais, a ampliação da variedade de nichos a serem ocupados, devido ao armazenamento energético que teria propiciado a exploração de nichos mais escassos, com pouca oferta de alimentos. Além da exploração de nichos pouco interessantes, do ponto de vista nutricional, possibilitou também a ocupação de nichos mais frios, devido ao isolamento térmico propiciado pela camada adiposa. Animais aquáticos possuem maior quantidade de gordura do que os terrestres, pois possivelmente, uma maior massa nestes pode limitar a locomoção, o que poderia facilitar o acesso de predadores. Maiores quantidades de gordura em animais de grandes latitudes têm sido atribuídas à função de isolamento térmico (POND, 1998).

Especificamente no homem, a capacidade humana para a pronta deposição de gordura parece ter surgido durante o período do Mioceno (de 23 a 5 milhões de anos atrás), marcado fortemente pela sazonalidade, em que as chuvas e a disponibilidade de recursos também tornaram-se mais sazonais (FOLEY, 1993). A escassez moderada de comida parece ter sido a pressão seletiva dominante durante a maior parte da evolução humana. Esta pressão seletiva selecionava indivíduos capazes de sustentar flutuações energéticas, ou seja, que aumentassem a sua reserva lipídica em épocas de abundância energética – ao invés de atingirem um limite, após o qual a reserva lipídica se estabilizaria- e que disponibilizassem esta energia em épocas de escassez. Os seres humanos, assim são considerados os únicos animais capazes de suportarem a sazonalidade pelas flutuações na sua reserva de gordura (POND, 1998). Dentre outras estratégias adotadas pelo homem estão o modo de vida nômade e a estocagem de reserva energética fora do organismo, ou seja, na forma de alimentos e através do processo de engorda de animais para abate.

Neil (1962) defendeu a idéia de um grupo de genes, os quais designou como “poupadores”, que favoreceriam a eficiência no uso de calorias e que foram selecionados por eventos de escassez de alimentos. Hoje, com a oferta abundante de nutrientes, mudança na composição da dieta (ingestão de

cereais e açúcar refinados, aumento da ingestão de sódio e de ácidos graxos saturados, diminuição da concentração de micronutrientes e fibras e da ingestão de ácidos graxos polinsaturados) (CORDAIN et al., 2005) e redução das atividades físicas, intensificadas pela Revolução Agrícola (no período Neolítico: 10 a 6 mil anos atrás) (DIAMOND, 1999) e Industrial (séc. XIX) (MADDISON, 2003), tais genes nos predisporiam a doenças, como a obesidade e o diabetes tipo II (TEMPLETON, 2008). Os índios Pima, dos Estados Unidos são um exemplo bem ilustrativo de como o passado evolutivo de uma população a predispõe a doenças metabólicas. Essa população sofreu eventos frequentes de escassez alimentar severa, há relativamente pouco tempo e hoje vivem em um ambiente com uma dieta rica em calorias. Essa transição extrema entre ambientes nutricionais proporcionou uma alta ocorrência de doenças metabólicas: metade da população tem diabetes (TEMPLETON, 2008).

Enquanto a escassez de alimentos selecionava indivíduos geneticamente favoráveis à estocagem energética na forma de gordura, em um ambiente no qual a pressão seletiva dominante era o predatismo, os indivíduos mais magros eram mais aptos à fuga, e assim eram selecionados, em detrimento aos de maiores proporções corporais ocasionadas pela gordura. Portanto, a variabilidade genética no acúmulo de gordura pode ser explicada por condições ambientais diversas, e pressões seletivas específicas, que selecionavam os genes da magreza ou da obesidade, em função da vantagem adaptativa que traziam (SPEAKMAN, 2007).

O aumento de tamanho dos homínídeos, com a evolução do *Homo ergaster* também contribuiu para o respectivo aumento da demanda energética (AIELLO & KEY, 2002). Como há uma forte relação entre massa magra e massa gorda, o aumento da primeira - devido ao aumento das dimensões corporais - teria sido acompanhada pelo aumento da segunda (KLEIBER, 1961).

Outro passo relevante na evolução da gordura humana parece ter envolvido o processo de encefalização (LEWIN, 1998). Este processo foi possibilitado por mudanças biológicas e culturais iniciadas com alterações climáticas ocorridas no leste da África há 2 milhões de anos atrás, tornando-a mais fria e seca, o que conseqüentemente substituiu as florestas tropicais por vegetação árida, habitada por herbívoros e grandes predadores (REED, 1997). Então incluiu-se uma grande quantidade de proteínas e ácidos graxos provenientes de peixes e animais herbívoros na dieta antes constituída majoritariamente por carboidratos originados de folhas, raízes, frutos e sementes (LEONARD et al., 2007b). Como o cérebro é constituído principalmente de lipídios (50 a 60% do cérebro adulto humano) (CARLSON & KINGSTON, 2007), e dispense uma grande quantidade de energia (20% do total de energia basal) (LEONARD et al., 2007a), a mudança para este tipo de dieta propiciou o crescimento do cérebro humano. E o crescimento deste representou um desenvolvimento intelectual que possibilitou

ainda um maior rendimento energético, na medida em que o homem aprendia a controlar o fogo para aquecer a sua comida (CARMODY & WRANGHAM, 2009). Este incremento energético somada à demanda energética requerida pela encefalização agiu em favor da seleção dos estoques de gordura. Este processo foi mais intenso nos últimos estágios da evolução humana, com destaque, a transição de *Homo erectus* para *Homo sapiens* (LEWIN, 1998). Neste contexto, supõe-se que a encefalização trouxe uma série de implicações energéticas para o homem, comparativamente a outros hominídeos: aumento da gordura do feto e da criança (STRATZ, 1909), diminuição da velocidade de crescimento corporal na infância (DEACON, 1998), aumento da gordura da mulher, comparativamente ao homem, a fim de garantir o suprimento energético adequado ao feto, durante a gestação e lactação (CLUTTON-BROCK et al., 1989). Adaptações estas a fim de propiciar o suprimento energético adequado para o pleno desenvolvimento cerebral.

Os primatas, em especial o homem, possuem uma quantidade pequena de massa muscular relativamente a sua massa gorda, o que reduz a demanda energética de outros tecidos que “competem” com o tecido cerebral, ao passo que o cérebro tem a gordura como uma de suas fontes energéticas (LEONARD et al., 2003). Embora os genes “poupadores” não sejam exclusivos dos seres humanos, a nossa espécie, em especial, sofreu intensa seleção em favor da economia energética nos últimos 5 milhões de anos, e além do mais outros fatores atuaram em conjunto para a seleção deste perfil metabólico, como a encefalização – com as respectivas adaptações reprodutivas- aumento de tamanho corporal, sazonalidade, etc.

Obesidade e sobrepeso – Estatísticas no Brasil e no mundo

A obesidade tem alcançado proporções epidêmicas em todo mundo, afetando praticamente todas as idades e grupos socioeconômicos. Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) revelam que em 2008, havia 1,5 bilhões de adultos (com idade maior ou igual a 20 anos) acima do peso; destes, 500 milhões eram obesos (em torno de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres), o que perfazia mais de um obeso em cada grupo de 10 pessoas no mundo. Em 2010, aproximadamente 43 milhões de crianças abaixo dos 5 anos de idade estavam acima do peso.

A obesidade e o sobrepeso são o quinto maior fator de risco para mortes globais. Pelo menos, 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano por circunstâncias originadas pela condição do sobrepeso e da obesidade. Estima-se que 44% dos casos de diabetes, 23 % de doença isquêmica cardíaca e entre 7 a 41 % de certos tipos de câncer são atribuídos à obesidade e ao sobrepeso. Atualmente, o sobrepeso e a

obesidade estão relacionados a mais mortes do que a desnutrição: 65% da população mundial vivem em países nos quais o sobrepeso e a obesidade matam mais que a desnutrição (isto inclui todos os países de alta renda e a maioria dos países de média renda). Das 43 milhões de crianças acima do peso, 35 milhões vivem em nações em desenvolvimento e 8 milhões em países desenvolvidos. Estima-se que 25% dos adultos no mundo tenham síndrome metabólica e que há mais de 220 milhões de pessoas que têm diabetes, das quais, aproximadamente 3 milhões morrem anualmente. 80% destas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2011). A obesidade é responsável por 2 a 6 % do custo em atenção à saúde, despendido por países em desenvolvimento; estes valores certamente foram subestimados levando-se em conta o custo dispendido por outras doenças, associadas à obesidade (SICHIERI et al., 2007). No Brasil, estima-se que 46,6% dos indivíduos adultos (51% de homens e 42,3% de mulheres) estejam acima do peso e que 13,9% dos adultos (13,7% de homens e 14 % de mulheres) sejam obesos (VIGITEL, 2009). As estimativas da OMS para 2015 são desanimadoras: 63,4% da população brasileira entre 15 e 100 anos estará com acima do peso e 24,1% será obesa. Para os Estados Unidos, as estimativas são ainda mais alarmantes: 82,4% da população entre 15 e 100 anos estará acima do peso e 53% será obesa.

Antes, típicos de países de alta renda, a obesidade e o sobrepeso, estão crescendo num ritmo acelerado em nações de baixa e média renda, ao lado da desnutrição. É comum, por exemplo, encontrar a subnutrição e a obesidade coexistindo no mesmo país, numa mesma comunidade e até mesmo na mesma família. Este fenômeno deve-se à baixa qualidade dos alimentos mais acessíveis economicamente à população, que concentram grande quantidade de calorias (na forma de açúcar refinado e gordura) e sal, mas com poucos micronutrientes, além das poucas horas livres para a prática de atividade física (WHO, 2011).

O tecido adiposo

O tecido adiposo como órgão endócrino: um breve histórico

A primeira revisão sobre a fisiologia do tecido adiposo data de 1948, quando Wertheimer & Shapiro observaram histologicamente este tecido e concluíram que se tratava de um tecido ricamente vascularizado. Em 1953, Kennedy sugeriu a existência de um fator lipostático na circulação capaz de gerar um sinal de *feed back* negativo, que regulava a ingestão e o gasto calórico. Mais tarde, Dole (1956) e Gordon & Cherker (1956) reconheceram a sua importância fisiológica na liberação de ácidos graxos livres no sangue para serem oxidados em outros tecidos. Até a década de 1960, entretanto, a sua função

principal era atribuída ao amortecimento de choques mecânicos, proteção e suporte aos órgãos, além do isolamento térmico. Posteriormente foram descritas técnicas que possibilitaram estudos fisiológicos do tecido adiposo (HO & MENG, 1964; ORO et al., 1965). Desde então, diversos trabalhos foram conduzidos em experimentos com animais e humanos, no intuito de esclarecer as vias integradas que regulam o seu metabolismo. Desde o isolamento do adipócito por Rodbell (1964), tornou-se evidente a sua importância como entidade funcional do tecido adiposo branco e o principal reservatório de energia, tendo um papel chave na investigação fisiológica dos mecanismos controladores da estocagem (lipogênese) e mobilização (lipólise) de lipídeos. Finalmente, entre as décadas de 1980 e 1990, o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino, o qual secreta fatores que desempenham funções na resposta imunitária, em doenças cardiovasculares e na regulação do apetite (CURI et al., 2002). Em 1993, Hotamisligil et al. identificaram a secreção de TNF- α pelo tecido adiposo e seu papel regulatório negativo na transdução de sinal da insulina. Em 1994, Zhang et al. identificaram e sequenciaram o gene *ob* e sua proteína, a leptina. Logo depois, já em 1995, vários estudos (CAMPFIELD et al., 1995; HALAAS et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995) confirmaram o papel da leptina como reguladora na ingestão e no gasto calórico, através da sua administração em camundongos *ob/ob*, e a redução do peso, da adiposidade, da ingestão, manutenção da massa magra, aumento do gasto energético, restauração da euglicemia e da função reprodutiva. Em 2003, Weisberg et al. identificaram os macrófagos como os causadores predominantes da inflamação no tecido adiposo na obesidade. A partir daí, o papel já bem estabelecido do tecido adiposo como órgão endócrino dinâmico serviu de base para a descoberta de muitas outras proteínas secretadas pelo tecido adiposo (adipocinas), como a adiponectina, a resistina, a proteína ligante do retinol-4 (RBP4) e a interleucina-6 (IL-6) (GALIC et al., 2010).

O tecido adiposo: tipos e constituição

O tecido adiposo é o único órgão que armazena energia em forma de TAGs em suas células, sendo, portanto, o principal reservatório energético do organismo. Os TAGs têm por unidade de massa mais que o dobro de energia que proteínas e carboidratos. Quando a oferta de energia é abundante, sintetiza TAGs, no processo designado lipogênese. Quando ao contrário, a oferta é escassa, há mobilização deste estoque de gordura, no processo da lipólise. Estes processos estão sob regulação dos nutrientes e sinais aferentes do sistema neuro-endócrino (AHIMA & FLIER, 2000).

O tecido adiposo é constituído de, além dos adipócitos, uma matriz de tecido conjuntivo, tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células do sistema imune (linfócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (AHIMA & FLIER, 2000). A gotícula de gordura dos adipócitos é revestida por fosfoproteínas, designadas de perilipinas, as quais participam dos processos de armazenamento e liberação de TAGs. Elas previnem a lipólise em condições basais, através de fosforilações, impedindo o acesso das lipases citosólicas à gotícula de TAG (SALAZAR, 2006).

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco, foco do presente estudo, e o marrom. A função do tecido adiposo marrom se resume basicamente na termogênese (produção de calor), e, portanto, participa na regulação da temperatura corporal. Este tipo de tecido está praticamente ausente no humano adulto, sendo encontrado principalmente em fetos e recém-nascidos. Os adipócitos deste tecido diferenciam-se dos constituintes do tecido adiposo branco por serem menores, apresentarem várias gotículas de gordura de diversos tamanhos dispersas em seu citoplasma abundante. Apresentam também grande número de mitocôndrias, relacionadas à sua função de termogênese, pois não apresentam maquinaria enzimática para a síntese de ATP, e sua proteína UCP-1 (termogenina) libera energia gerada pelo acúmulo de prótons no seu espaço intermembranoso, originado pelo ciclo de Krebs, o que dissipa calor (CANNON & NEDERGAARD, 2004).

O adipócito e a obesidade

A obesidade é uma desordem complexa, não só por sua origem multifatorial, e multiplicidade de sintomas (NAVES, 2009), mas também devido à existência de diferentes tipos de obesidade. Mencionamos anteriormente as obesidades subcutânea e visceral, as quais apresentam características funcionais distintas, que categorizam esta última como mais nociva, pois está relacionada às alterações patológicas e à morbidade da obesidade.

A obesidade requer o desenvolvimento do tecido adiposo pelo aumento de volume de adipócitos pré-existentes (hipertrofia) e/ou pela geração de novos adipócitos (hiperplasia) (ARNER et al., 2010). A avaliação do mecanismo predominante é de suma importância, além da localização desta adiposidade (SMITH et al., 2006). A localização, número e tamanho do adipócito são determinantes para suas características funcionais, e conseqüentemente, das patogêneses associadas à obesidade.

O tamanho do adipócito é determinado pelo balanço entre os processos de lipólise e lipogênese, e representa a fase do ciclo de vida deste adipócito. Esta célula acumula TAGs durante seu ciclo de

vida, até certo ponto, a partir do qual a proliferação destas células é acionada. Portanto, no geral, quanto maiores os adipócitos, mais avançados eles estão no seu ciclo de vida (SMITH et al., 2006).

Vários estudos também têm demonstrado que o aumento do tamanho do adipócito é acompanhado pelo aumento dos processos de captação de glicose (BJORNTORP & KARLSSON, 1970), lipólise e lipogênese (ZINDER & SHAPIRO, 1971; HOLM et al., 1975; OLEFSKY, 1977; JAMDAR, 1978). Estes processos foram confirmados por estudos com atividade enzimática e quantificação de RNAm de enzimas-chave dos processos envolvidos, como LPL, HSL e do transportador GLUT4 (FARNIER et al., 2002), assim como maior expressão de genes implicados com a diferenciação (LI et al., 2002). Ou seja, os adipócitos maiores parecem ser metabolicamente mais ativos que os menores. Porém, parece que a partir de certo ponto de inflexão, o limite de estocagem no adipócito é atingido, neste momento as vias lipogênicas são diminuídas, há diminuição da sensibilidade à insulina, direcionamento da glicose à lactatogênese, o que caracteriza um processo tardio e adaptativo, que limita acúmulo adicional de gordura em um tecido já saturado (DIRAISON et al., 2002; ORTEGA et al., 2010).

Muitos estudos têm relacionado o tamanho do adipócito a prognósticos metabólicos adversos. Indivíduos com diabetes tipo II ou dislipidemia apresentam adipócitos subcutâneos maiores que os indivíduos controle (HALLER et al., 1979). Correlações também têm sido encontradas em homens e mulheres saudáveis, entre o tamanho dos adipócitos femorais e insulina e TAGs plasmáticos no jejum (IMBEAULT et al., 1999). Outros estudos ainda correlacionam adipócitos maiores com a insulina sérica, a resistência à insulina e o aumento do risco de desenvolvimento do diabetes tipo II (WEYER et al., 2000; LUNDGREN et al., 2007). Estudos com a secreção de TNF- α pelos adipócitos também revelam correlação desta com o tamanho destas células secretoras: quanto maior os adipócitos, maior é a secreção da citocina (MORIN et al., 1998; LENCHIK et al., 2004; YANG et al., 2004). A liberação de lactato também se correlaciona com o tamanho do adipócito (CRANDALL et al., 1983; NEWBY et al., 1989; DIGIROLAMO et al., 1992; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996).

Obesos com poucos adipócitos grandes são ainda mais intolerantes à glicose e hiperinsulinêmicos do que aqueles com o mesmo grau de obesidade, apresentando muitos adipócitos pequenos (EVANS et al., 2002; HEATH et al., 2003; RESHEF et al., 2003)

Como já mencionado, adipócitos viscerais secretam mais adipocinas e são mais propensos à lipólise do que os subcutâneos, ao passo que estes apresentam capacidade maior de captar e armazenar

gordura. Podemos então concluir, que o pior prognóstico patofisiológico é o representado por adipócitos grandes, localizados na região visceral.

Em um recente estudo, a ocorrência da hipertrofia e da hiperplasia no tecido adiposo subcutâneo em homens e mulheres com IMC entre 18 a 60 kg/m² não foi influenciada pelo sexo nem pelo IMC. Neste mesmo estudo, a morfologia dos adipócitos esteve fortemente relacionada com o número de destes, de modo que a hipertrofia correlacionou-se negativamente com a hiperplasia, sugerindo vias de regulação comuns entre estes dois processos. Importante ressaltar que este estudo foi realizado com tecido adiposo subcutâneo abdominal e que a morfologia do adipócito foi obtida a partir de uma diferença entre o volume do adipócito real e o esperado obtido a partir de uma curva ajustada para determinada massa de gordura. Tal correlação não foi encontrada, porém, quando foram considerados os valores absolutos de volume dos adipócitos, estes sim dependentes do IMC (ARNER et al., 2010). Estudos com hiperplasia e hipertrofia do depósito visceral, entretanto, são escassos, e patofisiologicamente mais relevantes.

Diferenças quanto à localização da adiposidade e ocorrência de hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, podem ainda sofrer influência do sexo. Entretanto, até a puberdade, a composição corporal difere pouco entre gêneros (GUO et al., 1998). Os hormônios sexuais então dirigem o desenvolvimento em diferentes direções. A testosterona resulta em desenvolvimento da massa muscular em homens, enquanto o estrógeno acarreta o aumento do tecido adiposo (principalmente o subcutâneo) em mulheres (SMITH et al., 2006).

Mulheres apresentam mais gordura (com destaque ao depósito subcutâneo) que homens; respectivamente 25 e 15 % de gordura em média, quando analisados indivíduos sem obesidade (CHUMLEA et al., 1981a), refletindo, em parte, o maior número de adipócitos na mulher do que no homem (SJOSTROM et al., 1972), deflagrado pelo estrógeno, o qual também aumenta o tamanho destas células (CHUMLEA et al., 1981b). Essa expansão do tecido adiposo, que ocorre mais intensamente em mulheres que em homens, durante o desenvolvimento é acionado por genes, e não pelo comportamento, que ocorre após a maturação deste tecido (SMITH et al., 2006).

Por outro lado, o estrógeno parece inibir o aumento da gordura abdominal em mulheres na pré-menopausa, ao passo que homens e mulheres pós-menopausa apresentam maior tendência a aumentar este depósito (LEY et al., 1992), o que pode ser revertido pela terapia de reposição hormonal (HAARBO et al., 1991).

Outros dados da literatura reportam ainda um estímulo do estrógeno para a proliferação de pré-adipócitos em humanos (ANDERSON et al., 2001) e para a diferenciação destas células, embora os estudos nessa área sejam ainda contraditórios (COOKE & NAAZ, 2004). Mais estudos que esclareçam o estabelecimento do número de adipócitos são necessários. A determinação do mecanismo de ação do estrógeno ou de outros agentes que afetam o número de adipócitos é complexa, pois estas substâncias podem agir em mais de um estágio de desenvolvimento destas células, podendo assumir papéis opostos durante estas fases (COOKE & NAAZ, 2004). Além de diferenças relativas à fase do adipócito, existem diferenças quanto à localização do depósito adiposo, ao sexo, à expressão de receptores de estrogênio e sua responsividade espécie-específica, à idade e ao estado fisiológico, as quais dificultam ainda mais a elucidação dos efeitos deste hormônio no adipócito (COOKE & NAAZ, 2004).

O efeito dos estrógenos no tecido adiposo pode também ser indireto, como no hipotálamo, aumentando o gasto e diminuindo a ingesta calórica (WADE et al., 1985).

Todos estes dados da literatura permitem concluir que muitas das características funcionais do tecido adiposo e sua possível relação na gênese de alterações cardiometabólicas dependem de variáveis dos adipócitos, as quais sofrem influência do gênero.

O tecido adiposo e o metabolismo energético

Lipogênese

No processo de lipogênese, o adipócito requer fonte de glicerol-3-fosfato e de ácido graxo livre complexado a coenzima A. O primeiro provém da via glicolítica, e o segundo pode ter duas origens: sintetizados endogenamente a partir de acetilCoA, e principalmente, obtidos da hidrólise e captação de TAGs, contidos em lipoproteínas (quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa [VLDL]) circulantes, mediada pela lipoproteína lipase (LPL) (HOLLENBERG, 1966).

A glicose entra no adipócito por seus transportadores GLUT 1 e 4, sendo que a translocação deste último para a membrana da célula requer estímulo da insulina, a qual também acelera a metabolização da glicose a glicose-3-fosfato (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A glicose pode ter vários destinos: pode ser utilizada para a síntese de ATP e CO₂, TAGs, lactato e glicogênio (este último é bem pouco expressivo) (FLATT & BALL, 1964). A porcentagem de cada produto no metabolismo da glicose depende de inúmeros fatores, como a localização deste tecido adiposo, concentração plasmática

de glicose e hormônios, como insulina e catecolaminas, tamanho destes adipócitos, assim como densidade celular, e condições patológicas, como a diabetes e a obesidade (DIGIROLAMO, 1992).

