

Eva das Graças Abeles

**EFEITO DO ESTRADIOL
SOBRE O ACÚMULO LIPÍDICO EM RATAS**

Belo Horizonte
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

EFEITO DO ESTRADIOL
SOBRE O ACÚMULO LIPÍDICO EM RATAS

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Fisiologia).

Eva das Graças Abeles

Orientador: Profa. Dra. Leida Maria Botion

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Belo Horizonte
2007

**EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE O
ACÚMULO LIPÍDICO EM RATAS**

EVA DAS GRAÇAS ABELES

Tese de doutorado defendida e aprovada, no dia 28 de fevereiro de 2007, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. LUIZ CARLOS CARVALHO NAVEGANTES



PROF. DR. RONALDO DE CARVALHO ARAÚJO



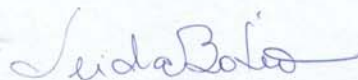
PROF. DR. LUCAS JOSÉ DE CAMPOS MACHADO



PROF. DR. RODRIGO BASTOS FÓSCOLO



PROF. DR. JORGE LUIZ PESQUERO
CO-ORIENTADOR



PROFA. DRA. LEIDA MARIA BOTION
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 28 de FEVEREIRO de 2007.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Metabolismo Celular e de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência de auxílios concedidos pela CAPES, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Nós devemos ser como certas montanhas altíssimas que têm ao seu redor o temporal e, entretanto, têm o cimo iluminado pelo sol”.

(Bv Mariana Salla)

*Dedico este trabalho
à minha mãe Luzia de Jesus Abeles e ao meu pai Manoel Abeles (in memorian),
pelo infindável Amor e pela presença constante.
E à minha família pela compreensão e estímulo presentes durante todos os
momentos.*

À Deus por conceder-me serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar as que posso e sabedoria para distinguir umas das outras, aceitando que as dificuldades constituem o caminho da realização e da paz.

À Professora Dra. Leida Maria Botion pela sua valiosa orientação, pelo estímulo constante e por compartilhar os seus valiosos conhecimentos científicos. Meus sinceros agradecimentos pela amizade, dedicação e apoio constante.

Ao Professor Dr. Jorge Luiz Pesquero pela co-orientação, estímulo constante e valiosa contribuição científica para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcos Horácio Pereira, Professor Dr. Nelder Figueiredo Gontijo, Dr. Ricardo Nascimento Araújo, Dra. Adriana Dollar e as alunas Andrezza, Ceris, Fernanda, Veruska pela importante colaboração durante a utilização da infraestrutura do laboratório de Parasitologia para obtenção da expressão dos genes.

Ao Professor Dr. Cândido Celso Coimbra e o técnico André Luis Pimenta de Faria do Laboratório de endocrinologia pela importante colaboração para realização do radioimunoensaio para insulina.

Aos Professores Dra. Virginia S. Lemos e Dr. Steyner A. de Rezende e ao colega Bruno A. Rezende do laboratório de Farmacologia pela importante colaboração nas medidas de pressão arterial.

Ao Professor Dr.Hélio Chiarini Garcia e a técnica Mara Livia dos Santos do laboratório de Morfologia pela grande colaboração na obtenção dos resultados de microscopia.

À Professora Maria de Lourdes Duarte Weinberg pelo estímulo e amizade.

À Lizandra A.V.A. Camargo e Kátia Moraes Costa do laboratório de Biofísica e Zélia Menezes do laboratório de metabolismo pelo apoio técnico e agradável convivência.

Aos amigos do laboratório de Biofísica, Clara, Eliane, Ivan, José Geraldo, Mércia, Natasha, Wânia e Zenon meus agradecimentos pelo apoio, compreensão e amizade.

Aos amigos do laboratório de Metabolismo, Adaliene, Adriana, Ana Carolina, Érika, Jonas, Laura, Renata e Natália meus agradecimentos pela grande ajuda em vários momentos, pela amizade e convivência agradável.

Ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

À Secretária da Pós-Graduação, Maria Célia e colaboradores meus agradecimentos pelo carinho e pela constante boa vontade em atender às nossas solicitações. Sem o apoio e a dedicação de cada um de vocês seria impossível à realização deste trabalho.

Aos demais funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, que embora não estejam aqui listados, têm o meu mais profundo respeito e apreciação.

Aos “pequenos” grandes amigos: Meus sobrinhos Amanda, Leonam (*in memoriam*) e Sara, pelas brincadeiras, pelos desenhos e pelo carinho.