Na lipogênese, o glicerol, obtido da glicose, é convertido a glicerol-3-fosfato, pela enzima glicerol quinase (GK), o qual é requerido para a esterificação de ácido graxos livres a triacilgliceróis (MARGOLIS & VAUGHAN, 1962). Em mamíferos, a GK é detectada principalmente no fígado, nos rins, e em baixas concentrações na mucosa intestinal, no tecido adiposo e músculos cardíacos e esqueléticos (LIN, 1977), porém inicialmente pensava-se que estava ausente em tecido adiposo (MARGOLIS & VAUGHAN, 1962). Estudos subsequentes, entretanto, revelaram a presença de glicerol quinase em tecido adiposo de humanos e animais. Tem sido reportada a atividade desta enzima em tecido adiposo de humanos (KOSCHINAKY & GRIES, 1971; RYALL & GOLDRICK, 1977) e tecido adiposo de ratos (KOSCHINSKY et al., 1971), sendo que em ambos, a atividade enzimática é menor do que a detectada no fígado.

Embora o tecido adiposo seja capaz de sintetizar ácidos graxos livres *de novo*, os ácidos graxos para a síntese de TAGs provêm predominantemente da hidrólise de TAGs circulantes mediada pela LPL (HOLLENBERG, 1966). A LPL assume diversas funções, dentre as quais a mais importante para o tecido adiposo é a hidrólise de TAGs de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), produzindo respectivamente, os remanescentes de quilomícrons e lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs) (ECKEL, 1989; GOLDBERG & MERKEL, 2001). A enzima é encontrada principalmente no tecido adiposo, nos músculos cardíacos e esqueléticos. (SEMENKOVICH et al., 1989a; YACOUB et al., 1990; MERKEL et al., 1998). O estímulo da LPL ocorre em resposta ao alimento, à infusão de glicose (estimula atividade enzimática) e insulina (estimula atividade enzimática e expressão gênica) e após tratamento da DM dependente e não-dependente de insulina (PREISS-LANDL et al., 2002). A LPL é um importante marcador da diferenciação adipocitária (BJÖRNTORP et al., 1978), e a expressão de LPL aumenta em função do acúmulo de TAGs em pré-adipócitos diferenciados (SEMENKOVICH et al., 1989b). A LPL é um importante fator que regula o metabolismo de lipídeos, o qual influencia na ação da insulina, no balanço energético e na regulação do peso corpóreo e sua composição (WANG & ECKEL, 2009). Estudos com humanos sugerem fortes evidências de que o gene da LPL é um gene da obesidade, sendo relacionado com os processos de iniciação e/ou desenvolvimento desta doença (WANG & ECKEL, 2009).

Por outro lado, os ácidos graxos para a síntese de TAGs podem ser endogenamente sintetizados a partir da glicose, que após uma série de reações ocorridas na mitocôndria e no citoplasma, origina o acetil-CoA, que sofre ação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), convertendo-se a malonil-CoA (BROWNSEY et al., 2006), e este, por sua vez, sofre ação da ácido-graxo-sintase (FAS), formando o palmitato (SEMENKOVICH, 1997). O palmitato é então convertido a acilCoA, que é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, que completa a biossíntese de TAG, finalmente incorporado à gotícula citoplasmática de gordura (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). É válido considerar que o aumento/diminuição na expressão gênica destas enzimas corresponda ao respectivo aumento/diminuição da atividade das mesmas, uma vez que esta relação já foi relatada por estudos prévios (PAULAUSKIS & SUL, 1989; KATSURADA et al., 1990a; KATSURADA et al., 1990b).

Alguns estudos conduzidos com humanos alimentados com dieta rica em carboidratos sugerem que a lipogênese em tecido adiposo excede a que ocorre em fígado, sendo o principal órgão de síntese de ácidos graxos, a qual contribui com até 40% de toda a lipogênese do organismo nessa situação (CHASCIONE et al., 1987; AARSLAND et al., 1997). As enzimas FAS e a ACACA têm sido relacionadas à obesidade em humanos (LOFTUS et al., 2000; MOBBS & MAKIMURA, 2002; KOVACS et al., 2004).

Lipólise

Em escassez de energia, a grande gotícula lipídica de TAGs dos adipócitos é hidrolisada a glicerol e ácidos graxos pela lipólise. Os ácidos graxos circulantes podem ser oxidados para a geração de ATP por outros órgãos. Os ácidos graxos, juntamente com o glicerol podem ser também substratos, no fígado, para a cetogênese e a gliconeogênese, respectivamente (STIPANUK, 2006).

Na lipólise, os principais reguladores são a insulina, as catecolaminas e os peptídeos natriuréticos; já as principais enzimas que hidrolisam TAGs são: a lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo (ATGL), a lipase hormônio sensível (HSL) e a lipase de monoacilglicerol (MGL) (LAFONTAN & LANGIN, 2009).

Em condições basais (sem estímulo), a HSL está dispersa no citoplasma, enquanto que a perilipina permanece sobre a gotícula de gordura e encontra-se ligada à proteína 5 contendo domínio de hidrolase α/β (ABHD5), um co-ativador-chave da ATGL. A ATGL pode ser encontrada no citosol e associada à gotícula lipídica (BRASAEMLE, 2007).

Catecolaminas ativam adenilil ciclase, que aumentam a produção de AMP cíclico (AMPC), que ativa proteína quinase A (PKA), enquanto os peptídeos natriuréticos ativam guanilil ciclase, que aumentam produção de GMP cíclico (GMPc), que ativa proteína quinase G (PKG). As duas quinases ativadas fosforilam a perilipina e a HSL, ativando-a. No estado ativado, a fosforilação da perilipina induz a uma alteração física da superfície da gotícula lipídica, que facilita o acesso da HSL fosforilada. Esta fosforilação da perilipina também libera a ABHD5, a qual liga-se à ATGL, ativando-a, que assim hidrolisa TAG, produzindo diacilglicerol (DAG). A HSL e a MGL (monoacilglicerol lipase) hidrolisam DAG a monoacilglicerol (MAG) (LAFONTAN & LANGIN, 2009) e por fim este é hidrolisado pela MGL, o qual é indispensável neste processo *in vivo* (FREDRIKSON et al., 1986). Além da lipólise estimulada, a ATGL é essencial para a hidrólise basal de TAGs (BEZAIRE et al., 2009).

O glicerol formado sai do adipócito pela aquaporina 7 (KISHIDA et al., 2000), ao passo que os ácidos graxos livres saem pela proteína transportadora de ácido graxo livre (FATP) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Aquaporinas constituem uma família de canais de água, da qual faz parte 13 membros, AQP0 a AQP12 (AGRE, 2004). AQP3, -7, -9 e -10, mais especificamente, são aquagliceroporinas, pois são solúveis por uma variedade de solutos neutros pequenos, como a água e o glicerol (HARA-CHIKUMA & VERKMAN, 2006). A AQP7 é bastante expressa em tecido adiposo humano. Esta expressão é inibida por insulina (RODRÍGUEZ et al., 2011) e estimulada por leptina (RODRÍGUEZ et al., 2011) e adrenalina (MAEDA et al., 2004) com função de canal de glicerol *in vivo* (KISHIDA et al., 2000).

A ativação β -adrenérgica também inibe expressão gênica de AQP7 de adipócitos diferenciados de camundongos (FASSHAUER et al., 2003), sugerindo um “contra-peso” representado pela diminuição da AQP7, que restringe a liberação de glicerol dos adipócitos (FASSHAUER et al., 2003).

Há estudos que sugerem também um caminho alternativo de saída de glicerol dos adipócitos, além daquele possibilitado pela AQP7 (MAEDA et al., 2004). No jejum, moléculas de TAGs são hidrolisadas nos adipócitos, com liberação de ácidos graxos e o glicerol, o qual é então convertido a glicose pelo fígado na gliconeogênese. A AQP7, portanto, é responsável pelo efeito nutricional no glicerol plasmático, e sua regulação é essencial para a homeostase de glicose (MAEDA et al., 2004).

Por outro lado, outras enzimas-chave que são reguladas na lipólise e na lipogênese são as fosfodiesterases. As fosfodiesterases são enzimas que catalizam a hidrólise de AMPC e GMPc, os quais

são mensageiros críticos relacionados à transdução de sinal gerada por uma variedade de estímulos extracelulares, os quais podem ser fatores de crescimento, citocinas, hormônios, luz e neurotransmissores, e portanto modulam muitos processos biológicos fundamentais (MURATA et al., 2009).

A insulina exerce seu efeito anti-lipolítico no adipócito, através do estímulo do subtipo 3, a fosfodiesterase 3 (PDE3), mais especificamente, a isoforma PDE3b (TAIRA et al., 1993; MEACCI et al., 1992), o que reduz a concentração intracelular de AMPc, reduzindo a atividade da HSL, e portanto da lipólise estimulada por hormônios (DEGERMAN et al., 1997; ILLIANO & CUATRECASAS, 1972).

Lactatogênese

Outra importante função metabólica do tecido adiposo é a síntese e liberação de lactato (DIGIROLAMO, 1992), que se dá através da redução do piruvato e oxidação do NADH a NAD⁺, pela enzima lactato desidrogenase (LDH), na glicólise anaeróbica (DRENT et al., 1996). Esta enzima é formada por 4 subunidades, designadas de H (ou B) e M (ou A), devido à expressão predominante no coração e músculo, respectivamente. Cada subunidade, está submetida a um controle genético separado, que resulta em 4 diferentes isoenzimas: LDH-1 (H₄), LDH-2 (H₃M₁), LDH-3 (H₂M₂), LDH-4 (H₁M₃) e LDH-5 (M₄), (DRENT et al., 1996). Já foi descrita a expressão gênica de LDHA em tecido adiposo visceral de ratos alimentados com dieta de cafeteria (LOPEZ et al., 2004) e em tecido adiposo visceral de obesos mórbidos (BARANOVA et al., 2005).

O lactato tem sido descrito como um importante metabólito da glicose nos adipócitos, particularmente em adipócitos grandes (DIGIROLAMO et al., 1992). Há uma forte correlação entre o tamanho do adipócito e a conversão relativa de glicose a lactato. Em adipócitos pequenos, 5-10% da glicose captada pelo adipócito é metabolizada a lactato (DIGIROLAMO et al., 1992; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996), ao passo que em adipócitos maiores, esta proporção é de cerca de 35-40% (CRANDALL et al., 1983). Em adipócitos de obesos, de 50 a 70% da glicose é convertida a lactato (NEWBY et al., 1989).

No jejum, o lactato produzido pelo tecido adiposo assume importante função de precursor para a gliconeogênese hepática, na qual participa de 60 a 70% durante o jejum em uma noite, sendo que a porcentagem restante tem o glicerol, aminoácidos e o piruvato como substratos. Paradoxalmente, o

lactato plasmático, derivado do tecido adiposo (HAGSTRÖM-TOFT et al., 1990; JANSSON et al., 1990) pode encontrar-se elevado em período pós-prandial, pois também assume função de precursor para síntese de glicogênio hepático (FOSTER, 1984; LANDAU & WAHREN, 1988).

Lipólise e lactatogênese

Vários estudos sugerem uma relação antagônica entre a lipólise e a lactatogênese. Estudos *in vivo* e *in vitro* para captação de glicose em tecido adiposo epididimal (LIU et al., 1994; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998) confirmam o efeito estimulatório de baixas concentrações de catecolaminas (LUDVIGSEN et al., 1980; KASHIWAGI & FOLEY, 1982) e o efeito inibitório em altas concentrações de catecolaminas (TAYLOR, W.M. et al., 1976) em captação de glicose. No estudo de Hatore (2006), que avaliou a liberação de lactato por adipócitos isolados de ratos submetidos à natação, houve aumento da liberação de lactato concentração-dependente na faixa nanomolar de catecolaminas, ao passo que houve inibição desta liberação em concentrações mais altas, justamente naquelas em que a lipólise é estimulada. Sugeriu-se então que o aumento das concentrações de AMPc, pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos levaria à inibição da captação e metabolização da glicose (TAYLOR et al., 1976), diminuindo a liberação de lactato.

Por outro lado, sabe-se que a insulina estimula a lactatogênese e inibe a lipólise, de duas maneiras. Na primeira, há ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3-K), a qual ativa proteína quinase B/Akt, que fosforila e ativa a fosfodiesterase (PDE3b), a qual degrada o AMPc (DEGERMAN et al., 1998). Sem o AMPc, não há ativação da PKA, que fosforila e ativa HSL, e portanto não ocorre lipólise estimulada por hormônios (LAFONTAN & LANGIN, 2009).

Neste mesmo contexto, o lactato produzido pelos adipócitos após metabolização da glicose, estimulada por insulina, liga-se ao GPR81, o receptor órfão acoplado a proteína G 81.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) fazem parte da maior e mais diversa família de receptores transmembrana. Eles respondem a uma variedade de estímulos como luz e sinais químicos (GETHER, 2000), e transmitem sinais para o interior da célula através da interação com proteínas G. Quando estes receptores não apresentam um ligante fisiológico relevante definido, são denominados receptores órfãos (REINSCHEID et al., 1995). Muitos receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores órfãos, estão consideravelmente expressos em tecido adiposo. Merece destaque o GPR81,

expresso principalmente em tecido adiposo branco e marrom, mas também, de modo limitado, em fígado, rim e músculo esquelético (LIU et al., 2009).

Recentemente, o GPR81 tem sido apontado como um receptor seletivo para o lactato (LIU et al., 2009; AHMED et al., 2010), o qual, após ter sido originado pela metabolização da glicose estimulada pela insulina, liga-se ao seu receptor, ativando proteína-G-inibitória que medeia inibição da adenilil-ciclase, e que portanto, diminui a produção de AMPc (KASHAN et al., 2010). A relevância da GPR81 na inibição da lipólise, pela insulina, via lactato, pode ser contemplada em modelos de camundongos deficientes para GPR81, os quais apresentaram menor diminuição do AMPc intracelular do que os camundongos controle, após serem desafiados com glicose (KASHAN et al., 2010).

Portanto, a regulação das concentrações de AMPc nos adipócitos pela insulina, envolvem dois processos distintos: degradação do AMPc pela PDE3b, e inibição da produção de AMPc via lactato e GPR81 (KASHAN et al., 2010).

Tecido adiposo e a obesidade

A obesidade é um estado caracterizado por alterações metabólicas, dentre as quais, altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, lactato, insulina e glicose no jejum, e glicose pós-prandial, mesmo antes do desenvolvimento da intolerância à glicose (LOVEJOY et al., 1990).

As altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres na obesidade sugerem uma alteração na lipólise ou na sua captação pelos adipócitos (LAFONTAN & LANGIN, 2009). Estudos também relatam um aumento na lipólise basal no tecido adiposo de obesos (LARGE et al., 1998; WATT et al., 2005; MAIRAL et al., 2006; FRANCESCONI, 2008), assim como a estimulada (FRANCESCONI et al., 2006). A lipólise tem sido alvo das indústrias farmacêuticas, pois as grandes concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres têm relação com o desenvolvimento da resistência à insulina e da síndrome metabólica (BODEN, 1997; FRAYAN, 2001). Neste sentido, é plausível que este possível aumento na lipólise de obesos possa ser detectado ao nível das enzimas HSL, PDE3b e da proteína transportadora, AQP7. Sugerimos, portanto que o aumento da via lipolítica acarrete o aumento da HSL e da AQP7 e diminuição da PDE3b ao nível de expressão gênica, proteína, modificações pós-traducionais e/ou atividade enzimática.

Além disso, vários estudos têm relatado diminuição da lipogênese em indivíduos obesos, (DIRAISON et al., 2002; LETEXIER et al., 2003; SWIERCZYNSKI et al., 2003; MINEHIRA et al., 2004; RANGANATHAN et al., 2006), sugerindo diminuição na expressão gênica, protéica e/ou na atividade enzimática da ACC e da LPL. Outros estudos sugerem ainda uma ressintetização de TAGs a partir dos produtos liberados na lipólise pelo aumento da atividade da enzima glicerol-quinase (GK), no tecido adiposo de obesos (GUAN et al., 2002). O aumento da GK estaria relacionado a maior capacidade de retenção de TAGs, e conseqüentemente ao desenvolvimento da obesidade, já que tenderiam a reutilizar o glicerol liberado na lipólise. Esta via de ressintetização de TAGs explicaria a manutenção de grandes estoques de gordura na obesidade, apesar da elevada lipólise e supressão da lipogênese.

O lactato tem sido descrito como o principal metabólito proveniente da glicose em adipócitos, especialmente nas células maiores (CRANDALL et al., 1983), com cerca de 50 a 70% da glicose convertida a lactato em adipócitos de obesos (NEWBY et al., 1989). Na obesidade, há hiperlactatemia de jejum e é descrito que o lactato provém do tecido adiposo (DIGIROLAMO et al., 1992). Esta liberação pode aumentar em 5 a 8 vezes, em comparação com eutróficos, e há uma correlação positiva entre IMC e lactato plasmático (DIGIROLAMO et al., 1992). Estudos sugerem ainda que a glicose, metabolizada a lactato em tecido adiposo de obesos, entre no adipócito via GLUT-4, cuja translocação ocorre sob estímulo do adrenoceptor α_1 , independente da ação da insulina (DIGIROLAMO, 1994; FAWCETT et al., 2000). Tem sido relatado também que esta maior produção de lactato pelo tecido adiposo na obesidade é resultado da hipóxia local deste tecido (PASSARICA et al., 2009; PASSARICA et al., 2010), que estimula captação de glicose via GLUT-1 (WOOD et al., 2007).

Os estudos do Laboratório de Estudo do Estresse (LBEEST)

Nosso grupo realizou estudos farmacológicos objetivando identificar os subtipos de adrenoceptores envolvidos na produção de lactato por adipócitos isolados de ratos, e verificou que o subtipo α_{1b} está envolvido com a produção de lactato em adipócitos isolados de ratos (GRASSI-KASSISSE & GÉLOËN, 2000). Outros estudos foram conduzidos em nosso laboratório LBEEST, com o intuito de elucidar o metabolismo glicídico e lipídico no tecido adiposo, tanto em adipócitos isolados de humanos eutróficos e obesos mórbidos como em ratos submetidos ao estresse por choques nas patas e à natação.

No estudo de Crege (2007), observou-se a produção de lactato em adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humano eutrófico sob estímulo da noradrenalina, sendo afetada parcialmente pelo bloqueio dos adrenoreceptores α_1 . A incubação dos adipócitos com noradrenalina resultou em produção de lactato aumentada quando comparada aos valores basais de cada sexo, tanto nos indivíduos do sexo masculino quanto nos indivíduos do sexo feminino. Descrevemos também que esta produção não está ligada ao gênero, quando analisada ponto a ponto, entretanto verificamos maior produção em mulheres do que em homens, ao analisarmos a área sobre a curva. A incubação dos adipócitos com noradrenalina e prazosin (antagonista de α_1 e α_{2a}) não alterou a quantidade de lactato induzida pela noradrenalina sozinha, quando foram analisados os indivíduos do sexo masculino, ou em todos os participantes da pesquisa. Este resultado esteve de acordo com outros do laboratório, quando adipócitos isolados de ratos Wistar e de indivíduos obesos foram incubados com prazosin (1 μ M) (FRANCESONI et al., 2006; ALMEIDA, 2008).

No estudo de Francesconi (2008), também realizado no LABEEST, verificou-se aumento da produção de lactato em adipócitos viscerais isolados de obesos mórbidos por estímulo de agonistas do receptor adrenérgico α_1 . Foi analisada também a produção de lactato em adipócitos isolados de obesos mórbidos, mediada pelo adrenoreceptor β , utilizando o agonista não seletivo, a isoprenalina. Verificou-se o estímulo para a produção de lactato, que foi significativo em relação à curva concentração-efeito da cirazolina, apenas na concentração de 0,001 μ M de isoprenalina. Isto demonstrou que os adrenoreceptores β também participariam da produção de lactato em adipócitos isolados de indivíduos obesos. Ainda nesta tese, foi observado aumento da lipólise basal e estimulada nos adipócitos isolados de obesos mórbidos, o que sugeriu a necessidade de mais estudos que esclareçam os processos metabólicos alterados nos obesos, que mantêm grandes estoques de TAGs no seu tecido adiposo.

Outro estudo do LABEEST de 2008, Almeida avaliou a captação de glicose em adipócitos isolados de ratos submetidos ao estresse por choques nas patas. O interesse deste estudo estava em utilizar este modelo de estresse para investigar as alterações metabólicas relacionadas com a obesidade e diabetes tipo 2, já que tais quadros metabólicos se assemelham. Este tipo de estresse levou ao aumento significativo na captação de glicose estimulada por adrenoreceptores α_1 . Além disso, o adrenoreceptor β também aumentou a captação de glicose em adipócitos isolados e, o subtipo β_2 -AR esteve envolvido na potencialização da captação de glicose por cirazolina (agonista de α_1 -AR). Assim, a captação de glicose nos ratos estressados foi subsensível à insulina e supersensível à norepinefrina e cirazolina. Adrenoreceptores α_1 são os mediadores desses efeitos de captação de glicose. Além do mais, a

estimulação por agonista do adrenoceptor β_2 pareceu ser mediada por Gs/cAMP em adipócitos isolados de ratos controles e mediada por Gi/PI3K sinalizando o caminho em adipócitos de ratos estressados.

Todos estes resultados, portanto, têm direcionado as pesquisas de nosso laboratório para outros adrenoceptores que possam estar influenciando a produção de lactato, além dos adrenoceptores α_1 . Ainda neste estudo, um resultado bastante intrigante foi o destino desta glicose captada via receptores adrenérgicos: ela estaria sendo metabolizada a triacilgliceróis, e não a lactato. Isto porque as concentrações de lactato basal liberadas pelos adipócitos isolados permaneciam inalteradas, embora o rato apresentasse hiperlactatemia. Somado a isso, o tamanho dos adipócitos isolados do pâncreas permanecia inalterado (PINHEIRO et al., 2007), apesar da sua lipólise basal aumentada (FARIAS-SILVA et al., 1999), o que contrariou outros estudos realizados em animais controle, nos quais a glicose que entrava nesta via era predominantemente metabolizada a lactato (HAGSTRÖM-TOFT et al., 1993; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998). Cabe ressaltar que estes últimos dados da literatura não são provenientes de modelos de estresse e então o ambiente hormonal e metabólico observado no estresse pode de alguma forma, alterar a % de glicose que é metabolizada a TAG ou lactato.

O estudo de Hatore (2006), como já citado, observou aumento da liberação de lactato em adipócitos isolados de ratos submetidos à natação, que foi concentração-dependente na faixa nanomolar de catecolaminas, até certo ponto, a partir do qual houve inibição desta liberação, nas quais possivelmente a lipólise é estimulada.

Após esta breve revisão dos estudos de nosso laboratório, sobre as alterações no metabolismo glicídico e lipídico em humanos obesos mórbidos e ratos submetidos ao estresse por choque nas patas e à natação, propomos o seguinte modelo de alterações fisiológicas presentes na obesidade em humanos: o tecido adiposo apresentaria uma alteração de sensibilidade à insulina, o que estaria relacionada à elevação da glicemia, que estimularia o pâncreas a produzir e liberar a insulina, levando à hiperinsulinemia. Como se constatou uma hiperlactatemia, e maior produção de lactato em adipócitos isolados destes obesos, sob estímulo de agonistas α_1 adrenérgicos, além de outros ARs, infere-se que a entrada de glicose seria insulino independente, pela via acionada por estes receptores ativados, após a qual seria metabolizada a lactato. Este lactato, também contribuiria para a hiperinsulinemia, pois são precursores na gliconeogênese hepática. Frente à observação da maior lipólise basal e estimulada destes adipócitos isolados, e a supressão das vias lipogênicas, sugeridas por estudos da literatura, coexistindo

com grandes estoques de TAGs nos seus adipócitos, sugerimos que o destino da glicose seria a lactatogênese, e os produtos da lipólise seriam reesterificados, contribuindo para a manutenção de grandes reservas de TAGs no adipócito.

Neste contexto, objetivamos quantificar a expressão de alguns genes implicados na metabolização da glicose a lactato (LDHA) e na síntese de TAGs (ACC, LPL e GK), assim como de genes envolvidos na lipólise (LIPE, PDE3b) e no destino do glicerol, originado por esta lipólise (AQP7). E por fim, quantificar o gene GPR81, o qual medeia a inibição da lipólise pelo lactato, no contexto da obesidade, caracterizada por elevada lipólise e lactatogênese. Objetivamos, portanto, elucidar, sob o enfoque da expressão gênica, quais mecanismos no metabolismo glicídico e lipídico estão alterados no tecido adiposo visceral do obeso (em comparação com o eutrófico) os quais, de modo geral, contribuem para a manutenção de seus grandes depósitos de gordura, e que embasam as alterações patológicas encontradas na obesidade.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a expressão de genes envolvidos na lactatogênese, lipogênese e lipólise em tecido adiposo visceral (omento ou epiplon) isolado de humanos eutróficos e obesos.

Específicos

Avaliar a expressão quantitativa de genes através da técnica de Real-Time PCR em tecido adiposo visceral isolado de humanos eutróficos ($18,5 < \text{IMC} < 24,9$) e obesos ($\text{IMC} > 30$), submetidos à cirurgia bariátrica ou à cirurgia de colecistectomia não laparoscópica e à herniorrafia. Os seguintes genes relacionados aos processos de lactatogênese, lipogênese e lipólise, precedidos das suas funções específicas, foram avaliados:

- **Lactatogênese** (síntese de lactato): Lactato-desidrogenase (LDHA)
- **Lipogênese** (síntese de TAG a partir da glicose): Acetil-CoA-carboxilase (ACCA)
- **Lipogênese** (síntese de TAG a partir da do glicerol): Glicerol-quinase (GK)
- **Lipogênese** (hidrólise de TAGs circulantes na membrana do adipócito): Lipoproteína lipase (LPL)
- **Lipólise** (hidrólise de TAGs): Lipase hormônio sensível (LIPE)
- **Lipólise** (hidrólise de AMPc): fosfodiesterase (PDE3b)
- **Lipólise** (saída de glicerol do adipócito): Aquaporina 7 (AQP7)
- **Lipólise e Lactatogênese** (inibição da lipólise pelo lactato): Receptor órfão da proteína G (GPR81)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos experimentais

Os voluntários deste estudo foram homens e mulheres, com idade entre 25 a 59 anos, eutróficos ($18,5 < \text{IMC} < 24,9$) e obesos ($\text{IMC} > 30$). Amostras de tecido adiposo visceral (omento ou epiplon) dos voluntários obesos eram coletadas nas cirurgias bariátricas, realizadas pela equipe dos doutores José Carlos Pareja e Elinton Adami Chaim no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. O epiplon dos voluntários eutróficos era fornecido após as cirurgias de colecistectomia não laparoscópica e herniorrafia, pela equipe do doutor Henrique José Virgili Silveira, do Hospital Estadual de Sumaré – Sumaré, SP.

Estes sujeitos passaram por uma avaliação médica e exames de sangue de rotina realizados antes da cirurgia, conforme o estabelecido pelas normas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e do Hospital Estadual de Sumaré, sendo selecionados como possíveis doadores de tecido aqueles que estiverem aptos a realizar a cirurgia, desde que concordassem assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Estas pessoas selecionadas passaram por uma anamnese específica que avaliou, entre outros itens, as medidas corporais para definir o padrão de distribuição da gordura (relação cintura/quadril [somente nos obesos] e Índice de Massa Corporal - $\text{IMC} = \text{peso}/\text{altura}^2$ [nos eutróficos e obesos]) e a condição necessária para a formação de um grupo homogêneo a ser estudado (ver anexo I “Termo de consentimento”).

Também avaliamos na população obesa as seguintes medidas antropométricas: altura (cm), peso (kg), circunferências (cm) do pescoço, da cintura, do quadril, da coxa, do punho e do abdômen; quantidade de gordura (em porcentagem e em kg) e de massa muscular (kg). A coleta de algumas medidas foi em apenas parte da população e o número de colaboradores está indicado na coluna referente a n.

Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Estudo do Estresse (LABEEST), no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional antigo Depto de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP e no Laboratório de Gastroenterologia Experimental, do Gastrocentro, UNICAMP.

O isolamento e a morfometria de adipócitos isolados foram realizados no Laboratório de Estudo do Estresse (LABEEST), e no Laboratório de Nutrição e Câncer, ambos no Depto de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

As análises plasmáticas foram realizadas no Hospital das Clínicas da UNICAMP e no Hospital Estadual de Sumaré. Estas informações foram coletadas dos prontuários dos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, sob o número 412/2011, processo 0355.0.146.000-11.

3.2 Coleta do Tecido no momento da Cirurgia

Parte do tecido adiposo visceral foi colocada em recipiente estéril, contendo aproximadamente 200 mL de solução KREBS-RINGER-HEPES (KR-HEPES) fria ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), pH 7,4 e levado imediatamente ao laboratório para se realizar o isolamento e a morfometria dos adipócitos. O preparo do tampão KR-HEPES envolve duas etapas. A primeira delas é a preparação de 200 mL do tampão KREBS-RINGER (KR), que é constituído por solução de NaCl (0,154 M), de KCl (0,154 M), de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,110 M), de KH_2PO_4 (0,154 M), de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,154 M). Em seguida é feita uma mistura deste tampão KR com NaHCO_3 , na proporção de 91% de KR e 9% de NaHCO_3 . Para completar o tampão, são adicionados a glicose (6 mM) e o Hepes (25 mM). Para a realização da digestão do tecido adiposo, foi preparada uma nova solução de KR-HEPES, porém com adição de albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos-graxos) (30 g/L). Este novo tampão recebe o nome de KRBA (KREBS-RINGER BICARBONATO ALBUMINA). Outra parte do tecido coletado foi colocada em tubo falcon de 50 mL, o qual foi imerso em nitrogênio líquido e levado imediatamente para o laboratório, onde uma alíquota de aproximadamente 300 mg de tecido adiposo visceral foi politronada em 1,0 mL de reagente Trizol (Invitrogen - Life Technologies) e armazenada em biofreezer a -80°C para posterior extração do RNA.

3.3 Isolamento de adipócitos e morfometria

Os procedimentos de isolamento e morfometria de adipócitos do tecido adiposo humano foram realizados segundo Pinheiro et al. (2007), com adaptações para tecido humano e são descritos a seguir. Adipócitos foram isolados do tecido adiposo visceral (omento ou epiplon), por uma modificação no procedimento original de Rodbell (1964). O tecido adiposo foi pesado (de 2 a 3 g), picado e digerido em tubo falcon (50 mL) contendo 6 mL de tampão KRBA, com a adição de 1 mg/mL de colagenase

(tipo 2, *Clostridium histoliticum*). O tubo foi agitado em banho metabólico, com 60 ciclos/min a 37°C, durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de nylon (200 µm) para um novo falcon. Com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, o infranadante foi removido, permanecendo no interior do tubo apenas as células. Em seguida, adicionamos 6 mL do tampão KRBA e esperamos 3 minutos até que a maioria dos adipócitos flutuassem. Este procedimento de aspiração do KRBA infranadante e lavagem de células foi repetido por mais 3 vezes (CREGE, 2006; FRANCESCONI, 2008). Após a última lavagem, o volume de 1 mL do sobrenadante de células foi pipetado para outro tubo falcon, e o volume deste foi preenchido até 12,5 mL (adaptado de RODBELL, 1964). Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular final foi pipetada em um tubo de ensaio contendo 900 µL de KRBA, para se obter diluição de 1:10. Desta nova suspensão celular, foram pipetados 10 µL em uma câmara de Mallassez para registro fotográfico e posterior medição utilizando o software IMAGE PRO PLUS ANALYSER após captura de imagem através do microscópio Leica (área analisada de 632µm).

3.4 Q-PCR

3.4.1 Extração de RNA total

RNA total foi extraído de cerca de aproximadamente 300 mg de tecido adiposo humano visceral, através da adição de 1,0 mL de reagente Trizol (*Invitrogen - Life Technologies*). O tecido foi homogeneizado em politron e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este processo a amostra foi congelada em biofreezer a -80 °C para posterior extração do RNA. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 s. Após incubação de 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado através da adição de 500 µL de álcool isopropílico, seguido de 10 min de incubação à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g durante 15 min a 4 °C será realizada, o pellet obtido foi lavado em seguida com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 g por 10 min a 4 °C e, posteriormente, lavado com 1 mL de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 20 µL de água mili Q. A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose para visualização das unidades ribossomais 28 e 18S após coloração com gel red, e a quantificação do mesmo foi obtida através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.4.2 cDNA

Para a produção do cDNA, utilizamos o *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

3.4.3 Reações do Q-PCR

Os genes elegidos para o estudo da sua expressão quantitativa em eutróficos e obesos foram específicos para os adipócitos, uma vez que todo o tecido adiposo visceral foi usado para extração de RNA, ou seja, os adipócitos não foram isolados.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para os seguintes genes, utilizamos os respectivos assays (TaqMan™ - Applied Biosystems):

- Lactato-desidrogenase (LDHA): Hs00855332_g1
- Acetil-CoA-carboxilase (ACCA): Hs00167385_m1
- Glicerol-quinase (GK): Hs00832267_s1
- Lipase hormônio sensível (LIPE): Hs00943410_m1
- Fosfodiesterase (PDE3b): Hs01057213_m1
- Lipoproteína lipase (LPL): Hs00173425_m1
- Receptor órfão da proteína G (GPR81): Hs00261411_s1
- Aquaporina 7 (AQP7): Hs00357359_m1

O gene Ciclofilina A (TaqMan™ - Applied Biosystems), assay Hs99999904_m1, foi escolhido como controle endógeno da reação (ORTEGA et al.,2010), o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Os primers foram marcados com o fluoróforo FAM.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, LDHA, ACCA, GK, LIPE, PDE3b, LPL, GPR81 e AQP7 com o controle endógeno ciclofilina. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

3.4.4 – Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação do gene LDHA, ACCA, GK, LIPE, PDE3b, LPL, GPR81 e AQP7, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de tecido adiposo visceral de humano em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

A concentração de amostra validada como eficiente para os genes LDHA, ACCA, GK, LIPE, PDE3b, LPL, GPR81 e AQP7 foi de 40,0 ng de cDNA.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2x, 0,625 µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0 µL de cDNA (40ng de cDNA) , sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50 °C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A expressão do gene alvo foi avaliada comparativamente com o controle endógeno (gene ciclofilina), portanto, de modo relativo, determinada pelo cálculo $2^{-\Delta Ct}$, e as expressões gênicas comparativas entre amostras também foram calculadas de modo relativo, em relação a uma amostra escolhida como controle. Estes cálculos estão descritos em ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 para o PCR quantitativo.

3.4.5 Análise Estatística dos Resultados

Todos os resultados foram expressos como médias \pm EPM de experimentos, realizados nos 4 diferentes subgrupos. Os valores foram analisados através de teste *t* de Student, para comparar dois grupos experimentais, e ANOVA seguida do teste de Tukey, quando comparamos mais de dois grupos experimentais, usando Prisma Software, e com $p < 0,05$ indicativo de significância. Em algumas análises, foram realizados ambos os testes (ANOVA e Tukey), dentre os quais foi citado nos rodapés das tabelas apenas o teste com diferença significativa ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sujeitos

A descrição da população estudada quanto à idade e ao IMC encontra-se na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Idade (anos) e índice de massa corpórea (IMC = kg/m²) dos indivíduos analisados.

	EUTRÓFICO		OBESO	
	Homens (n=2)	Mulheres (n=6)	Homens (n=5)	Mulheres (n=8)
Idade (anos)	56 _{±2}	51,2 _{±3,3}	43,2 _{±3,8}	37,1 _{±4,1} [#]
IMC (kg/m ²)	20,4 _{±0,3}	22,9 _{±0,8}	42,9 _{±2,2} *	42,6 _{±2,1} *

Os valores estão expressos em média \pm EPM, e o n indica o número de indivíduos analisados.

Mulheres eutróficas vs mulheres obesas (p<0,05, teste *t* Student).

*Homens eutróficos vs Homens obesos; Mulheres eutróficas vs Mulheres obesas (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey)

As seguintes medidas antropométricas foram avaliadas na população obesa: altura (cm), peso (kg), circunferências (cm) do pescoço, da cintura, do quadril, da coxa, do punho e do abdômen; quantidade de gordura (em porcentagem e em kg) e de massa muscular (kg). A coleta de algumas medidas foi em apenas parte da população e o número de colaboradores está indicado na coluna referente a n (Tabela 2)

Tabela 2: Medidas antropométricas dos voluntários obesos.

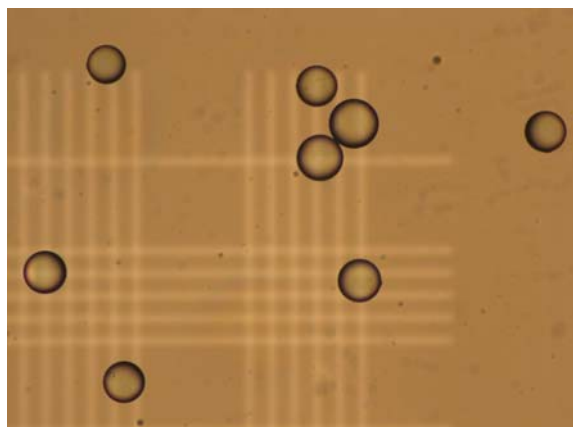
	OBESOS			
	Homens	n	Mulheres	n
Altura (cm)	174 \pm 3,3	5	156,4 \pm 1,7*	8
Peso (kg)	129,8 \pm 4,9	5	104,9 \pm 5,9*	8
Pescoço (cm)	42,9 \pm 1,9	5	38,6 \pm 1,2	7
Cintura (cm)	134,4 \pm 4,1	5	115,2 \pm 1,9*	7
Quadril (cm)	125,8 \pm 7,8	5	127,7 \pm 5,7	7
Coxa (cm)	63,4 \pm 4,3	5	63 \pm 4	7
Punho (cm)	20,2 \pm 0,4	5	18,8 \pm 0,4	5
Abdômen (cm)	140,4 \pm 2,8	5	132 \pm 5,2	6
Gordura (Kg)	46,5 \pm 2,9	5	47,7 \pm 4,2	7
Gordura (%)	35,6 \pm 1,2	5	45 \pm 1,4*	7
Massa Muscular (kg)	83,4 \pm 2,3	5	57,3 \pm 2,9*	7

Os valores estão expressos em média \pm EPM, e o n indica o número de indivíduos analisados.

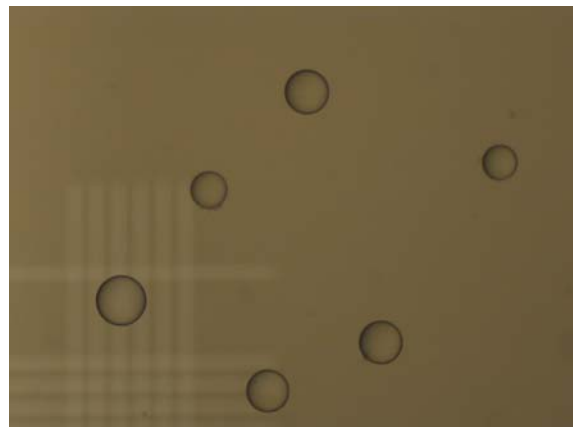
*Homens obesos vs mulheres obesas ($p < 0,05$, teste *t* Student)

Morfometria

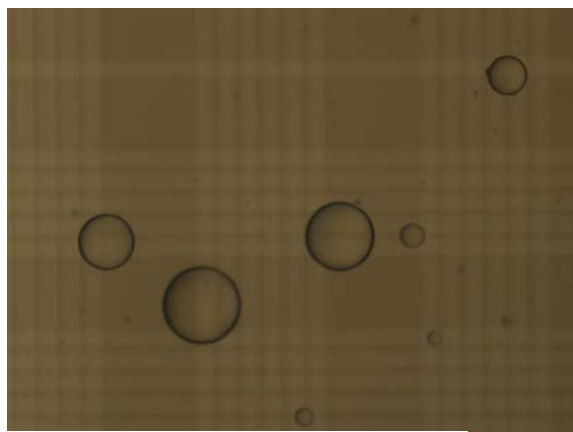
Adipócitos isolados do tecido adiposo visceral (epiplon ou omento) foram fotografados e sua morfometria analisada. Abaixo, 4 fotomicrografias referentes aos 4 subgrupos analisados: homens eutróficos, mulheres eutróficas, homens obesos e mulheres obesas (Figura 1).



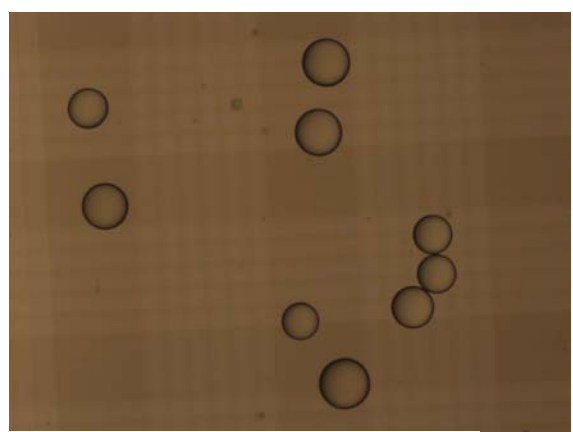
b. Homem Eutrófico



a. Mulher Eutrófica



d. Homem Obeso



c. Mulher Obesa

Figura 1: Fotomicrografias obtidas de microscópio óptico em aumento de 10 vezes, de adipócitos isolados de epiplon em câmara de *Mallassez*, proveniente de a) Homem Eutrófico; b) Mulher Eutrófica; c) Homem Obeso; d) Mulher Obesa.

Como voluntárias eutróficas menopausadas participaram da análise morfométrica de adipócitos, comparamos a morfometria destas células entre pré-menopausadas e menopausadas (Tabela 3), a fim de validar a constituição de um grupo homogêneo de mulheres eutróficas (Tabela 4). Com relação ao grupo de obesas, todas são pré-menopausadas.

Tabela 3: Diâmetro (μm) e Área (μm^2) de adipócitos isolados de Mulheres Eutróficas Menopausadas e Pré-menopausadas

	MULHERES EUTRÓFICAS	
	Pré-menopausadas	Menopausadas
Diâmetro (μm)	104 \pm 6	97 \pm 7
Área (μm^2)	8491 \pm 1006	7469 \pm 1070

Os valores estão expressos em média \pm EMP, e o n indica o número de indivíduos analisados.

Uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre pré-menopausadas e menopausadas, justificamos portanto, a consolidação do grupo de mulheres eutróficas, quanto à morfometria de adipócitos.

A análise morfométrica indica diferença significativa no tamanho dos adipócitos isolados de homens obesos, sendo 71% e 180% maiores que os adipócitos de homens eutróficos e 44% e 89% maiores que os provenientes de mulheres obesas, no que diz respeito, respectivamente, ao diâmetro e à área. Por outro lado, não houve diferenças no tamanho (diâmetro e área) de adipócitos isolados entre mulheres eutróficas e obesas e entre ambos os gêneros (homens e mulheres) de eutróficos (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro (μm) e Área (μm^2) de adipócitos isolados de Homens Eutróficos (HE), Mulheres eutróficas (ME), Homens Obesos (HO) e Mulheres Obesas (MO).

	HE	ME	HO	MO
Diâmetro (μm)	75 \pm 12	103 \pm 7	128 \pm 2*	89 \pm 7 [#]
Área (μm^2)	4611 \pm 1540	7151 \pm 887	12929 \pm 479*	6833 \pm 1054*

*Homens Eutróficos vs Homens Obesos; Homens Obesos vs Mulheres Obesas (ANOVA, seguido de teste Tukey, e teste t Student, $p < 0,05$)

Homen Obesos vs Mulheres Obesas (teste t Student, $p < 0,05$)

Embora diferenças sexuais ainda não tenham sido sistematicamente estudadas quanto ao número e tamanho de adipócitos viscerais (SYMONDS, 2011), nossos valores aproximam-se dos encontrados na literatura, sendo estes maiores, com relação aos valores de mulheres obesas (~130 μm : SPALDING et al., 2008) e menores, relacionados aos de mulheres eutróficas (~80 μm de diâmetro: DROLET et al., 2008) e de homens obesos (~111 μm de diâmetro: BOIVIN et al., 2007; 120 μm de diâmetro: SPALDING et al., 2008), com a exceção dos valores de homens eutróficos (~750-1.500 μm^2 de área: LANGOUCHE et al., 2010), muito menores que os encontrados pelo presente estudo.

Os dados antropométricos referentes à porcentagem de gordura corporal dos voluntários obesos de ambos os gêneros (Tabela 2) revelam valores consideravelmente elevados deste parâmetro com relação aos valores de referência de eutróficos (15 e 25% de gordura em homens e mulheres). Embora mulheres obesas apresentem quase 10% a mais de gordura que homens obesos, 30% e 20% a mais, respectivamente, que os valores de referência de homens e mulheres eutróficos, seus adipócitos não apresentam diferenças de tamanho com relação aos eutróficos de ambos os gêneros. Por outro lado, mesmo apresentando menor % de gordura que mulheres obesas, os homens obesos apresentam os maiores adipócitos, com relação a todos os outros grupos.

A expansão do tecido adiposo visceral em homens obesos parece ser predominantemente devido ao processo de hipertrofia do adipócito, e em mulheres obesas, devido à hiperplasia desta célula, já que os adipócitos provenientes destas não apresentam diferenças significativas com relação aos advindos de eutróficas.

Sugere-se então que mulheres possam apresentar maior número de adipócitos que homens, o que pode ser atribuído ao efeito do estrógeno, e, portanto o seu tecido adiposo pode armazenar maiores quantidades de TAGs, sem, no entanto ocasionar um aumento significativo no tamanho dos adipócitos. Isto pode ser observado pela maior % de gordura em mulheres do que em homens eutróficos, sem que diferenças no tamanho destes adipócitos possam ser encontradas (Tabela 4). Da mesma forma, mulheres obesas apresentam maiores % de gordura que homens obesos (Tabela 4), porém os maiores adipócitos destes indivíduos representam justamente a elevação do acúmulo de TAGs, em um número reduzido de células. A gordura nas mulheres, pode ainda estar sendo preferencialmente armazenada na região glúteo-femoral (subcutânea), ao contrário dos homens, que armazenam preferencialmente na região abdominal (visceral), o que também pode explicar o aumento dos adipócitos viscerais somente

nos homens. Estudos sobre a influência do gênero sobre a obesidade conferem ao estrógeno este efeito protetor, já que inibem a deposição da gordura na região abdominal.

A diferença no tamanho destes adipócitos viscerais traz importantes implicações patofisiológicas: maior tendência à lipólise e, portanto, a elevadas concentrações de AGLs plasmáticos, podendo levar à lipotoxicidade, como também maior liberação de citocinas inflamatórias. O presente estudo, no entanto detectou maior expressão gênica de LPL e de LIPE, e possivelmente maior lipogênese e lipólise, no epiplon de obesas em relação às eutróficas, o que não foi observado em homens obesos comparados com eutróficos. Estes resultados sugerem que os adipócitos de obesas possam apresentar um *turnover* de lipídeos mais intenso e provavelmente é o que explica a ausência de alterações significativas na morfometria destes adipócitos. Até o momento não há relatos na literatura indicando as causas destas alterações para esta população de obesas, e se hormonais quais seriam os hormônios envolvidos.