A todos que tiveram paciência e carinho para compartilhar comigo momentos críticos e que, em várias ocasiões preencheram a minha vida de alegrias, agradeço de forma muito sincera.

“A verdadeira riqueza de um ser humano é o bem que ele faz aos seus semelhantes”. (Mahatma Gandhi)

Sumário

	Página
Agradecimentos	i
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
1.0 Revisão da literatura	01
1.1 Metabolismo do tecido adiposo.....	03
1.2 Obesidade e distribuição regional de gordura.....	06
1.3 Tecido adiposo e atividade estrogênica.....	08
1.3.1 Estrógenos e adipogênese.....	12
1.4 Tecido adiposo e leptina.....	14
1.5 Receptores ativados por proliferadores dos peroxissomos (PPARs).....	15
1.6 Modelos de estudo.....	19
1.6.1 Menopausa: Ovariectomia.....	19
1.6.2 Linhagem de rato espontaneamente hipertenso (SHR).....	20
2.0 Objetivos	21
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22

3.0 Material e métodos	23
3.1 Animais e seu tratamento.....	24
3.2 Ovariectomia e reposição hormonal.....	25
3.3 Isolamento de adipócitos.....	25
3.4 Estudo de lipólise.....	25
3.5 Diâmetro e número de células.....	26
3.6 Captação de glicose.....	26
3.7 Medida da atividade da lipase lipoprotéica.....	26
3.8 Extração e determinação do glicogênio hepático.....	27
3.9 Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	27
3.10 Dosagens bioquímicas.....	29
3.11 Análise dos dados.....	29
4.0 Resultados	30
4.1 Pressão sanguínea.....	31
4.2 Ingestão alimentar.....	31
4.3 Peso corporal.....	32
4.4 Peso dos tecidos adiposos, número e diâmetro celular.....	33
4.5 Características plasmáticas das fêmeas WK e SHR.....	35
4.6 Atividade da enzima lipase lipoprotéica.....	36
4.7 Concentração hepática de glicogênio.....	37
4.8 Captação de glicose por adipócitos periuterinos	37
4.9 Captação de glicose por adipócitos mesentéricos.....	38
4.10 Atividade lipolítica do tecido adiposo periuterino	39

4.11 Atividade lipolítica do tecido adiposo mesentérico.....	40
4.12 Expressão dos genes.....	42
4.12.1 Expressão do gene leptina.....	43
4.12.2 Expressão do gene PPAR γ	44
4.12.3 Expressão do gene PPAR α	45
5.0 Discussão.....	46
6.0 Referências bibliográficas.....	60
7.0 Anexo 1	
Comitê de ética.....	82

Índice de figuras

Figura 1	Metabolismo do tecido adiposo.....	03
Figura 2	Mecanismos de ação dos estrógenos.....	09
Figura 3	Modulação da secreção de insulina pelo estrógeno.....	10
Figura 4	Esquema do processo de diferenciação do adipócito.....	13
Figura 5	Ativadores naturais e sintéticos dos PPARs.....	16
Figura 6	Função dos PPARs no controle do metabolismo dos triacilgliceróis (TG), dos ácidos graxos (AG) e do glicerol.....	19
Figura 7	Pressão arterial sistólica de ratas WK e SHR intactas e ovariectomizadas (OVX) submetidas ou não a tratamento com o veículo (OVX+O) ou com estradiol (OVX+E).	31
Figura 8	Ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas Wistar e SHR após reposição com estradiol e óleo.	32
Figura 9	Peso corporal de ratas WK e SHR ovariectomizadas, após reposição com estradiol ou óleo.	32
Figura 10	Peso dos tecidos adiposos periuterino e retroperitoneal de ratas WK e SHR ovariectomizadas e tratadas com óleo ou estradiol.	33
Figura 11	Diâmetro das células adiposas do tecido periuterino de WK e SHR.	34
Figura 12	Diâmetro das células adiposas do tecido mesentérico de WK e SHR.....	35
Figura 13	Atividade da enzima LPL no tecido adiposo mesentérico e periuterino de ratas WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo.	36

Figura 14	Concentração hepática de glicogênio em ratas WK e SHR ovariectomizadas e tratadas com óleo e estradiol.....	37
Figura 15	Transporte de glicose em condições basais e estimuladas pela insulina em adipócitos periuterinos (P