PCR-Real Time

Após a extração do RNA das amostras de tecido adiposo de epiplon de eutróficos e obesos, a integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose para visualização das unidades ribossomais 28 e 18S após coloração com gel red (Figura 2). A análise do gel revelou que as amostras de RNA estavam íntegras.

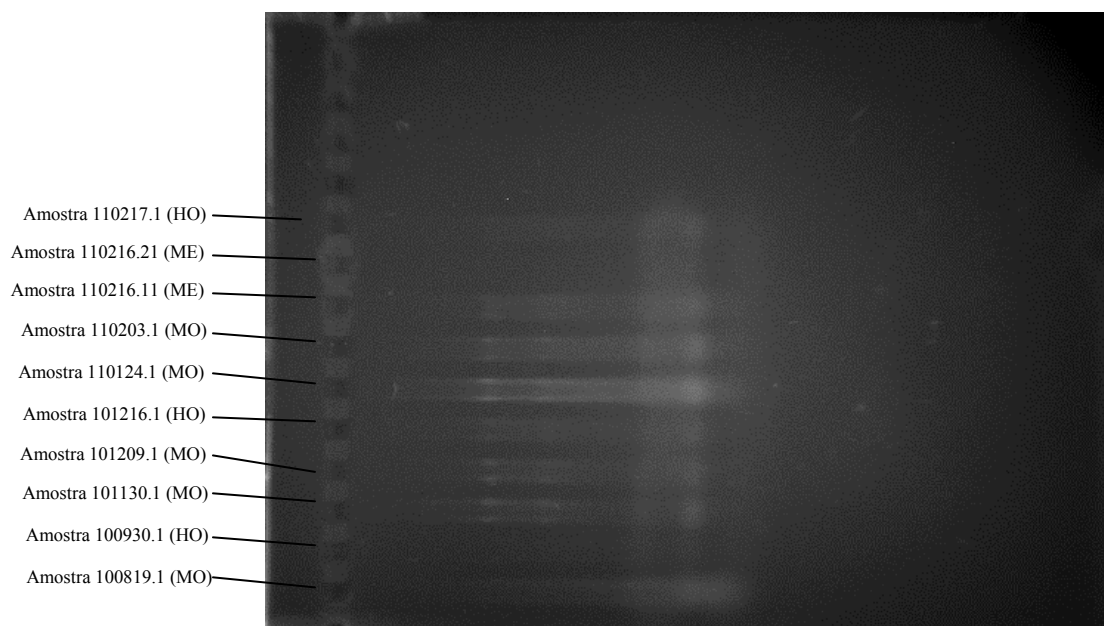


Figura 2: Fotografia de gel de agarose com amostras de RNA extraído de tecido adiposo de epiplon de homens obesos (HO) e mulheres eutróficas (ME) e obesas (MO) de eutróficos e obesos mórbidos

A quantificação do mesmo foi obtida através de leituras de absorvâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise das amostras de RNA extraído de homens eutróficos (HE) e obesos (HO) e mulheres eutróficas (ME) e obesas (MO), em Nanodrop.

Amostra	Concentração de RNA (ng/ul)	A 260	A 280	260/280*	260/230*
100819.1 (MO)	3521,5	88,038	47,875	1,84	2,02
100930.1 (HO)	404	10,099	5,674	1,78	1,61
101130.1 (MO)	1030,4	25,761	13,596	1,89	1,73
101209.1 (MO)	920,3	23,008	12,115	1,9	1,7
101216.1 (HO)	392,9	9,823	5,261	1,87	1,08
110124.1 (MO)	2409,1	60,226	30,332	1,99	1,88
110203.1 (MO)	1055,3	26,382	13,837	1,91	1,8
110216.11 (ME)	837,4	20,935	10,818	1,94	1,87
110216.21 (ME)	51,7	1,293	0,806	1,6	0,52
110217.1 (HO)	1009,2	25,231	12,759	1,98	0,72
100610.1 (HO)	201	5,024	2,755	1,82	1,78
100902.2 (MO)	794,6	19,886	10,555	1,88	1,72
100916.2 (HO)	697,1	17,431	9,666	1,8	2,15
110302.12 (ME)	503,4	12,584	6,951	1,81	1,37
110302.22 (HE)	781,6	19,539	10,387	1,88	1,64
110316.11 (HE)	431,4	10,785	5,945	1,81	1,89
110316.22 (ME)	507,7	12,694	7,129	1,78	1,66
110316.32 (ME)	695	17,376	9,714	1,79	0,76
110316.41 (ME)	650,4	16,259	8,736	1,86	1,86
100701.2 (MO)	576,5	14,414	7,191	2	1,42
100527.2 (MO)	529,2	13,231	6,451	2,05	1,49

*A análise da pureza do RNA leva em consideração a razão entre a leitura da amostra na absorvância a 260 nm e a 280 nm, que é o comprimento de onda definido para leitura de proteínas e afins e 260nm e a 230nm, que é o comprimento de onda para leitura de compostos orgânicos. Para resultados satisfatórios em PCR em tempo real é desejável que o valor de ambas razões estejam próximas a 1,8 ou maiores.

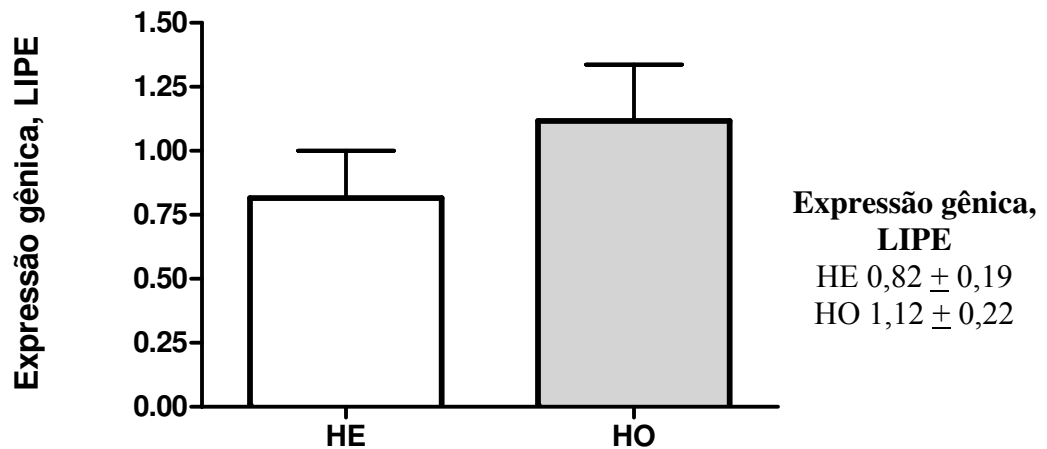
Como a maioria das amostras apresentou valores das razões 260/280 e 260/230 próximos a 1,8, revelando a presença de poucos contaminantes, e todas as amostras de RNA estavam íntegras, todas foram utilizadas para as reações de PCR quantitativo.

Avaliação da expressão gênica no tecido adiposo

LIPE

A análise de expressão gênica mostrou diferença significativa na expressão do gene LIPE (referente à enzima HSL) no epiplon, entre mulheres eutróficas e mulheres obesas, enquanto que não foi encontrada diferença significativa em homens eutróficos e homens obesos. Mulheres obesas (MO) expressam 49% a mais o gene LIPE que mulheres eutróficas (ME) ($p=0,021$), ao passo que homens obesos (HO) expressam 37 % a mais este gene que homens eutróficos (HE), porém esta diferença não apresenta significância ($p=0,47$) (Figura 3).

a)



b)

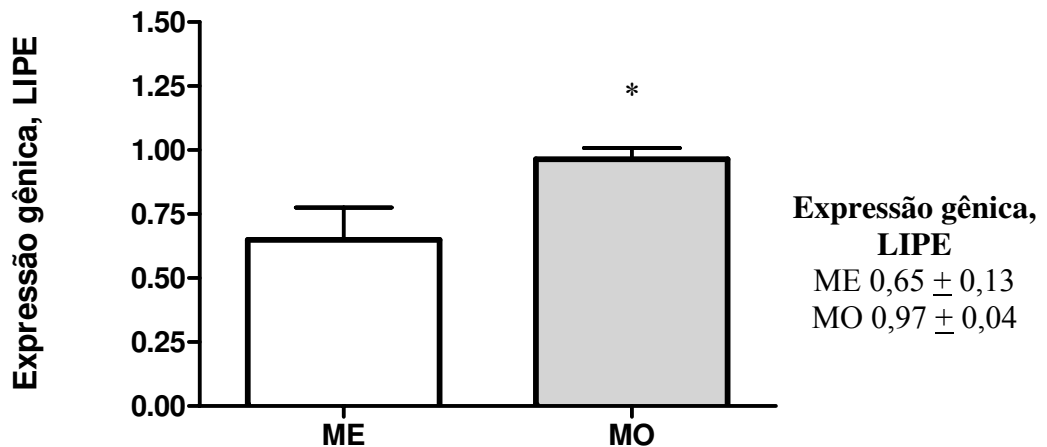


Figura 3- Expressão gênica de LIPE em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).

No estudo de Francesconi (2008), foi relatado aumento da lipólise basal e estimulada por catacolaminas em adipócitos isolados de eplon de obesos mórbidos, se comparados aos eutróficos, sem distinção entre os gêneros. O aumento significativo na expressão de LIPE somente em mulheres obesas observado no presente estudo, distingue-se, portanto dos dados de Francesconi (2008).

Os estudos da literatura, com modelos animais e humanos, *in vivo* e *in vitro*, são bastante controversos, com resultados variados. Há estudos *in vivo* que relatam aumento geral da lipólise em indivíduos obesos, o qual não é observado, se a massa de gordura é levada em conta (COPACK et al., 1994). Da mesma forma, estudos com microdiálise em obesos, após uma noite de jejum, revelaram que a taxa lipolítica por massa de tecido adiposo, foi normal, se comparada aos valores de eutróficos (JANSSON et al., 1992). Outros estudos revelaram que a taxa de lipólise basal *in vitro* é maior nos adipócitos de obesos do que nos de eutróficos (LARGE et al., 1998; WATT et al., 2005; MAIRAL et al., 2006); não observa-se esta diferença se o tamanho dos adipócitos é levado em conta, já que os adipócitos de obesos são maiores (TCHERNOF et al., 2006).

Ou seja, todos estes estudos sugerem resultados variados em função da forma de análise elegida: em termos absolutos, parece haver aumento da lipólise, o que provavelmente explica o aumento das concentrações plasmáticas de NEFA (LAFONTAN & LANGIN, 2009), mas em termos relativos, a lipólise relativa, por quantidade de proteína ou gordura da célula adiposa, parece não diferir entre eutróficos e obesos.

No estudo de Francesconi (2008), o qual se detectou maior lipólise em obesos, se comparados com eutróficos, foi realizada a quantificação absoluta de glicerol liberado por célula, pois sempre foi considerado o mesmo número de células no meio de incubação ou seja 10^6 cels/mL, sem a relativização da lipólise por quantidade de lipídeo ou proteína. Como no presente estudo, avaliou-se a morfometria de adipócitos, revelando aumento significativo no tamanho destas células somente nos homens obesos, se comparados com homens e mulheres eutróficos e mulheres obesas, sugerimos que a diferença entre as taxas de lipólise entre mulheres seja ainda mais pronunciada ao se levar em conta a relativização da lipólise por massa gorda. Da mesma forma, acreditamos que a diferença, sem significância, entre a taxa lipolítica de homens eutróficos e obesos, seja ainda menor nesta relativização. Na literatura, os dados são preferencialmente direcionados à análise de homens, e neste caso, nossos dados parecem corroborar muitos estudos da literatura, nos quais as taxas lipolíticas por massa gorda, entre homens eutróficos e obesos são iguais.

Podemos inferir, portanto, que o aumento da lipólise estimulada em mulheres obesas seja devido ao aumento da expressão da LIPE, e que o tamanho dos seus adipócitos não difere se

comparado com mulheres eutróficas, devido justamente, a esta maior lipólise, sustentada por estudos prévios funcionais (FRANCESCONI, 2008) e pelo atual estudo molecular.

Os estudos das lipases ao nível da expressão de RNAm e proteína, e sua atividade *in vitro* também apresentam resultados variados. Existem estudos que relatam menor expressão de HSL na obesidade e lipólise basal aumentada (LARGE et al., 1998; WATT et al., 2005; MAIRAL et al., 2006) sugerindo o aumento na atividade de outras lipases, como a ATGL. Neste contexto, alguns estudos não apresentaram diferenças na expressão de RNAm de ATGL na obesidade (LANGIN et al., 2005; MAIRAL et al., 2006). Outros estudos, por outro lado, verificaram redução do ATGL RNAm no tecido adiposo de indivíduos insulino-resistentes, independente da sua adiposidade (JOCKEN et al., 2007). Em estudos com camundongos geneticamente obesos, os resultados são contraditórios: elevação (VILLENA et al., 2004; LAKE et al., 2005) ou diminuição (VILLENA et al., 2004) da expressão de RNAm de ATGL nos seus adipócitos. Uma pesquisa realizada com tecido adiposo subcutâneo e visceral de eutróficos e obesos detectou aumento significativo na expressão de RNAm de ATGL e HSL em tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos, se comparados com eutróficos, o que corrobora com o aumento da LIPE no pânículo visceral de mulheres obesas no presente estudo, e com o aumento das lipólises basal e estimulada em obesos no geral, em Francesconi (2008). Neste mesmo estudo, a expressão da proteína ATGL foi menor em tecido adiposo subcutâneo de obesos, enquanto que no visceral, não houve alteração. A atividade basal das lipases de TAG *in vitro* foi menor no tecido subcutâneo, mas no visceral, não houve diferença. O RNAm de ATGL foi correlacionado positivamente com o índice HOMA dos indivíduos obesos, os quais apresentavam uma alteração de sensibilidade à insulina (STEINBERG et al., 2007), o que corrobora outros estudos, nos quais havia inibição transcricional da ATGL e aumento de ATGL RNAm em modelos murinos deficientes de insulina ou com resistência à insulina (KRALISCH et al., 2005; KERSHAW et al., 2006; KIM et al., 2006). Estes dados sugerem que a elevação do ATGL RNAm no tecido adiposo de obesos parece estar relacionado à resistência à insulina, e não a adiposidade, o que corrobora outros trabalhos (JOCKEN et al., 2007). O aumento da expressão de ATGL sem o respectivo aumento da atividade das lipases *in vitro* sugere que a regulação da atividade da ATGL, como da HSL, pode ser mais dependente de modificações pós-traducionais, como a fosforilação e a translocação, o que sugere a necessidade de mais estudos referentes a essas modificações em nossos voluntários (GRANNEMAN et al., 2007).

Por outro lado, outros estudos observam menor lipólise induzida por catecolaminas em tecido adiposo subcutâneo de crianças e adultos obesos (JENSEN et al., 1989; BOUGNÈRES et al., 1997), atribuída a menor expressão de HSL (LARGE et al., 1999), do adrenoceptor- β_2 (REYNISDOTTIR et

al., 1994) e a maior expressão de adrenocetores- α_2 (MAURIÈGE et al., 1991). Neste mesmo estudo, foi observada redução de 40% na lipólise induzida por catecolaminas em indivíduos obesos. Resultado semelhante foi encontrado em pré-adipócitos (redução de 60-70% da lipólise estimulada) (resultados expressos em lipólise por conteúdo de proteína, ou por lipídeos incubados). Houve também redução na expressão da HSL nos adipócitos de obesos (LANGIN et al., 2005). Convém ressaltar que estudos realizados em tecido adiposo subcutâneo podem apresentar resultados diversos dos referentes ao visceral, foco do presente estudo, devido a diferenças moleculares e funcionais entre estes dois panículos, sendo que o último apresenta maior relevância na fisiopatogênese da obesidade.

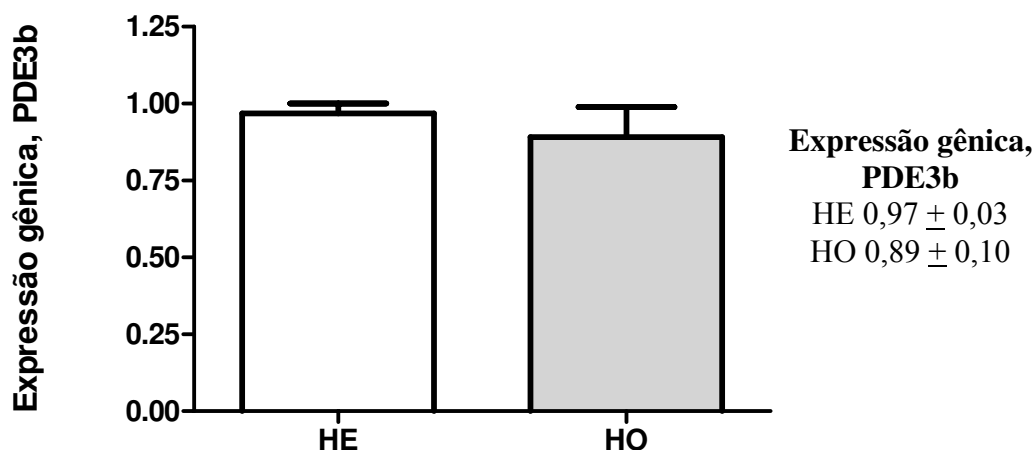
No presente estudo, não verificamos a expressão de ATGL, embora fosse relatado aumento da lipólise basal dos adipócitos isolados de epiplon de obesos no trabalho de Francesconi (2008). É possível, portanto, que haja aumento na expressão de RNAm e proteína de ATGL e/ou na sua atividade enzimática. Ou então este aumento da lipólise seja devido à quantificação absoluta de glicerol liberado por célula (FRANCESCONI, 2008), sem a relativização da lipólise por quantidade de lipídeo ou proteína.

O aumento de HSL RNAm com o provável aumento de ATGL RNAm (sugerido pelo aumento da lipólise basal de adipócitos isolados de obesos), por outro lado, corrobora um estudo no qual foi observada uma forte correlação entre as expressões dos transcriptos de ATGL e HSL, sugerindo uma forte correção das duas enzimas (LANGIN et al., 2005). A variação coordenada na expressão gênica de ATGL e HSL durante a diferenciação adipocitária e em condições variadas de dieta sugere que os dois genes participam de uma rede regulatória comum, com forte controle transcricional (LANGIN et al., 2005).

PDE3b

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as expressões gênicas de homens eutróficos (HE) e obesos (HO) ($p=0,66$) e mulheres eutróficas (ME) e obesas (MO) ($p=0,77$), sendo que homens obesos e mulheres obesas expressam, respectivamente, 8 e 0,1% a menos, que seus respectivos controles (Figura 4).

a)



b)

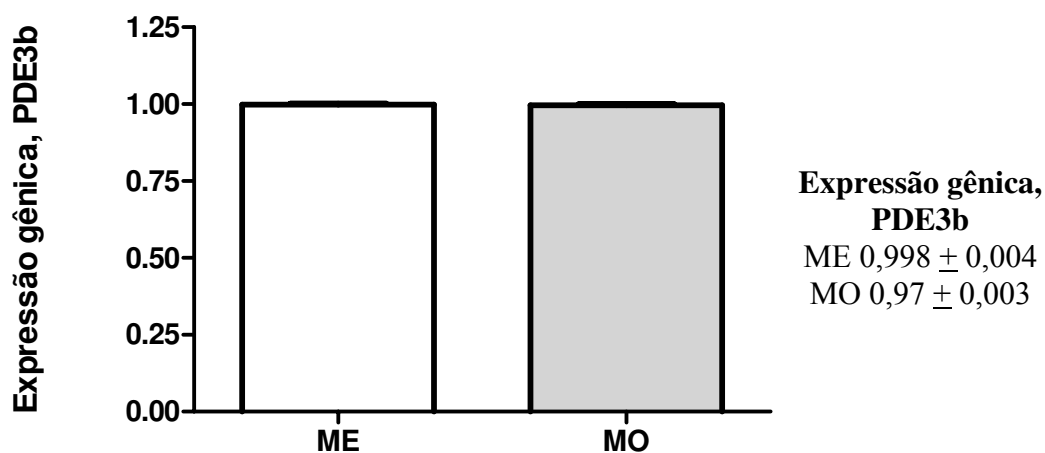


Figura 4- Expressão gênica da PDE3b em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e obesos (HO, n=5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).

Em estudo com microdiálise em tecido adiposo subcutâneo, maiores quantidades de um inibidor de fosfodiesterase foram requeridas em indivíduos eutróficos do que em obesos mórbidos, para aumentos similares na lipólise, sugerindo uma maior atividade da PDE3 em eutróficos que obesos (FLECHTNER et al., 2005). Foi então sugerido que a alteração de sensibilidade à insulina característica da obesidade poderia prejudicar o estímulo da PDE3 pela insulina (FLECHTNER et al., 2005), o que foi corroborado por um estudo com camundongos insulino-resistentes, em que houve redução da atividade da PDE3 induzida pela insulina (HASEGAWA et al., 2002), e pelo estudo com

com camundongos obesos e diabéticos KKAY, em que houve redução de RNAm, proteína e atividade enzimática de PDE3b no seu tecido adiposo epididimal (TANG et al., 1999) .

Outro possível mecanismo que inibe a PDE3b em tecido adiposo de obesos, é o desencadeado pelo TNF- α . Já foi descrito que o TNF- α estimula a lipólise em adipócitos de humanos e roedores expostos à citocina (HAUNER et al., 1995), possivelmente pelos seguintes mecanismos: na diminuição da perilipina na gotícula lipídica (SOUZA et al., 1998); na diminuição da inibição da lipólise via proteína G inibitória (GASIC et al., 1999) e finalmente, através de uma diminuição da expressão gênica, da proteína e da atividade da PDE3b, induzida pelo segundo mensageiro ceramida C2 (RAHN LANDSTROM et al., 2000). Como a obesidade é caracterizada por um estado inflamatório crônico no qual grandes quantidade de TNF- α são liberadas pelo tecido adiposo (WEISBERG et al., 2003), é possível considerar o efeito inibitório do TNF- α na PDE3b e o consequente aumento da lipólise estimulada.

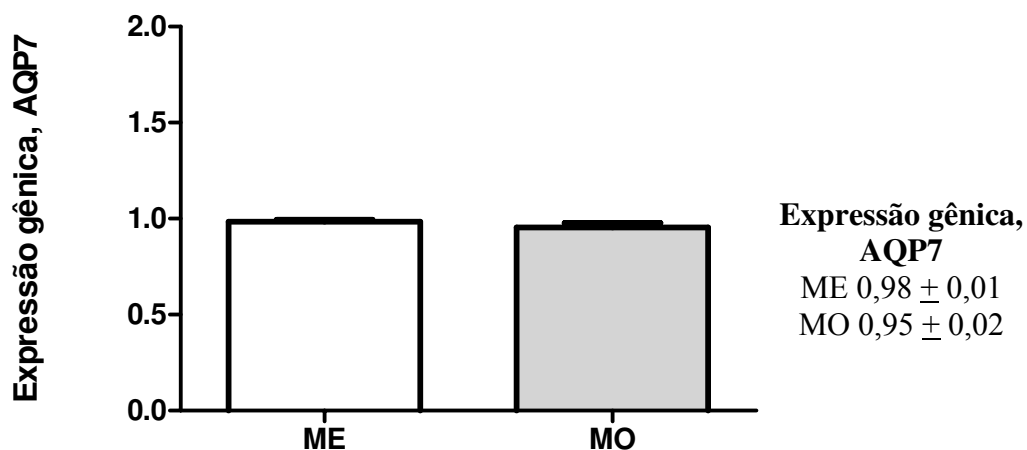
É plausível que os adipócitos provenientes de obesos apresentem ainda estímulo da insulina sobre a fosfodiesterase, já que somente pequena parte dos voluntários é resistente à insulina (1 homem dentre 5 e 2 mulheres dentre 8). Porém o quadro inflamatório dos obesos, caracterizado pelo aumento da TNF- α , dentre outras, pode inibir a expressão da fosfodiesterase 3b. Ou seja, os dois estímulos antagonísticos podem ser responsáveis pela ausência de diferenças significativas na expressão da PDE3b entre eutróficos e obesos de ambos os gêneros.

Podemos inferir também que o aumento da lipólise estimulada em mulheres obesas seja devido somente ao aumento significativo da expressão de LIPE, já que não houve diferenças significativas na expressão de PDE3b, se comparadas às eutróficas.

AQP7

No presente estudo, não encontramos diferenças significativas entre mulheres eutróficas (ME) e mulheres obesas (MO), e entre homens (HO) e mulheres obesas (MO), com mulheres obesas expressando 3% a menos que mulheres eutróficas e 5% a mais que homens eutróficos (Figura 5).

a)



b)

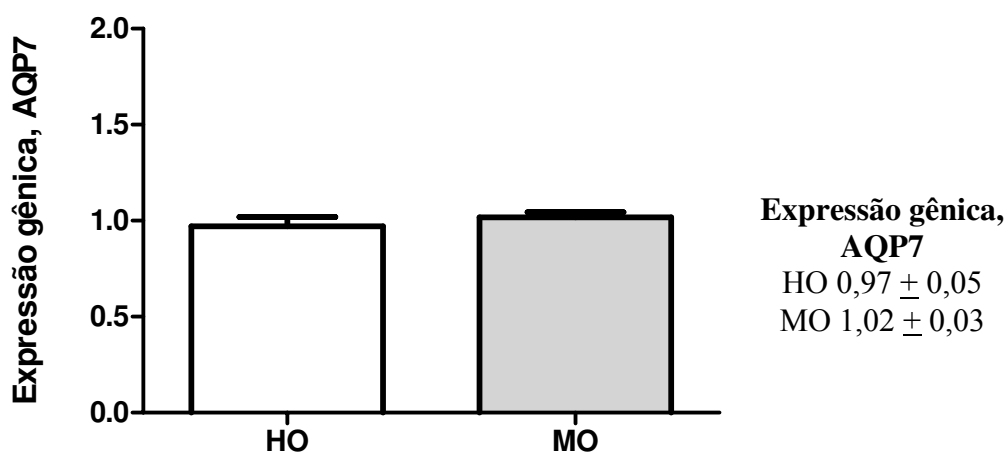


Figura 5- Expressão gênica da AQP7 em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e obesas (MO, n= 8); b) expressão gênica em tecido adiposo de homens obesos (HO, n=5) e mulheres obesas (MO, n=8).

Em nosso estudo, esperávamos detectar maior expressão de AQP7 no tecido adiposo visceral (epiplon) de obesos, encontrada em pesquisas precedentes (MARRADES et al., 2006; PRUDENTE et al., 2007; CATALÁN et al., 2008), devido às maiores lipólises, tanto basal, como estimulada, no mesmo modelo de estudo anterior (FRANCESCONI, 2008).

Estudos sobre a expressão gênica de AQP7 em humanos apresentam resultados variados, em função do grau de obesidade e da localização do tecido adiposo (visceral e subcutâneo). Já foi relatada

uma diminuição na expressão gênica de AQP7 em tecido adiposo subcutâneo de mulheres obesas mórbidas (CEPERUELO-MALLAFRÉ et al., 2007). Por outro lado, foi detectado aumento na expressão gênica de AQP7 em tecido adiposo visceral de mulheres obesas, graus I e II (CATALÁN et al., 2008). Em outro estudo ainda, houve maior expressão de AQP7 no tecido adiposo visceral de indivíduos sobrepeso, obesos e com DM-2, se comparados com eutróficos, sem diferenças na expressão de AQP7 no depósito subcutâneo. Neste mesmo estudo, foram analisadas as expressões relativas de AQP7 nos diferentes depósitos (visceral e subcutâneo), dentro do mesmo grupo de indivíduos. Nos indivíduos controle e sobrepeso, a expressão de AQP7 no depósito subcutâneo foi maior que no visceral. O inverso foi encontrado em indivíduos com DM-2 ou obesidade mórbida. Não foram encontradas diferenças em obesos sem DM-2 (MIRANDA et al., 2010).

Estes resultados em conjunto, somados com aquele que observa expressões diferentes entre os depósitos visceral e subcutâneo (MIRANDA et al., 2010), podem ser explicadas por diferenças funcionais entre os diferentes depósitos, na saúde, ou em condições patológicas. O tecido adiposo subcutâneo apresenta maior lipólise basal do que o visceral, ao passo que este é mais sensível a lipólise induzida por catecolaminas que o subcutâneo (ARNER, 2005). Na obesidade, observa-se uma resistência à lipólise induzida por catecolaminas no depósito subcutâneo, mas não no visceral (ARNER, 2005). O tecido adiposo subcutâneo, por outro lado, apresenta uma diminuição na expressão de AQP7, o que promove um acúmulo de glicerol dentro do adipócito, favorecendo sua hipertrofia (MARRADES et al., 2006; PRUDENTE et al., 2007; CATALÁN et al., 2008).

A ausência de diferenças significativas nas expressões de AQP7 no depósito visceral de eutróficos e obesos de ambos os gêneros sugere que o aumento da saída do glicerol, gerado pelo respectivo aumento da lipólise, não implique necessariamente no aumento da expressão de AQP7 na membrana do adipócito, ou então sugere a necessidade de mais estudos ao nível de expressão de proteína e modificações pós-traducionais até a etapa de transportador funcional de glicerol.

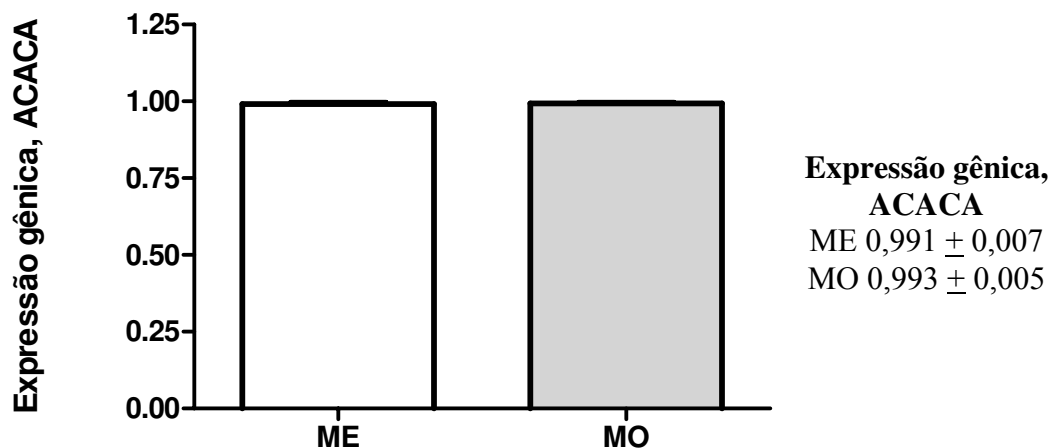
Lipogênese

ACACA

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre a expressão de ACACA em epiplon de mulheres eutróficas (ME) e mulheres obesas (MO) ($p=0,8$) e entre homens obesos (HO) e mulheres

obesas (MO) ($p=0,55$), sendo que mulheres obesas expressam respectivamente 0,2 e 0,99 % a mais que mulheres eutróficas e homens obesos (Figura 6).

a)



b)

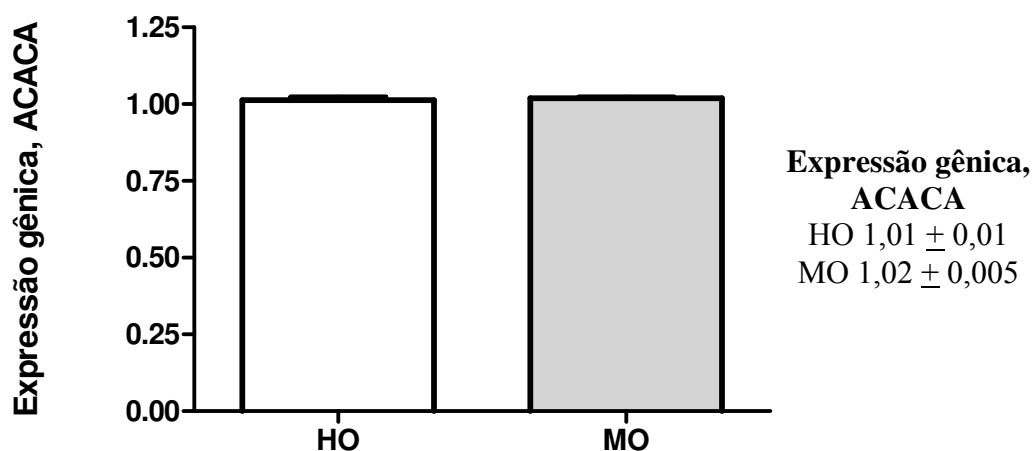


Figura 6- Expressão gênica de ACACA em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, $n=3$) e mulheres obesas (MO, $n=8$); b) expressão gênica em tecido adiposo de homens obesos (HO, $n=4$) e mulheres obesas (MO, $n=8$).

Em nosso estudo, esperávamos uma menor expressão de ACACA no tecido adiposo omental de obesos comparados com eutróficos, de acordo com a maior parte de estudos da literatura. É possível que o número de voluntários não seja suficiente para detectar as diferenças observadas em outros estudos, fato este criticado por Ortega et al. (2010), os quais estudaram a expressão gênica de ACACA

e FAS em 188 amostras de tecido adiposo omental e 49 amostras de tecido adiposo subcutâneo, provenientes de eutróficos e obesos.

Estudos sobre a expressão da ACACA e da FAS na obesidade apresentam alguns resultados contrastantes: porém a maioria deles revela uma diminuição da via lipogênica em indivíduos sobrepeso e obesos, representada por uma diminuição da expressão de RNAm e proteína, e a atividade enzimática de FAS e ACACA (DIRAISON et al., 2002; LETEXIER et al., 2003; SWIERCZYNSKI et al., 2003; MINEHIRA et al., 2004; RANGANATHAN et al., 2006), o que corrobora estudos com camundongos *ob/ob* geneticamente obesos (KOLEHMAINEN et al., 2001).

Do outro lado, estão os estudos que relatam um aumento da via lipogênica em ratos geneticamente obesos (GUICHARD et al., 1992) e o aumento da expressão de ACACA e FAS RNAm em tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos, com e sem DM-2 (BERNDT et al., 2007). Em outro grande estudo, foi observada uma diminuição na expressão de RNAm de ACACA e FAS e da proteína de FAS em tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos sobrepeso, mas principalmente em obesos com e sem DM-2, comparados com eutróficos, sem diferenças, entretanto, entre as expressões gênicas de FAS entre os gêneros. A expressão gênica de ACACA foi correlacionada significativamente com a de FAS em tecido adiposo subcutâneo e omental de homens e mulheres. A expressão de ambas também apresentou correlação negativa significativa com medidas da obesidade, como IMC, % de massa gorda, razão cintura-quadril, pressão sanguínea sistólica, glicose e TAG plasmáticos no jejum (ORTEGA et al., 2010).

A ACACA e a FAS são enzimas-chave no processo de lipogênese, que são estimuladas por hormônios lipogênicos, como a insulina e hormônios tireoideanos. (CLAYCOMBE et al., 1998; KIM, 1997). A insulina é um hormônio que estimula a captação de glicose e o armazenamento energético na forma de TAGs nos adipócitos (GIORGINO et al., 2005). A obesidade abdominal contribui para a resistência à insulina, grandemente atribuída ao aumento de ácidos graxos circulantes (BANERJI et al., 1995; KOYAMA et al., 1997), e as citocinas (DESPRÉS & LIMIEUX, 2006) liberadas pelo tecido adiposo. Os adipócitos resistentes à insulina perdem a capacidade de captar glicose via GLUT-4 e ácidos graxos. Esta diminuição no aporte de glicose intracelular pode ser responsável pela redução da via lipogênica e assim, da expressão gênica das enzimas envolvidas. Outro importante fator a ser considerado é a influência de citocinas inflamatórias, presentes na obesidade, no catabolismo de adipócitos dentre as quais, o TNF- α diminui a expressão de ACC e FAS (KERN et al., 1995).

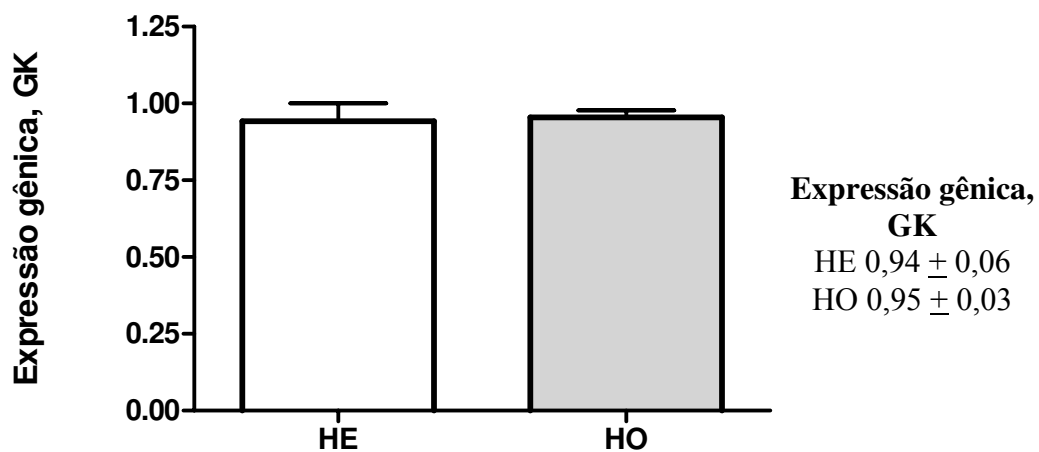
As enzimas lipogênicas são essenciais para o processo de lipogênese, e também para a diferenciação adipocitária (CLAYCOMBE et al., 1998), e portanto requeridas para o acúmulo excessivo de TAGs no tecido adiposo, característico da obesidade. Porém, parece que a partir de certo ponto de inflexão, a capacidade lipogênica é diminuída, o que caracteriza um processo tardio e adaptativo, que limita acúmulo adicional de gordura em um tecido já saturado (DIRAISON et al., 2002; ORTEGA et al., 2010). O aumento da via lipogênica encontrada em alguns estudos pode ser devido à fase de estabelecimento da obesidade (obesidade dinâmica), em que a capacidade máxima de estocagem de lípidos ainda não foi atingida, como nos modelos de ratos Zucker geneticamente obesos (GUICHARD et al., 1992). É possível que nossos voluntários ainda não tenham atingido esse limite máximo de estocagem, o que é sugerido pelo aumento da expressão da LPL, outro integrante da via lipogênica, em mulheres obesas (significativo) e em homens obesos (tendência a aumento portanto, sem significância), como descritos a seguir. Entretanto, mais estudos, funcionais e/ou na expressão ao nível de proteína, modificações pós-traducionais e atividade enzimática são necessários para se confirmar os resultados na expressão gênica de ACC.

Ou então, estes resultados contrastantes podem refletir diferenças no estado nutricional e inflamatório entre os indivíduos analisados (BERNDT et al., 2007), ou então a influência de fatores de exclusão presentes em alguns voluntários.

GK

Em nosso estudo, não encontramos diferenças significativas entre as expressões de GK de homens eutróficos (HE) e homens obesos (HO) ($p=0,81$), e entre mulheres eutróficas (ME) e mulheres obesas (MO) ($p=0,18$) (Figura 7). Homens e mulheres obesos expressam, respectivamente, 1% e 8 % a mais que homens e mulheres eutróficos.

a)



b)

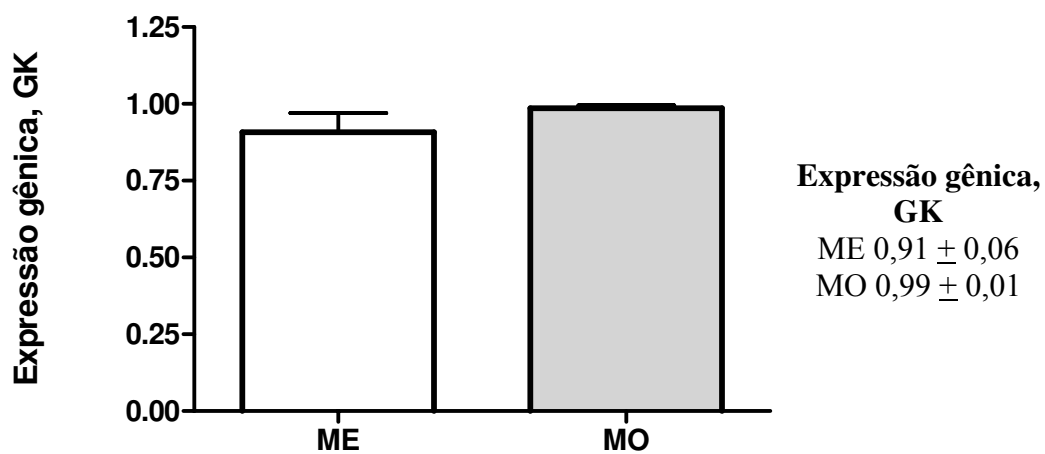


Figura 7- Expressão gênica da GK em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).

Esperávamos detectar maior expressão gênica da GK em obesos, comparados com eutróficos, o que poderia explicar a elevada massa gorda dos obesos, apesar da alta taxa lipolítica, presente no estudo de Francesconi (2008) com adipócitos isolados do epiplon de obesos, e em outros estudos da literatura, além da supressão da via lipogênica, encontrada em dados da literatura, que não foram corroborados pelos nossos resultados.

Neste sentido, várias pesquisas apontam para uma possível relação da GK com a obesidade. Estudos revelaram maior atividade enzimática da GK em tecido adiposo subcutâneo (CHAKRABARTY et al., 1984) e visceral (CHAKRABARTY et al., 1984; TINAHONES et al., 2010) de humanos obesos, em relação aos eutróficos. Esta atividade enzimática foi correlacionada negativamente com a perda de peso destes obesos após a gastroplastia. Sugeriu-se então que a GK estaria relacionada à dificuldade de perda de peso nestes pacientes, já que eles tenderiam a reutilizar o glicerol liberado na lipólise (CHAKRABARTY et al., 1984). Estudos com adipócitos isolados de modelos animais geneticamente obesos, como camundongos obesos ob/ob (TREBLE & MAYER, 1963; THENEN & MAYER, 1975) e diabéticos db/db (THENEN & MAYER, 1975), também detectaram maior atividade da GK, comparada ao controle eutrófico, o que foi relacionado a maior capacidade de retenção de TAGs e conseqüentemente, ao desenvolvimento da obesidade (TREBLE & MAYER, 1963). Em tecido adiposo subcutâneo e marrom de ratos, foi demonstrada a sensibilidade da GK ao estímulo lipogênico da insulina (PERSICO et al., 1975). Entretanto, outros estudos, com camundongos ob/ob (WELTON et al., 1973) e com ratos Zucker fa/fa (MARTIN & LAMPREY, 1975; THENAN & MAYER, 1975), ou com tecido adiposo subcutâneo de obesos mórbidos (TINAHONES et al., 2010), dentre outros, não encontraram a relação da GK com a obesidade.

Em condições fisiológicas normais, no entanto, o papel da GK no tecido adiposo parece inexpressivo. Neste contexto, assumem-se dois princípios importantes: 1) no estado alimentado, os adipócitos não podem utilizar o glicerol, e, portanto, a síntese de TAGs depende da glicose; 2) no jejum, o glicerol e os ácidos graxos liberados na lipólise são utilizados pelo fígado e músculo, ao invés de participarem de um ciclo “fútil” de reutilização, para ressintetização de TAGs no tecido adiposo (GUAN et al., 2002). Porém, alterações causadas por tratamento com tiazolidinonas (hipoglicemiante oral para o tratamento de DM-2) e a própria obesidade parecem modificar esse quadro. Alguns pacientes, com DM-2 haviam tomado este medicamento, o que poderia recrudescer este processo já acionado pela obesidade, descrito a seguir.

As tiazolidinonas aumentam a sensibilidade periférica à insulina pois reduz os ácidos graxos livres circulantes, os quais prejudicam a ação da insulina em músculo esquelético, e outros tecidos-alvo (BODEN, 2001). A redução dos ácidos graxos livres circulantes deve-se ao aumento da expressão e atividade da GK estimuladas por tiazolidinonas, via receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama PPAR γ (GUAN et al., 2002). Assim, a GK estimula a incorporação de glicerol ao TAG, o que reduz a liberação de ácidos graxos livres pelo adipócito. Da mesma forma, a maior expressão de GK na

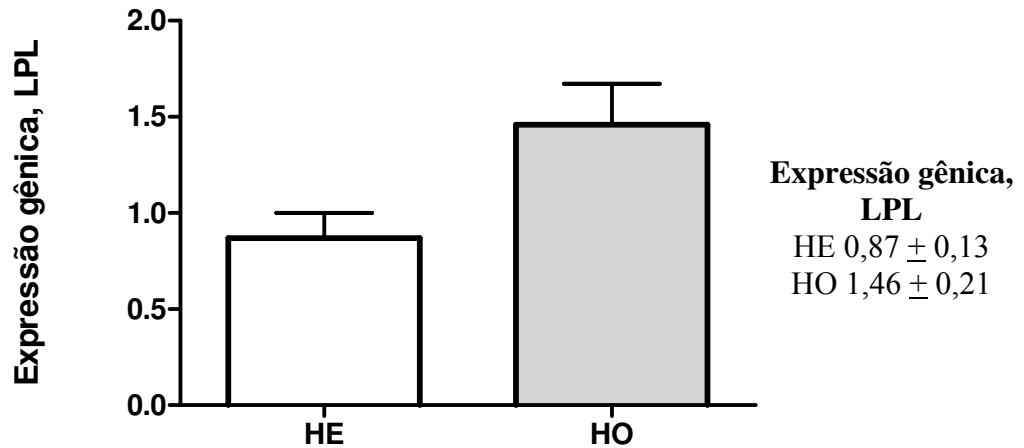
obesidade pode ser explicada pela ativação do PPAR- γ por elevadas concentrações de ácidos graxos livres, o que caracteriza um mecanismo de *feedback* negativo, em que altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres diminuem a liberação dos mesmos pelos adipócitos. Porém, este mecanismo seria incapaz de normalizar as concentrações de ácidos graxos circulantes na obesidade, o que pode ser potencializado pelo uso de tiazolidinonas (GUAN et al., 2002).

Mais estudos, portanto, concernentes à expressão ao nível da proteína, modificações pós-traducionais, e atividade enzimática, se fazem necessários para se definir melhor este processo.

LPL

No presente estudo, detectamos uma diferença significativa na expressão gênica de LPL em tecido adiposo visceral de mulheres eutróficas (ME) e mulheres obesas (MO). Mulheres obesas (MO) expressam 66% a mais que mulheres eutróficas (ME) ($p=0,009$), enquanto que homens obesos (HO) expressam 68% a mais que homens eutróficos (HE), porém sem significância ($p=0,17$) (Figura 8).

a)



b)

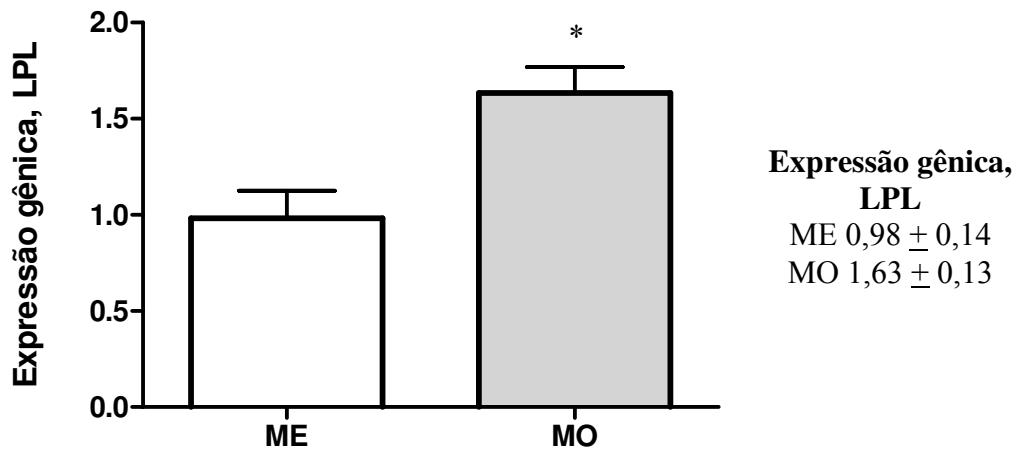


Figura 8- Expressão gênica da LPL em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=5) e mulheres obesas (MO, n=8). * $p < 0,05$

Esperávamos, no entanto, uma diminuição na expressão da LPL na obesidade, o que corroboraria estudos da literatura, que defendem uma supressão das vias lipogênicas (VIRTUE & VIDAL-Puig, 2010; PONTIGO et al., 2011). A diminuição da captação de ácidos graxos mediada pela LPL também poderia explicar o aumento destes no sangue de obesos (LAFONTAN & LANGIN, 2009).

Greenwood (1985) postulou que um aumento da razão entre as atividades enzimáticas de LPL em tecido adiposo e músculo esquelético dirige os ácidos graxos livres predominantemente ao tecido adiposo, o que resulta em acúmulo excessivo de gordura e obesidade. Esta razão pode ser diminuída por exercícios físicos, os quais aumentam atividade de LPL em músculo esquelético (KERN, 1997).

Em alguns estudos com humanos e roedores obesos, a expressão de LPL em tecido adiposo esteve aumentada, quando expressa por célula (SCHWARTZ & BRUNZELL, 1981; GREENWOOD et al., 1982; SADUR et al., 1984; ECKEL & YOST, 1987; BESSESEN et al., 1991); porém a resposta da LPL à insulina e ao alimento pareceu estar diminuída na obesidade (HARTMAN, 1981; SADUR et al., 1984; TERRETTAZ et al., 1994).

Por outro lado, a expressão e atividade de LPL não apresentaram redução, ou até teve aumento em tecido adiposo de humanos e roedores obesos, que sofreram uma redução de peso (HARTMAN, 1981; ECKEL & YOST, 1987; KERN et al., 1990; BESSESEN et al., 1991; TERRETTAZ et al., 1994), provavelmente devido ao aumento de sensibilidade à insulina (KERN, 1997). Deste modo, tem sido proposto que a LPL do tecido adiposo representa um fator do adipócito que limita a sua redução por dieta hipocalórica (KERN, 1997). Em outro estudo, houve ainda diminuição da expressão da LPL em tecido adiposo subcutâneo e visceral em obesos; a intensidade desta diminuição esteve relacionada ao grau de obesidade, relação mais evidente no depósito visceral. Esta diminuição está mais relacionada à hipertrofia e à hiperplasia dos adipócitos, do que à resistência à insulina (PONTIGO et al., 2011).

A enzima LPL é de grande importância no desenvolvimento da obesidade, uma vez que fornece a maior parte dos ácidos graxos livres requeridos no processo de lipogênese, e, portanto é essencial para o acúmulo excessivo de TAGs, característico da obesidade. Entretanto, a diversidade nos resultados concernentes a expressão gênica da LPL em tecido adiposo pode ser explicada pela fase em que a obesidade é analisada. Em condições normais, o excedente de calorias é estocado no tecido adiposo, o qual, por sua vez, aumenta de tamanho, devido aos processos de hipertrofia e hiperplasia. A partir de certo ponto, porém o tecido adiposo parece alcançar um limite de estocagem de gordura, a partir do qual perde sensibilidade à insulina, e suprime as vias lipogênicas, das quais a LPL faz parte (VIRTUE & VIDAL-Puig, 2010; PONTIGO et al., 2011). A diminuição da expressão gênica da FAS e da ACACA também fortalece esta teoria.

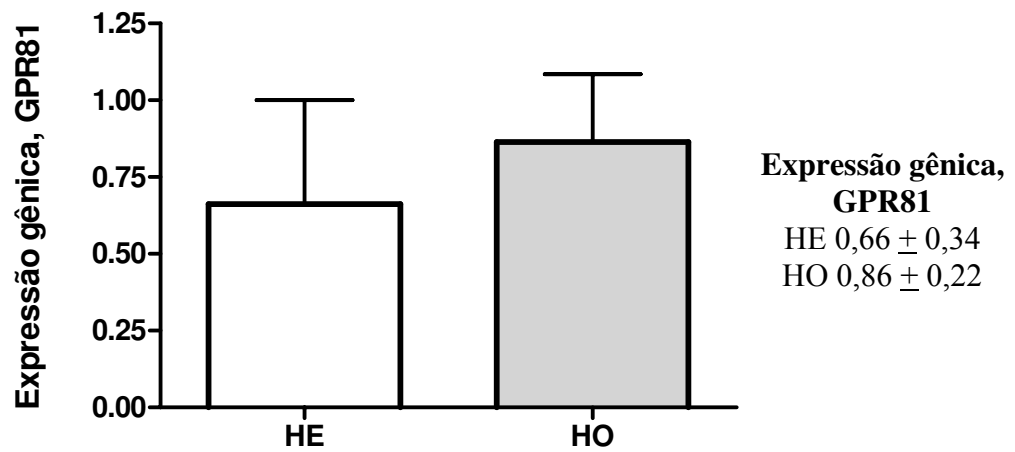
Particularmente, neste estudo, a grande maioria dos indivíduos obesos não apresenta resistência à insulina (1 homem dentre 5 e 2 mulheres dentre 8), e o ponto máximo de estocagem de lipídeos talvez ainda não tenha sido alcançado, o que pode explicar um aumento na expressão gênica de LPL, e a ausência de significância nas expressões gênicas de ACACA entre eutróficos e obesos. A maior expressão gênica de LIPE e de LPL no grupo de mulheres obesas justifica o motivo do aumento de

captação de AGLs, sem o devido aumento no tamanho de seus adipócitos. Por outro lado, o tecido adiposo proveniente de homens não apresentou diferenças nas expressões gênicas de LIPE, talvez devido ao pequeno número de voluntários, sendo que obesos mostram uma tendência ($p=0,17$) a expressarem mais LPL, o que justificaria seus adipócitos maiores. Estudos concernentes à expressão ao nível da proteína, modificações pós-traducionais, e atividade enzimática, se fazem necessários para se definir melhor este processo.

GPR81

No presente estudo, esperávamos uma diminuição da GPR81, pois encontramos ambos processos antagônicos, lipólise e lipogênese em adipócitos isolados de epiplon de obesos mórbidos, sugerindo alterações no processo de inibição da lipólise pela GPR81 e lactato. Porém não detectamos diferenças significativas entre as expressões de GPR81 de homens eutróficos (HE) e mulheres eutróficas (ME) e entre homens obesos (HO) ($p=0,63$) e mulheres obesas (MO) ($p=0,91$). Homens obesos expressam 30% a mais que homens eutróficos e mulheres obesas expressam 3% a menos que mulheres eutróficas (Figura 9).

a)



b)

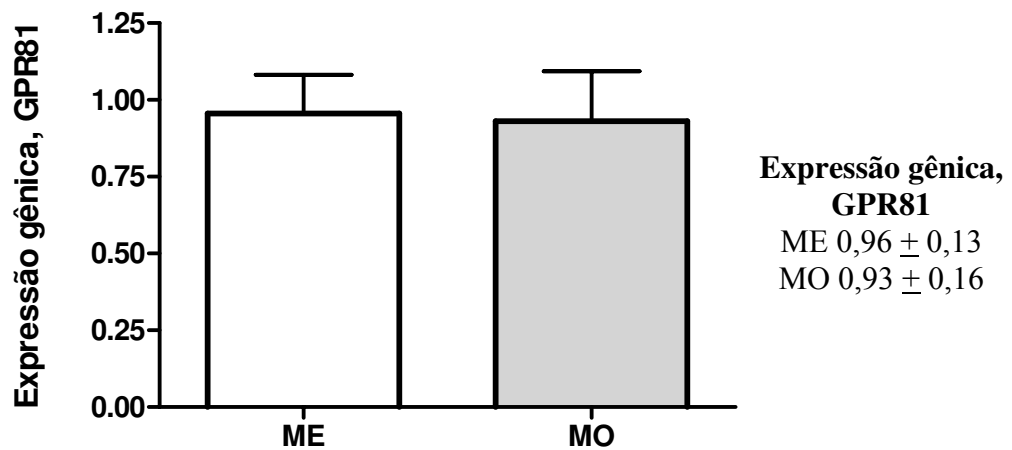


Figura 9- Expressão gênica de GPR81 em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n= 4); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=8).

Certas características do tecido adiposo na obesidade podem explicar este fenômeno. O tecido adiposo na obesidade é caracterizado por uma hipóxia local (PASSARICA et al., 2009; PASSARICA et al., 2010). Estudos com cultura celular revelam que o estado de hipóxia aumenta a captação de glicose via GLUT 1 (WOOD et al., 2007), seguida de aumento da liberação de lactato (PÉREZ et al., 2010), o qual espera-se ser preditor da inibição da lipólise. Porém a hipóxia em si (REGAZETTI et al.,

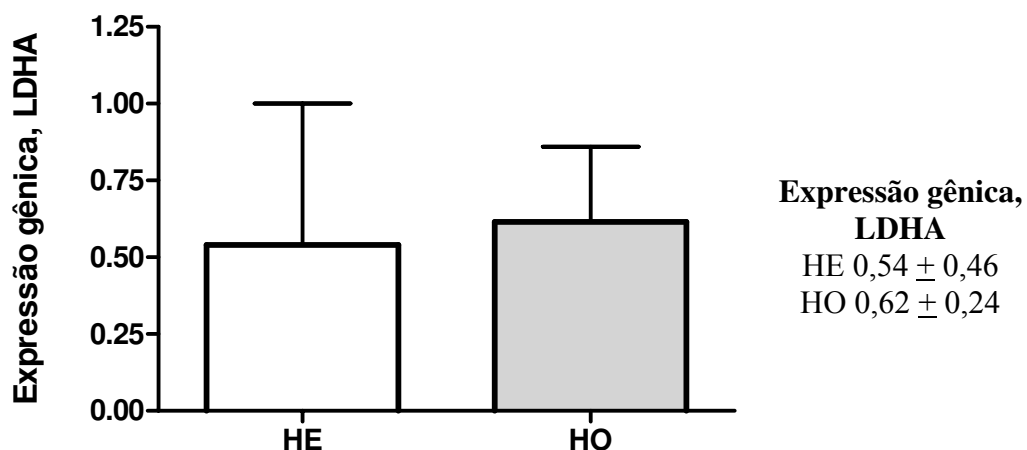
2009; YIN et al., 2009), além de outros fatores, como altas concentrações circulantes de ácidos graxos livres (BANERJI et al., 1995; KOYAMA et al., 1997) e adipocinas inflamatórias (DESPRÉS & LIMIEUX, 2006), contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina. A diminuição da sensibilidade à insulina prejudicaria a regulação anti-lipolítica deste hormônio via lactato, o que pode explicar o aumento da lipólise estimulada nos adipócitos, e o conseqüente aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, concomitante à hiperlactatemia, na circulação do obeso. Poucos estudos sobre expressão de GPR81 têm sido realizados, porém em pesquisas com microarray notou-se diminuição da expressão gênica de GPR81 em adipócitos isolados de humanos expostos a condições inflamatórias, condicionadas por macrófagos (O'HARA et al., 2009), o que reforça a alteração dos efeitos anti-lipolíticos da insulina na obesidade.

Lactatogênese

LDHA

No presente estudo, não encontramos diferenças significativas entre as expressões gênicas de homens eutróficos (HE) e homens obesos (HO) ($p=0,88$) e mulheres eutróficas (ME) e mulheres obesas (MO) ($p=0,66$). Homens obesos expressam 15% a mais que homens eutróficos e mulheres obesas expressam 6% a mais que mulheres eutróficas (Figura 10).

a)



b)

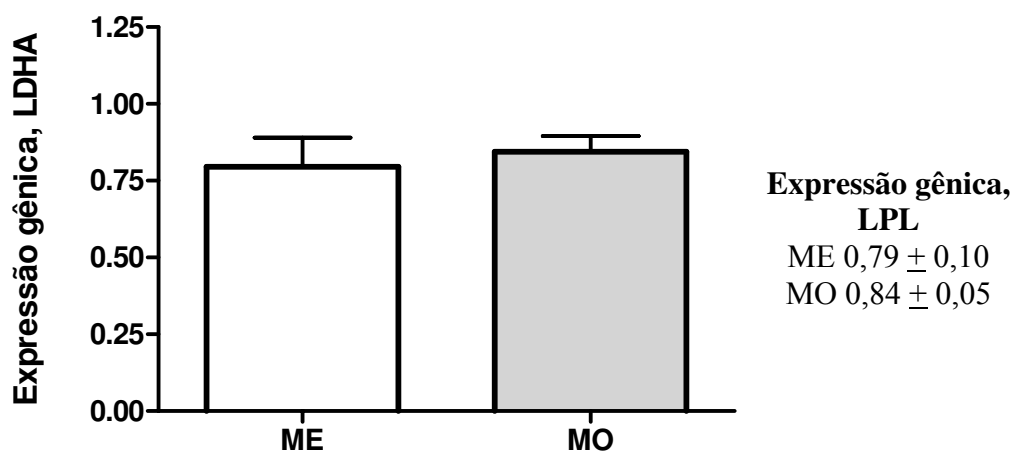


Figura 10- Expressão gênica de LDHA em tecido adiposo da região do epiplon de humanos. a) expressão gênica em tecido adiposo de homens eutróficos (HE, n=2) e homens obesos (HO, n=5); b) expressão gênica em tecido adiposo de mulheres eutróficas (ME, n=6) e mulheres obesas (MO, n=6).

Esperávamos, no entanto, que esta diferença fosse significativa, uma vez que encontramos uma hiperlactatemia no jejum de obesos mórbidos, e aumento do lactato basal liberado pelos adipócitos isolados destes mesmos obesos, no estudo de Francesconi (2008), sugerindo um aumento no processo de lactatogênese, e conseqüentemente, aumento da expressão gênica e/ou atividade enzimática da lactato desidrogenase.

Em estudo com ratos alimentados com dieta de cafeteria, detectou-se uma diminuição da expressão gênica da LDH-A no tecido adiposo visceral. Isto sugere uma diminuição da degradação

anaeróbica da glicose, em que o piruvato, ao invés de ser convertido a lactato, é direcionado para a síntese de acetil-CoA, e por fim, de triacilgliceróis (LOPEZ et al., 2004). Entretanto, tem sido constatado que, a longo prazo, há uma ativação e uma superexpressão de LDH-A em adipócitos diferenciados, que portanto age contra o acúmulo de TAGs, dirigindo o piruvato para a síntese de lactato (SOUKAS et al., 2001; GERHOLD et al., 2002).

Ou seja, na obesidade, o tecido adiposo atinge certo limite de estocagem de TAGs, a partir do qual, parece diminuir sua sensibilidade à insulina, assim como as vias lipogênicas, dirigindo a glicose para a lactatogênese. Como no presente estudo, as vias lipogênicas parecem não estar suprimidas, devido à ausência de diferenças significativas na expressão de ACC entre eutróficos e obesos de ambos os gêneros e devido ao aumento na expressão da LPL em mulheres obesas, sugerimos que o aumento da lactatogênese ocorra anteriormente ao limite de estocagem máxima atingido pelos adipócitos. Sugerimos também que o aumento da lactatogênese (FRANCESCONI, 2008), não dependa de alterações na expressão da LDHA. Indicamos, portanto, mais estudos concernentes à expressão ao nível da proteína, modificações pós-traducionais, e atividade enzimática talvez mais relevantes para a lactatogênese.

5. CONCLUSÕES:

Neste trabalho, com as condições e população estudada, podemos indicar as seguintes conclusões: os adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens obesos é morfométricamente maior do que os de eutróficos, tendo como provável fator o aumento da expressão de LPL sem ser acompanhado de alterações na expressão de LIPE, analisado no panículo adiposo visceral. Por outro lado, os adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres obesas não apresentaram alterações morfométricas quando comparados aos adipócitos isolados de eutróficas, estes resultados são explicados pela análise da expressão dos genes LPL e LIPE do tecido adiposo desta região que se apresentou significativamente elevada em obesas. Desta forma, para este tecido estudado, a expressão de genes relacionados à lipólise e a lipogênese em obesos é dependente do gênero, o que deve ser considerado para estudos futuros sobre a obesidade. Estes resultados não foram acompanhados de qualquer alteração na expressão da LDHA, relacionada a lactatogênese.

Perspectivas

Estudos relacionados a quantificação de proteínas e atividade das enzimas estudadas podem melhor embasar as alterações metabólicas na obesidade, identificando diferenças regionais e possíveis interferências hormonais. O aumento substancial no número de voluntários podem minimizar muitas das variáveis comuns em pesquisas realizadas com humanos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSLAND, A., CHINKES, D., WOLFE, R.R. Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am. J. Clin. Nutr.*, (65): 1774–1782, 1997.
- AGRE, P. Aquaporin water channels (Nobel lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, (43): 4278–4290, 2004.
- AHIMA, R.S. & FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.*, (11): 327-332, 2000.
- AHMED, K., TUNARU, S., TANG, C., MÜLLER, M., GILLE, A., SASSMANN, A., HANSON, J., OFFERMANN, S. An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab.*, (11): 311–319, 2010.
- AIELLO, L. & KEY, C. Energetic consequences of being a Homo erectus female. *American Journal of Human Biology*, (14): 551–565, 2002.
- ALMEIDA, J. Captação Periférica de Glicose em modelo de estresse induzido por choque nas patas. Tese de Doutorado em Fisiologia – Curso de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, 2008.
- ANDERSON, L.A., MCTERNAN, P.G., BARNETT, A.H., KUMAR, S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (86): 5045–5051, 2001.
- ARNER, E., WESTERMARK, P.O., SPALDING, K.L., BRITTON, T., RYDÉN, M., FRISÉN, J., BERNARD, S., ARNER, P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, (59): 105-109, 2010.
- ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*,(19): 471–482, 2005.

- BANERJI, M.A., CHAIKEN, R.L., GORDON, D., KRAL, J.G., LEBOVITZ, H.E. Does intra-abdominal adipose tissue in black men determine whether NIDDM is insulin resistant or insulin-sensitive?. *Diabetes*, (44): 141-46, 1995.
- BARANOVA, A., COLLANTES, R., GOWDER, S.J., ELARINY, H., SCHLAUCH, K., YOUNOSZAI, A., KING, S., RANDHAWA, M., PUSULURY, S., ALSHEDDI, T., ONG, J.P., MARTIN, L.M., CHANDHOKE, V., YOUNOSSI, Z.M. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obesity Surgery*, (15): 758-765, 2005.
- BERNDT, J., KOVACS, P., RUSCHKE, K., KLÖTING, N., FASSHAUER, M., SCHÖN, M.R., KÖRNER, A., STUMVOLL, M., BLÜHER, M. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, (50): 1472–1480, 2007.
- BESSESEN, D.H., ROBERTSON, A.D., ECKEL, R.H. Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (261): 246–251, 1991.
- BEZAIRE, V., MAIRAL, A., RIBET, C., LEFORT, C., GIROUSSE, A., JOCKEN, J., LAURENCIKIENE, J., ANESIA, R., RODRIGUEZ, A.M., RYDEN, M., STENSON, B.M., DANI, C., AILHAUD, G., ARNER, P., LANGIN, D. Contribution of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase to lipolysis in human hMADS adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 284 (27): 18282-18291, 2009.
- BJORNTORP, P. & KARLSSON, M. Triglyceride synthesis in human subcutaneous adipose tissue cells of different size. *Eur. J. Clin. Invest.*, (1): 112–117, 1970.
- BJÖRNTORP, P., KARLSSON, M., PERTOFT, H., PETTERSSON, P., SJÖSTRÖM, L., SMITH, U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J. Lipid. Res.*, (19): 316–324, 1978.
- BODEN, G. Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* (30): 801–815, 2001.

- BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, (46): 3–10, 1997.
- BOIVIN, A., BROCHU, G., MARCEAU, S., MARCEAU, P., HOULD, F.S., TCHERNOF, A. Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 56 (4): 533-540, 2007.
- BOUGNÈRES, P., STUNFF, C.L., PECQUEUR, C., PINGLIER, E., ADNOT, P., RICQUIER, D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine: a new feature of childhood onset obesity. *J. Clin. Invest.*, (99): 2568–2573, 1997.
- BRASAEMLE, D.L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid. Res.*, (48): 2547–2559, 2007.
- BROWNSEY, R.W., BOONE, A.N., ELLIOTT, J.E., KULPA, J.E., LEE, W.M. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.*, (34): 223–227, 2006.
- CAMPFIELD, L.A., SMITH, F.J., GUISEZ, Y., DEVOS, R., BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, (269): 546–549, 1995.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.*, (84): 277-359, 2004.
- CARLSON, B.A. & KINGSTON, J.D. Docosahexaenoic acid, the aquatic diet, and hominin encephalization: difficulties in establishing evolutionary links. *Am. J. Hum. Biol.*, 19 (1): 132-141, 2007.
- CARMODY, R.N. & WRANGHAM, R.W. The energetic significance of cooking. *J. Hum. Evol.*, 57(4): 379-391, 2009.
- CATALÁN, V., GÓMEZ-AMBROSI, J., PASTOR, C., ROTELLAR, F., SILVA, C., RODRÍGUEZ, A., GIL, M.J., CIENFUEGOS, J.A., SALVADOR, J., VENDRELL, J., FRÜHBECK, G.

Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver. *Obes. Surg.*, (18): 695–701, 2008.

CEPERUELO-MALLAFRÉ, V., MIRANDA, M., CHACÓN, M.R., VILARRASA, N., MEGIA, A., GUTIÉRREZ, C., FERNÁNDEZ-REAL, J.M., GÓMEZ, J.M., CAUBET, E., FRÜHBECK, G., VENDRELL, J. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (92): 3640–3645, 2007.

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): 609-622, 1984.

CHASCIONE, C., ELWYN, D.H., DAVILA, M., GIL, K.M., ASKANAZI, J., KINNEY, J.M. Effect of carbohydrate intake on de novo lipogenesis in human adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, (253): 664–669, 1987.

CHUMLEA, W.C., ROCHE, A.F., SIERVOGEL, R.M., KNITTLE, J.L., WEBB, P. Adipocytes and adiposity in adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, (34): 1798–1803, 1981a.

CHUMLEA, W.C., KNITTLE, J.L., ROCHE, A.F., SIERVOGEL, R.M., WEBB, P. Size and number of adipocytes and measures of body fat in boys and girls 10 to 18 years of age. *Am. J. Clin. Nutr.*, (34): 1791–1797, 1981b.

CLAYCOMBE, K.J., JONES, B.H., STANDRIDGE, M.K., GUO, Y., CHUN, J.T., TAYLOR, J.W., MOUSTAÏD-MOUSSA, N. Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am. J. Physiol.*, (274): 1253–1259, 1998.

CLEMENTE-POSTIGO, M., QUEIPO-ORTUÑO, M.I., FERNANDEZ-GARCIA, D., GOMEZ-HUELGAS, R., TINAHONES, F.J., CARDONA F. Adipose Tissue Gene Expression of Factors Related to Lipid Processing in Obesity. *Plos One*, 6 (9):1-8, 2011.

CLUTTON-BROCK, T. H., ALBON, S.D., GUINNESS, F.E. Fitness costs of gestation and lactation in wild mammals. *Nature*, (337): 260–262, 1989.

COOKE, P.S. & NAAZ, A. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Experimental Biology and Medicine*, (229): 1127-1135, 2004.

- COPPACK, S.W., JENSEN, M.D., MILES, J.M. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid. Res.*, (35): 177–193, 1994.
- CORDAIN, L., EATON, S.B., SEBASTIAN, A., MANN, N., LINDEBERG, S., WATKINS, B.A., O'KEEFE, J.H., BRAND-MILLER, J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81 (2): 341-354, 2005.
- CONE, R.D. The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.*, (10): 211-216, 1999.
- CRANDALL, D. L., FRIED, S.K., FRANCENDESE, A.A., NICKEL, M., DIGIROLAMO, M. Lactate release in isolated rat adipocytes: Influence of cell size, glucose concentration, insulin and epinephrine. *Horm. Metab. Res.*, (15): 326-329, 1983.
- CREGE, D.R.X.O. Implantação da técnica de estudo funcional de adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos e quantificação da produção de lactato. Dissertação de Mestrado em Fisiologia – Curso de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, 2007.
- CURI, R., POMPÉIA, C., MYASAKA, C.K., PROCOPIO, J. Entendendo a Gordura: Os Ácidos Graxos. 1ª ed. Manole: São Paulo, 2002.
- DEACON, T. The symbolic species: the co-evolution of language and the human brain. 1ª ed. Penguin Books: London, 1998.
- DEGERMAN, E., LANDSTRÖM, T.R., WIJKANDER, J., HOLST, L.S., AHMAD, F., BELFRAGE, P., MANGANIELLO, V. Phosphorylation and activation of hormonesensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods*, (14): 43–53, 1998.
- DEGERMAN, E., BELFRAGE, P., MANGANIELLO, V.C. Structure, localization and regulation of cGMPinhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.*, (272): 6823-6826, 1997.
- DESPRÉS JP & LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, (444) : 881– 887, 2006.

- DESPRÉS, J.P. The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes. Res.*, (6) : 8-17, 1998.
- DIAMOND J. Guns Germs and Steel. The fates of human societies. W.W.Norton & Company Ltd: New York, 1999.
- DIGIROLAMO, M., NEWBY, F.D., LOVEJOY, J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *The Faseb Journal*, (6): 2405-2412, 1992.
- DIGIROLAMO, M. Metabolic alterations and lactate overproduction in insulin-resistance states. In: *Advances in experimental medicine and biology*. Ed. Jacobs MM. New York: Plenum Press, p. 203-210, 1994.
- DIRAISON, F. DUSSERRE, E., VIDAL, H., SOTHIER, M., BEYLOT, M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (282): 46-51, 2002.
- DOLE, V. P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.*, (35): 150-154, 1956.
- DRENT, M., COBBEN, N.A., HENDERSON, R.F., WOUTERS, E.F., VAN DIEIJEN-VISSER, M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur. Respir. J.*, (9): 1736–1742, 1996.
- DROLET, R., RICHARD, C., SNIDERMAN, A.D., MAILLOUX, J., FORTIER, M., HUOT, C., RHÉAUME, C., TCHERNOF, A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in
- ECKEL, R.H. & YOST, T.J. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J. Clin. Invest.*, (80): 992–997, 1987.
- ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.*, (320): 1060–1068, 1989.
- EGGER, G. The case for using waist to hip ratio measurements in routine medical checks. *Med. J. Aust.*, (156): 280-285, 1992.

- ENGELI, S., SCHLING, P., GORZELNIAK, K., BOSCHMANN, M., JANKE, J., AILHAUD, G., TEBOUL, M., MASSIÉRA, F., SHARMA, A.M. The adipose- tissue renin-angiotensin-aldosterone system: Role in the metabolic syndrome? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, (35): 807–825, 2003
- EVANS, K., BURDGE, G.C., WOOTTON, S.A., CLARK, M.L., FRAYN, K.N. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* (51): 2684–2690, 2002.
- FAINTRENIE, G. & GÉLOËN, A. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 277 (1): 235-238, 1996.
- FAINTRENIE, G. & GÉLOËN, A. Alpha1-adrenergic agonist stimulates glucose uptake in rat white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (286): 607-610, 1998.
- FARIAS-SILVA E., DOS SANTOS, I.N., COREZOLA DO AMARAL, M.E., GRASSI-KASSISSE, D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Glucocorticoid receptor and beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1018): 328-332, 2004.
- FARIAS-SILVA, E., SAMPAIO-BARROS, M.M. AMARAL, M.E.C., CARNEIRO, E.M., BOSCHERO, A.C., GRASSI-KASSISSE, D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C., Insulin subsensitivity following footshock stress. *Can. J. Physiol.Pharmacol.* 80 (8): 783-789, 2002.
- FARIAS-SILVA, E. GRASSI-KASSISSE, D.M., WOLF-NUNES, V., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β - adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. Lip. Res.*, 40 (9): 1719-1727, 1999.
- FARNIER, C., KRIEF, S., BLACHE, M., DIOT-DUPUY, F., MORY, G., FERRE, P., BAZIN, R. The signaling pathway for β 1-integrin/ERKs is involved in the adaptation of adipocyte functions to cell size. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (973): 594–597, 2002.
- FASSHAUER, M., KRIEF, S., BLACHE, M., DIOT-DUPUY, F., MORY, G., FERRE, P., BAZIN, R. Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNF α , and dexamethasone. *Horm. Metab. Res.*, (35): 222–227, 2003.

- FAWCETT, L.R., WAECHTER, A.S., WILLIAMS, L.B., ZHANG, P., LOUIE, R., JONES, R., INMAN, M., HUSE, J., CONSIDINE, R.V. Tumor necrosis factor- α inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocyte from morbidly obese humans. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, (85): 530-535, 2000.
- FLATT, J. P., & BALL, E. G. Studies on the metabolism of adipose tissue. XV. An evaluation of the major pathways of glucose catabolism as influenced by insulin and epinephrine *J. Biol. Chem.*, (239): 675-685, 1964.
- FLECHTNER, M. JENKINSON, C.P., ALT, A., BIESALSKI, H.K., ADLER, G., DITSCHUNEIT, H.H. Studies of phosphodiesterase effects on adipose tissue metabolism in obese subjects by the microdialysis technique. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56 (3): 355-368, 2005.
- FOLEY, R. A. The influence of seasonality on human evolution. In: Seasonality and human ecology, (eds. S. J. Ulijaszek and S. S. Strickland), Cambridge: Cambridge University Press, p. 17–37, 1993.
- FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M.I., LIMA, F.B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulado do Metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 50 (2): 216-229, 2006.
- FOSTER, D. W. From glycogen to ketones-and back. *Diabetes*, (33): 1188-1199, 1984.
- FRANCESCONI, E.P.M.S. Caracterização farmacológica e funcional dos subtipos de adrenoreceptores $\alpha 1$ envolvidos na produção de lactato em adipócitos isolados de tecido adiposo humano. Tese de Doutorado em Fisiologia –Curso de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, 2008.
- FRANCESCONI, E.P.M.S., CREGE, D.R.X.O., ALMEIDA, J., CHAIN, E.A., MUSCELLI, E., SILVEIRA, H.J.V., PAREJA, J.C., SPADARI-BRATFISCH, R.C., GÉLÖEN, A., GRASSI-KASSISSE, D.M. Lactate and glycerol concentration in primary culture of isolated adipocytes from lean and obese patients. FESBE. 2006.
- FRAYN, K.N. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc. Nutr. Soc.*, (60): 375–380, 2001.

- FREDRIKSON, G., TORNVIST, H., BELFRAGE, P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, (876): 288–293, 1986.
- GALIC, S. OAKHILL, J.S., STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrin organ. *Molecular and cellular endocrinology*, (316): 129-139, 2010.
- GASIC, S., TIAN, B., GREEN, A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J. Biol. Chem.*, (274): 6770–6775, 1999.
- GERHOLD, D.L., LIU, F., JIANG, G., LI, Z., XU, J., LU, M., SACHS, J.R., BAGCHI, A., FRIDMAN, A., HOLDER, D.J., DOEBBER, T.W., BERGER, J., ELBRECHT, A., MOLLER, D.E., ZHANG, B.B. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator- activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology*, (143): 2106–2118, 2002.
- GETHER U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* (21): 90-113, 2000.
- GIORGINO, F., LAVIOLA, L., ERIKSSON, J.W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from *in vivo* and *in vitro* studies. *Acta Physiol. Scand.*, (183): 13-30, 2005.
- GOLDBERG, I.J. & MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci.*, (6): 388–405, 2001.
- GOOSSENS, G.H., BLAAK, E.E., VAN BAAK, M.A. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes. Rev.* (4): 43–55, 2003
- GORDON, S. R. JR. & CHERKER, A. Unesterified fatty acids in human blood plasma. *J. Clin. Invest.*, (35): 206-212, 1956.
- GRANNEMAN, J.G., MOORE, H.P., GRANNEMAN, R.L., GREENBERG, A.S., OBIN, M.S., ZHU, Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, (282): 5726–5735, 2007.

- GRASSI-KASSISSE, D.M. & GÉLOËN, A. Caractérisation du sous-type des récepteurs alpha-adrenergiques des adipocytes blancs, *GERLI, Toulouse*, 4-5 may, 2000.
- GREENWOOD, M.R. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int. J. Obes.*, 9 (1): 67-70, 1985.
- GREENWOOD, M.R., MAGGIO, C.A., KOOPMANS, H.S., SCLAFANI, A. Zucker fafa rats maintain their obese body composition ten months after jejunoileal bypass surgery. *Int. J. Obes.*, (6): 513–525, 1982.
- GRUNDY, S.M., BREWER, H.B.JR., CLEEMAN, J.I., SMITH, S.C. JR., LENFANT, C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, (109): 433– 438, 2004.
- GUAN, H.P., LI Y, JENSEN, M.V., NEWGARD, C.B., STEPPAN, C.M., LAZAR, M.A. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nature*, 8 (10): 1122-1128, 2002.
- GUICHARD, C., LI, Y., JENSEN, M.V., NEWGARD, C.B., STEPPAN, C.M., LAZAR, M.A. Genetic regulation of fatty acid synthetase expression in adipose tissue: overtranscription of the gene in genetically obese rats. *J. Lipid. Res.*, (33): 679–687, 1992.
- GUO, S. S., CHUMLEA, W.C., ROCHE, A.F., SIERVOGEL, R.M. Age- and maturity-related changes in body composition during adolescence into adulthood: the Fels longitudinal study. *Appl. Radiat. Isot.*, (49): 581–585, 1998.
- HAARBO J., MARSLEW, U., GOTFREDSEN, A., CHRISTIANSEN, C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* (40):1323–1326, 1991.
- HAGSTRÖM-TOFT, E., ARNER, P., UNGERSTEDT, U., BOLINDER, J. Subcutaneous adipose tissue: a source of lactate production after glucose ingestion in humans. *Am. J. Physiol.*, (258): 888-893, 1990.

- HAGSTRÖM-TOFT, E., ARNER, P., WAHRENBERG, H., WENNLUND, A., UNGERSTEDT, U., BOLINDER, J. Adrenergic regulation of human adipose tissue metabolism in situ during mental stress. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76 (2): 392, 1993.
- HALAAS, J.L., GAJIWALA, K.S., MAFFEI, M., COHEN, S.L., CHAIT, B.T., RABINOWITZ, D., LALLONE, R.L., BURLEY, S.K., FRIEDMAN, J.M. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, (269): 543–546, 1995.
- HALL, J.E., HENEGAR, J.R., DWYER, T.M., LIU, J., DA SILVA, A.A., KUO, J.J., TALLAM, L. Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv. Ren. Replace Ther.*, (11): 41–54, 2004.
- HALLER, H., LEONHARDT, W., HANEFELD, M., JULIUS, U. Relationship between adipocyte hypertrophy and metabolic disturbances. *Endocrinologie*, (74): 63–72, 1979.
- HARA-CHIKUMA, M. & VERKMAN, A.S. Physiological roles of glycerol- transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell Mol. Life Sci.*, (63): 1386–1392, 2006.
- HARTMAN, A.D. Lipoprotein lipase activities in adipose tissues and muscle in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (241): 108–115, 1981.
- HASEGAWA, M., TANG, Y., OSAWA, H., ONUMA, H., NISHIMIYA, T., OCHI, M., TERAUCHI, Y., KADOWAKI, T., MAKINO, H. Differential regulation of gene expression and insulin-induced activation of phosphodiesterase 3B in adipocytes of lean insulin-resistant IRS-1 (-/-) mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, (58): 79-85, 2002.
- HATORE, E.T. Efeito da intensidade do estresse em sobre marcadores metabólicos. Dissertação de Mestrado em Fisiologia – Curso de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, 2006.
- HAUNER, H., PETRUSCHKE, T., RUSS, M., RÖHRIG, K., ECKEL, J. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) on glucose transport and lipid metabolism of newly differentiated human fat cells in culture. *Diabetologia*, (38): 764–771, 1995.

- HEATH, R. B., KARPE, F., MILNE, R.W., BURDGE, G.C., WOOTTON, S.A., FRAYN, K.N. Selective partitioning of dietary fatty acids into the VLDL TG pool in the early postprandial period. *J. Lipid Res.*, (44): 2065–2072, 2003.
- HO, R. J. & MENG, H. C. Technique for the cannulation and perfusion of isolated rat epididimal fat pad. *J. Lipid. Res.*, (5): 203-210, 1964.
- HOLLENBERG, C.H. The origin and glyceride distribution of fatty acids in rat adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, (45): 205–216, 1966.
- HOLM, G., JACOBSSON, B., BJÖRNTORP, P., SMITH, U. Effects of age and cell size on rat adipose tissue metabolism. *J. Lipid Res.* (16): 461–464, 1975.
- HOTAMISLIGIL, G., SHARGILL, N.S., SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, (259): 87–91, 1993.
- ILLIANO, G. & CUATRECASAS, P. Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin. *Science*, 175 (4024): 906-908, 1972.
- IMBEAULT, P., LEMIEUX, S., PRUD'HOMME, D., TREMBLAY, A., NADEAU, A., DESPRES, J.P., MAURIEGE, P. Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous cell hypertrophy? *Metab., Clin. Exp.*, (48): 355–362, 1999.
- JAMDAR, S. C. Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue. Influence of adipose cell size and site of adipose tissue on triacylglycerol formation in lean and obese rats. *Biochem. J.*, (170): 153–160, 1978.
- JANSSON, P.A., SMITH, U., LÖNNROTH, P. Evidence for lactate production by human adipose tissue in vivo. *Diabetologia*, (33): 253-256, 1990.
- JANSSON, P.A., LARSSON, A., SMITH, U., LÖNNROTH, P. Glycerol production in subcutaneous adipose tissue of lean and obese humans. *J. Clin. Invest.*, (89): 1610–1617, 1992.
- JENSEN, M.D., HAYMOND, M.W., RIZZA, R.A., CRYER, P.E., MILES, J.M. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J. Clin. Invest.*, (83): 1168 –1173, 1989.

- JOCKEN, J.W., LANGIN, D., SMIT, E., SARIS, W.H., VALLE, C., HUL, G.B., HOLM, C., ARNER, P., BLAAK, E.E. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin resistant state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (92): 2292–2299, 2007.
- AHMED, K., TUNARU, S., TANG, C., MÜLLER, M., GILLE, A., SASSMANN, A., HANSON, J., OFFERMANN, S. An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metabolism*, (11): 311–319, 2010.
- KASHIWAGI, A. & FOLEY, J.E. Opposite effects of a β -adrenergic agonist and a phosphodiesterase inhibitor on glucose transport in isolated human adipocytes: Isoproterenol increases V_{max} and IBMX increases K_s . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107 (3): 1151–1157, 1982.
- KATSURADA, A., IRITANI, N., FUKUDA, H., MATSUMURA, Y., NISHIMOTO, N., NOGUCHI, T., TANAKA, T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, (190): 435–441, 1990a.
- KATSURADA, A., IRITANI, N., FUKUDA, H., MATSUMURA, Y., NISHIMOTO, N., NOGUCHI, T., TANAKA, T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. *European Journal of Biochemistry*, (190): 427–435, 1990b.
- KENNEDY, G.C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc.*, (140): 578–592, 1953.
- KERN, P., SAGHIZADEH, M., ONG, J.M., BOSCH, R.J., DEEM, R., SIMSOLO, R.B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.*, (95): 2111–2119, 1995.
- KERN, P.A. Potential role of TNF α and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J. Nutr.*, (127): 1917–1922, 1997.

- KERN, P.A., ONG, J.M., SAFFARI, B., CARTY, J. The effects of weight loss on the activity and expression of adipose-tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *N. Engl. J. Med.*, (322): 1053–1059, 1990.
- KERSHAW, E.E., HAMM, J.K., VERHAGEN, L.A., PERONI, O., KATIC, M., FLIER, J.S. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, (55): 148–157, 2006.
- KIM, J.Y., TILLISON, K., LEE, J.H., REARICK, D.A., SMAS, C.M. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (291): 115–127, 2006.
- KIM, K.H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu. Rev. Nutr.*, (17): 77–99, 1997.
- KISHIDA, K., KURIYAMA, H., FUNAHASHI, T., SHIMOMURA, I., KIHARA, S., OUCHI, N., NISHIDA, M., NISHIZAWA, H., MATSUDA, M., TAKAHASHI, M., HOTTA, K., NAKAMURA, T., YAMASHITA, S., TOCHINO, Y., MATSUZAWA, Y. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, (275): 20896–20902, 2000.
- KLEIBER, M. The fire of life an introduction to animal energetics. 2.ed. Robert E. Krieger Publishing Company: New York, 453p, 1975.
- KOLEHMAINEN, M., VIDAL, H., ALHAVA, E., UUSITUPA, M.I. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes. Res.*, (9): 706–712, 2001.
- KONING, L., MERCHANT, A.T., POGUE, J., ANAND, S.S. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur. Heart J.*, 28 (7): 850-856, 2007.
- KOSCHINSKY, T., GRIES, F. A. & HERBERG, L. Regulation of glycerol kinase by insulin in isolated fat cells and liver of Bar Harbor obese mice. *Diabetologia*, (7): 316-322, 1971.
- KOVACS, P., HARPER, I., HANSON, R.L., INFANTE, A.M., BOGARDUS, C., TATARANNI, P.A., BAIER, L.J. A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene

(FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians. *Diabetes*, (53): 1915–1919, 2004.

KOYAMA, K., CHEN, G., LEE, Y., UNGER, R.H. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *American Journal of Physiology*, 273(4): 708-713, 1997.

KRALISCH, S., KLEIN, J., LOSSNER, U., BLUHER, M., PASCHKE, R., STUMVOLL, M., FASSHAUER, M. Isoproterenol, TNF-alpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, (240): 43–49, 2005.

LAFONTAN, M. & LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, (48): 275–297, 2009.

LAKE, A.C., SUN, Y., LI, J.L., KIM, J.E., JOHNSON, J.W., LI, D., REVETT, T., SHIH, H.H., LIU, W., PAULSEN, J.E., GIMENO, R.E. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J. Lipid. Res.*, (46): 2477–2487, 2005.

LANDAU, B. R. & WAHREN, J. Quantification of the pathways followed in hepatic glycogen formation from glucose. *Fasebj.* (2): 2368-2375, 1988.

LANGIN, D., DICKER, A., TAVERNIER, G., HOFFSTEDT, J., MAIRAL, A., RYDÉN, M., ARNER, E., SICARD, A., JENKINS, C.M., VIGUERIE, N., VAN HARMELEN, V., GROSS, R.W., HOLM, C., ARNER, P. Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. *Diabetes*, 54 (11): 3190-3197, 2005.

LANGOUCHE, L., PERRE, S.V., THIESSEN, S., GUNST, J. HERMANS, G., D'HOORE, A. Alterations in Adipose Tissue during Critical Illness: An Adaptive and Protective Response? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, (182): 507–516, 2010.

LAPIDUS, L., BENGTSSON, C., LARSSON, B., PENNERT, K., RYBO, E., SJÖSTRÖM, L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12-year follow-up of participants in the population study of women in Gothenburg. *Br. Med. J.*, (289): 1257-1261, 1984.

- LARGE, V., REYNISDOTTIR, S., LANGIN, D., FREDBY, K., KLANNEMARK, M., HOLM, C., ARNER, P. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J. Lipid. Res.*, (40): 2059–2066, 1999.
- LARGE, V., ARNER, P., REYNISDOTTIR, S., GROBER, J., VAN HARMELEN, V., HOLM, C., LANGIN, D. Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. *J. Lipid. Res.*, (39): 1688–1695, 1998.
- LENCHIK, L., REGISTER, T.C., HSU, F.C., LOHMAN, K., NICKLAS, B.J., FREEDMAN, B.I., LANGEFELD, C.D., CARR, J.J., BOWDEN, D.W. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone*, (34): 916, 2004.
- LEONARD, W. R., ROBERTSON, M.L., SNODGRASS, J.J., KUZAWA, C.W. Metabolic correlates of hominid brain evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, (136): 5–15, 2003.
- LEONARD, W.R., SNODGRASS, J.J., ROBERTSON, M.L. Effects of brain evolution on human nutrition and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, (27): 311-327, 2007a.
- LEONARD, W.R, ROBERTSON, M.L., SNODGRASS, J.J. Energetics and the evolution of brain size in early Homo. In: *Guts and brain: an integrative approach to the hominin record*. Amsterdam University Press: Amsterdam, p.29-46, 2007b.
- LETEXIER, D., PINTEUR, C., LARGE, V., FRÉRING, V., BEYLOT, M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J. Lipid. Res.*, (44): 2127–2134, 2003.
- LEWIN, R. Principles of human evolution. A core textbook. 1^a ed. Blackwell Scientific: London, p.526, 1998.
- LEY, C.J., LEES, B., STEVENSON, J.C. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am. J. Clin. Nutr.*, (55): 950–954, 1992.
- LI, J., YU, X., PAN, W., UNGER, R.H. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (282): 1334–1341, 2002.

- LIN, E.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, (46): 765-795, 1977.
- LIU, C., WU, J., ZHU, J., KUEI, C., YU, J., SHELTON, J., SUTTON, S.W., LI, X., YUN, S.J., MIRZADEGAN, T., MAZUR, C., KAMME, F., LOVENBERG, T.W. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.*, (284): 2811–2822, 2009.
- LIU, X., PÉRUSSE, F., BUKOWIECKI, L.J. Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adipose tissues. *American Journal of Physiology*, 266 (3): 914-920, 1994.
- LOFTUS, T.M. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, (288): 2379–2381, 2000.
- LOHMAN, T.G., ROACHE, A. F., MARTORELL, R. ANTHROPOMETRIC STANDARDIZATION REFERENCE MANUAL. In: *Medicine & Science in Sports & Exercise*. Book Reviews Editor, p.177, 1998.
- LOPEZ, I.P., MILAGRO, F.I., MARTÍ, A., MORENO-ALIAGA, M.J., MARTÍNEZ, J.A., DE MIGUEL, C. Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (318): 234–239, 2004.
- LOVEJOY, J., MELLEN, B., DIGIROLAMO, M. Lactate generation following glucose ingestion. Relation to obesity, carbohydrate tolerance and insulin sensitivity. *Mt.J. Obes*, (14): 843-855, 1990.
- LUDVIGSEN, C., JARETT, L., MCDONALD, J.M. The Characterization of Catecholamine Stimulation of Glucose Transport by Rat Adipocytes and Isolated Plasma Membranes. *Endocrinology*, 106 (3): 786-790, 1980.
- LUNDGREN M., SVENSSON, M., LINDMARK, S., RENSTRÖM, F., RUGE, T., ERIKSSON, J.W. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and ‘hyperleptinaemia.’ *Diabetologia*, (50): 625–633, 2007.

- MADDISON, A. *The World Economy. Historical Statistics.* OECD: Paris, 2003.
- MAEDA, N., FUNAHASHI, T., HIBUSE, T., NAGASAWA, A., KISHIDA, K., KURIYAMA, H., NAKAMURA, T., KIHARA, S., SHIMOMURA, I., MATSUZAWA, Y. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (101): 17801–17806, 2004.
- MAIRAL, A., LANGIN, D., ARNER, P., HOFFSTEDT, J. Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia*, (49): 1629–1636, 2006.
- MARGOLIS, S. & VAUGHAN, M. Alpha-glycerophosphate synthesis and breakdown in homogenates of adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, (237): 44-48, 1962.
- MARRADES, M.P., MILAGRO, F.I., MARTÍNEZ, J.A., MORENO-ALIAGA, M.J. Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (339): 785–789, 2006.
- MARTIN, R. J. & LAMPREY, P. M. Early development of adipose cell lipogenesis and glycerol utilization in Zucker obese rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (149): 35-39, 1975.
- MAURIÉGE, P., DESPRES, J.P., PRUD'HOMME, D., POULIOT, M.C., MARCOTTE, M., TREMBLAY, A., BOUCHARD, C. Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J. Lipid. Res.*, (32): 1625–1633, 1991.
- MEACCI, E., TAIRA, M., MOOS, M. JR., SMITH, C.J., MOVSESIAN, M.A., DEGERMAN, E., BELFRAGE, P., MANGANIELLO, V. Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, (89): 3721–3725, 1992.
- MERKEL, M., WEINSTOCK, P.H., CHAJEK-SHAUL, T., RADNER, H., YIN, B., BRESLOW, J.L., GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J. Clin. Invest.*, (102): 893-901, 1998.

- MINEHIRA, K., VEGA, N., VIDAL, H., ACHESON, K., TAPPY, L. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, (28): 1291–1298, 2004.
- MIRANDA, M., ESCOTÉ, X., CEPERUELO-MALLAFRÉ, V., ALCAIDE, M.J., SIMÓN, I., VILARRASA, N., WABITSCH, M., VENDRELL, J. Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95 (7): 3470–3479, 2010.
- MOBBS, C.V. & MAKIMURA, H. Block the FAS, lose the fat. *Nat. Med.*, (8): 335–336, 2002.
- MOLARIUS, A. & SEIDELL, J.C. Selection of anthropometric indicators for classification of abdominal fatness – a critical review. *Int. J. Obes.*, (22): 719-727, 1998.
- MONTAGUE, C.T. & O’RAHILLY, S. The perils of portliness. Causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*, (49): 883-888, 2000.
- MORIN, C. L., GAYLES, E. C., PODOLIN, D. A., WEI, Y., XU, M. AND PAGLIASSOTTI, M. J. Adipose tissue-derived tumor necrosis factor activity correlates with the fat cell size but not insulin action in aging rats. *Endocrinology*, (139): 4998–5005, 1998.
- MURATA, T. SHIMIZU, K., HIRAMOTO, K., TAGAWA, T. Phosphodiesterase 3 (PDE3): structure, localization and function. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 7 (3): 206-211, 2009.
- NAVES, A. *Nutrição Clínica e Funcional: Obesidade*. 1ª ed. VP editora: São Paulo, p.347, 2009.
- NCEP (Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, (285): 2486–2497, 2001.
- NEEL, J. V. Diabetes mellitus : a “ thrifty ” genotype rendered detrimental by “progress ” ? *American Journal of Human Genetics*, (14): 353–362, 1962.

- NEWBY, F.B., BAYO, F., THACKER, S.V., SYKES, M., DIGIROLAMO, M. Effects of streptozotocin induced diabetes on glucose metabolism and lactate released by isolated fat cells from young and older, moderately obese rats. *Diabetes*, (38): 237-243, 1989.
- O'HARA, A., LIM, F.L., MAZZATTI, D.J., TRAYHURN, P. Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.*, (458): 1103–1114, 2009.
- OLEFSKY, J. M. Insensitivity of large rat adipocytes to the antilipolytic effects of insulin. *J. Lipid Res.*, (18): 459–464, 1977.
- ONAT, A., AVCI, G.S., BARLAN, M.M., UYAREL, H., UZUNLAR, B., SANSOY, V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *International Journal of Obesity*, (28): 1018–1025, 2004.
- ORO, L., WALLENBERG, L., ROSELL, S. Circulatory and metabolic process in adipose tissue in vivo. *Nature*, (205): 179-179, 1965.
- ORTEGA, F.J., MAYAS, D., MORENO-NAVARRETE, J.M., CATALÁN, V., GÓMEZ-AMBROSI, J., ESTEVE, E., RODRIGUEZ-HERMOSA, J.I., RUIZ, B., RICART, W., PERAL, B., FRUHBECK, G., TINAHONES, F.J., FERNÁNDEZ-REAL, J.M. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity*, (18): 13-20, 2010.
- PARADISI, G., SMITH, L., BURTNER, C., LEAMING, R., GARVEY, W.T., HOOK, G., JOHNSON, A., CRONIN, J., STEINBERG, H.O., BARON, A.D. Dual energy x-ray absorptiometry assessment of fat mass distribution and its association with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*, (22): 1310-1317, 1999.
- PASARICA, M., SEREDA, O.R., REDMAN, L.M., ALBARADO, D.C., HYMEL, D.T., ROAN, L.E., ROOD, J.C., BURK, D.H., SMITH, S.R. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*, (58): 718–725, 2009.

- PASARICA, M., ROOD, J., RAVUSSIN, E., SCHWARZ, J.M., SMITH, S.R., REDMAN, L.M. Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (95): 4052–4055, 2010.
- PAULAUSKIS, J.D., SUI, H.S. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J. Biol. Chem.*, (264): 574-577, 1989.
- PELLEYMOUNTER, M.A., CULLEN, M.J., BAKER, M.B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T., COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, (269): 540–543, 1995.
- PÉREZ de HEREDIA, F., WOOD, I.S., TRAYHURN, P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, (459): 509–518, 2010.
- PERSICO, P.A., CERCHIO, M., JEFFAY, H. Glycerokinase in mammalian adipose tissue: stimulation by lipogenic substances. *Am. J. Physiol.*, 228 (6): 1868-1874, 1975.
- PINHEIRO, D.C. ALMEIDA, J., FRANCESCONI, E.P.M.S., GRASSI-KASSISSE, D.M. Análise Morfológica de adipócitos isolados de regiões mesentéricas, epididimal e peri-renal de ratos submetidos a estresse. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, XV., 2007, Campinas.
- POND, C. M. The fats of life. Cambridge University Press: Cambridge, 1998.
- PREISS-LANDL, K. et al. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, v.13, p.471-481, 2002.
- PRUDENTE, S., et al. A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes*, v.56, p.1468–1474, 2007.
- RAHN LANDSTROM, T., MEI, J., KARLSSON, M., MANGANIELLO, V., DEGERMAN, E. Down-regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase 3B in 3T3-L1 adipocytes induced by tumour necrosis factor alpha and cAMP. *Biochem. J.*, (346): 337–343, 2000.

- RANGANATHAN, G., et al. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J. Lipid. Res.*, v.47, p.2444–2450, 2006.
- REBUFFE-SCRIVE M, Enk L, Crona N, et al. Fat cell metabolism in different regions in women. Effect of menstrual cycle, pregnancy, and lactation. *J Clin Invest.* 1985;75:1973–6.
- REED, K.E. Early hominid evolution and ecological change through the African Plio-Pleistocene. *J. Hum. Evol.*, 32 (2-3): 289-322, 1997.
- REGAZZETTI, C., PERALDI, P., GRÉMEAUX, T., NAJEM-LENDOM, R., BEN-SAHRA, I., CORMONT, M., BOST, F., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., TANTI, J.F., GIORGETTI-PERALDI, S. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*, (58): 95–103, 2009.
- REINSCHIED, R.K., NOTHACKER, H.P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINGSEN, R.A., BUNZOW, J.R., GRANDY, D.K., LANGEN, H., MONSMA, F.J. JR., CIVELLI, O. A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, (270): 792-794, 1995.
- RESHEF, L., OLSWANG, Y., CASSUTO, H., BLUM, B., CRONIGER, C.M., KALHAN, S.C., TILGHMAN, S.M, HANSON, R.W. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.*, (278): 30413–30416, 2003.
- REYNISDOTTIR, S., WAHRENBERG, H., CARLSTRÖM, K., RÖSSNER, S., ARNER, P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of α 2-adrenoceptors. *Diabetologia*, (37): 428–435, 1994.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Bio. Chem.*, 232 (2): 375-380, 1964.
- RODRÍGUEZ, A., CATALÁN, V., GÓMEZ-AMBROSI, J., GARCÍA-NAVARRO, S., ROTELLAR, F., VALENTÍ, V., SILVA, C., GIL, M.J., SALVADOR, J., BURRELL, M.A., CALAMITA, G., MALAGÓN, M.M., FRÜHBECK, G. Insulin- and Leptin-Mediated Control of Aquaglyceroporins in Human Adipocytes and Hepatocytes Is Mediated via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 96 (4): 586–597, 2011.

- RYALL, R. L. & GOLDRICK, R. B. Glycerolkinase in human adipose tissue. *Lipids*, 12(3): 272-7, 1977.
- SADUR, C.N., YOST, T.J., ECKEL, R.H. Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (59): 1176–1182, 1984.
- SALAZAR, B.S. Vías de señalización que participan en la regulación de la lipólisis en adipócitos. *Revista de Educación Bioquímica*, 25 (3): 80-84, 2006.
- SCHAFFER, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, (14): 281–287, 2003.
- SCHWARTZ, R.S. & BRUNZELL, J.D. Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. *J. Clin. Invest.*, (67): 1425–1430, 1981.
- SEMENKOVICH, C.F. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res.*, (36): 43–53, 1997.
- SEMENKOVICH, C.F., CHEN, S.H., WIMS, M., LUO, C.C., LI, W.H., CHAN, L. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J. Lipid. Res.*, (30): 423-431, 1989a.
- SEMENKOVICH, C.F., WIMS, M., NOE, L., ETIENNE, J., CHAN, L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J. Biol. Chem.*, (264): 9030–9038, 1989b.
- SICHERI, R., do NASCIMENTO, S., COUTINHO, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 23(7): 1721-1727, 2007.
- SJOSTROM, L., SMITH, U., KROTKIEWSKI, M., BJÖRNTORP, P. Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism*, (21): 1143–1153, 1972.
- SMITH, J., AL-AMRI, M., DORAIRAJ, P., SNIDERMAN, A. The adipocyte life cycle hypothesis. *Clinical Science*, (110): 1–9, 2006.

- SOUKAS, N.D., SOCCI, N.D., SAATKAMP, B.D., NOVELLI, S., FRIEDMAN, J.M. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, (276): 34167–34174, 2001.
- SOUZA, S.C., DE VARGAS, L.M., YAMAMOTO, M.T., LIEN, P., FRANCIOSA, M.D., MOSS, L.G., GREENBERG, A.S. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor- α to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, (273): 24665–24669, 1998.
- SPALDING, K.L., ARNER, E., WESTERMARK, P.O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B.A., BERGMANN, O., BLOMQVIST, L., HOFFSTEDT, J., NÄSLUND, E., BRITTON, T., CONCHA, H., HASSAN, M., RYDÉN, M., FRISÉN, J., ARNER, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453 (7196): 783-787, 2008.
- SPEAKMAN, J. R. A nonadaptive scenario explaining the genetic predisposition to obesity: the ‘predation release’ hypothesis. *Cell. Metab.*, (6): 5–12, 2007.
- STEINBERG, G.R., KEMP, B.E., WATT, M.J. Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (293): 958–964, 2007.
- STEWART, P.M. Tissue-specific Cushing’s syndrome uncovers a new target in treating the metabolic syndrome – 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Clin. Med.*, (5): 142-146, 2005.
- STIPANUK, M. Biochemical, physiological, molecular aspects of human nutrition. 2a ed. Elsevier Saunders: St Louis, 2006.
- STRATZ, C. H. Wachstum und proportionen des menschen vor und nach der geburt. Arhiv fu“r
- SWIERCZYNSKI, J., ZABROCKA, L., GOYKE, E., RACZYNSKA, S., ADAMONIS, W., SLEDZINSKI, Z. Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Mol. Cell Biochem.*, (254): 55–59, 2003.
- SYMONDS, M.E. Adipose Tissue Biology. 1^a ed. Editora Springer: New York, p.128, 2011.

- TAIRA, M., HOCKMAN, S.C., CALVO, J.C., TAIRA, M., BELFRAGE, P., MANGANIELLO, V.C. Molecular cloning of the rat adipocyte hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, (268): 18573–18579, 1993.
- TANG, Y., OSAWA, H., ONUMA, H., NISHIMIYA, T., OCHI, M., MAKINO, H. Improvement in Insulin Resistance and the Restoration of Reduced Phosphodiesterase 3B Gene Expression by Pioglitazone in Adipose Tissue of Obese Diabetic KKAY Mice. *Diabetes*, (48): 1830-1835, 1999.
- TAYLOR, W.M., MAK, M.L., HALPERIN, M.L. Effect of 3':5'-cyclic AMP on glucose transport in rat adipocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73 (12): 4359 – 4363, 1976.
- TCHERNOF, A., BÉLANGER, C., MORISSET, A.S., RICHARD, C., MAILLOUX, J., LABERGE, P., DUPONT, P. Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes*, (55): 1353–1360, 2006.
- TEMPLETON, A. Usando a biologia evolutiva para estudar doenças arteriais coronarianas. Revista Fapesp, p.1-34, 2008. Disponível em: http://www.revistapesquisa.fapesp.br/pdf/revolucao_genomica/templeton.pdf. Acesso em 18 de agosto de 2011.
- TERRETTAZ, J., CUSIN, I., ETIENNE, J., JEANRENAUD, B. In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, (18): 9–15, 1994.
- THENEN S.W. & MAYER, J. Adipose tissue glycerokinase activity in genetic and acquired obesity in rats and mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148 (4): 953-957, 1975.
- TINAHONES, F.J., GARRIDO-SANCHEZ, L., MIRANDA, M., GARCÍA-ALMEIDA, J.M., MACIAS-GONZALEZ, M., CEPERUELO, V., GLUCKMANN, E., RIVAS-MARIN, J., VENDRELL, J., GARCÍA-FUENTES, E. Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects. *Obes. Surg.*, (20): 11, 1559-1567, 2010.

- TREBLE, D. H. & MAYER, J. Glycerol kinase activity in white adipose tissue in obese-hyperglycemic mice. *Nature (London)*, v.200, p.363-364, 1963.
- VAGUE J. The degree of masculine differentiation of obesity: a factor-determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric acid calculus disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, (4): 20-34, 1956.
- VIGITEL BRASIL 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, p.124, 2010.
- VILLENA, J.A., ROY, S., SARKADI-NAGY, E., KIM, K.H., SUL, H.S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, (279): 47066–47075, 2004.
- VIRTUE, S. & VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1801 (3): 338–49, 2010.
- WADE, G.N., GRAY, J.M., BARTNESS, T.J. Gonadal influences on adiposity. *Int. J. Obes.*, 9 (1): 83–92, 1985.
- WAHBA, I.M. & MAK, R.H. Obesity and Obesity-Initiated Metabolic Syndrome: Mechanistic Links to Chronic Kidney Disease. *Obes. Rev.*, (4): 43-55, 2007.
- WANG, H. & ECKEL R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (297): 271–288, 2009.
- WATT, M.J., CAREY, A.L., WOLSK-PETERSEN, E., KRAEMER, F.B., PEDERSEN, B.K., FEBBRAIO, M.A. Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion. *Diabetologia*, (48): 105–112, 2005.
- WEISBERG, S.P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R.L., FERRANTE, A.W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, (112): 1796-1808, 2003.

- WELTON, R. F., MARTIN, R. J. & BAUMGARDT, B. R. Effects of feeding and exercise regimens on adipose tissue glycerokinase activity and body composition of lean and obese mice. *J. Nutr. J.*, (3): 1212- 1219, 1973.
- WERTHEIMER, E & SHAPIRO, B. The Physiology of Adipose Tissue. *Physiological Reviews*, 28 (4): 451-464, 1948.
- WEYER C., FOLEY, J.E., BOGARDUS, C., TATARANNI, P.A., PRATLEY, R.E. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, (43): 1498–1506, 2000.
- WOOD, I.S., WANG, B., LORENTE-CEBRIÁN, S., TRAYHURN, P. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (361): 468–473, 2007.
- WHO (World Health Organization). Obesity and Overweight: Fact Sheet No. 311. Março de 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em 16 de junho de 2011.
- YACOUB, L.K., VANNI, T.M., GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase mRNA in neonatal and adult mouse tissues: comparison of normal and combined lipase deficiency (cld) mice assessed by in situ hybridization. *J. Lipid. Res.*, (31): 1845-1852, 1990.
- YANG, X., JANSSON, P.A., NAGAEV, I., JACK, M.M., CARVALHO, E., SUNNERHAGEN, K.S., CAM, M.C., CUSHMAN, S.W., SMITH, U. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (317): 1045–1051, 2004.
- YIN, J., GAO, Z., HE, Q., ZHOU, D., GUO, Z., YE, J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (296): 333–342, 2009.
- YOSHIZUMI, T., NAKAMURA, T., YAMANE, M., ISLAM, A.H., MENJU, M., YAMASAKI, K., ARAI, T., KOTANI, K., FUNAHASHI, T., YAMASHITA, S., MATSUZAWA, Y. Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. *Radiology*, (211): 283-286, 1999.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J.M.
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, (372): 425–432,
1994.

ZINDER, O. & SHAPIRO, B. Effect of cell size on epinephrine- and ACTH-induced fatty acid release
from isolated fat cells. *J. Lipid Res.*, (12): 91–95, 1971.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ portador do
 RG: _____ domiciliado na Rua / Av. _____ Bairro
 _____ CEP _____, na cidade de
 _____, telefone _____ e-
 mail _____ venho por meio desta, informar o meu consentimento quanto a minha
 participação como voluntário(a) do projeto de pesquisa “EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM
 A LACTATOGÊNESE, LIPOGÊNESE E LIPÓLISE EM TECIDO ADIPOSEO ISOLADO DE HUMANOS
 EUTRÓFICOS E OBESOS”, cuja pesquisadora responsável é a aluna de mestrado Larissa Yuri Ishizu.

A minha participação será fornecendo uma pequena parte (cerca de 5 g) de tecido adiposo omental que será retirado no momento da cirurgia.

A análise deste tecido contribuirá para o conhecimento científico sobre o metabolismo de glicose e de lipídeos que está alterado na obesidade. Estes estudos podem também contribuir para a melhora na qualidade de vida das pessoas obesas e com sobrepeso.

O método de estudo do tecido será o Real-Time PCR, o qual quantificará a expressão de algumas proteínas envolvidas com a produção de lactato, de triacilgliceróis e com a lipólise em tecido adiposo omental de humanos eutróficos e obesos.

A apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a obtenção do consentimento serão realizadas pela pesquisadora Larissa Yuri Ishizu, ou por outra pessoa indicada por ela. O (a) voluntário (a) poderá solicitar uma cópia do TCLE junto ao pesquisador que o apresentará.

Eu concordo em ceder as amostras de tecido no dia da cirurgia, (sim ou não), em responder o questionário proposto (sim ou não), e também concordo em fazer avaliações das minhas medidas corporais (sim ou não).

Estou ciente de que não haverá qualquer risco ou prejuízo a minha saúde ou integridade física, que poderei me desligar da pesquisa a qualquer momento e que este tecido será utilizado somente para fins de análise fisiológica “in vitro”, sendo então descartada a hipótese de utilização em análises não autorizadas pelo governo, firmando o compromisso de sigilo absoluto em relação ao trabalho proposto, segundo as exigências da resolução 196/96.

A presente pesquisa não prevê nenhum reembolso de dinheiro aos (às) voluntários (as), uma vez que ela não acarretará nenhum gasto a eles (as).

Também autorizo o armazenamento das amostras de tecido adiposo para fins de estudos futuros, seguindo as exigências previstas pela Resolução CNS nº 196/96. Toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP/FCM e se cabível também da CONEP (sim ou não).

Tenho consciência da possibilidade dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa me contatarem, caso haja necessidade de fornecimento de informação de seu interesse, ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa.

Estou ciente de que poderei contatar a pesquisadora responsável pelo projeto durante ou após a realização da pesquisa a fim de maiores esclarecimentos.

Por estar ciente da importância deste projeto, declaro de acordo com os procedimentos acima citados. Declaro também que estou ciente de que a minha recusa em participar não implicará em nenhuma restrição ou consequência relacionadas ao meu tratamento.

Assinatura do(a) voluntário(a)


Responsável pela coleta _____

Campinas, ____ de _____ de 2011

Comitê de Ética Médica: telefone – (19) 3521-8936 / fax (019) 3521-7187 / e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Larissa Yuri Ishizu: larissa_yuri@yahoo.com.br

7.2. Anexo II: documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP



UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 21/07/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 412/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0355.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSION DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM A LACTATOGÊNESE, LIPOGÊNESE E LIPÓLISE EM TECIDO ADIPOSEO ISOLADO DE HUMANOS EUTRÓFICOS E OBESOS”.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Larissa Yuri Ishizu
INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/05/2011
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/07/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar possíveis alterações no metabolismo glicídico e lipídico, sob o enfoque da expressão gênica, no tecido adiposo omental de obesos, em comparação com eutróficos. Estudar possíveis correlações entre as medidas antropométricas dos voluntários e os respectivos valores plasmáticos de adiponectina, insulina e glicose e HbA1c.

III – SUMÁRIO.

Serão avaliados 12 indivíduos, 6 em cada grupo. Serão realizadas várias análises bioquímicas e de expressão no material retirado do paciente do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
 Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
 Caixa Postal 6111
 13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
 FAX (019) 3521-7187
 cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP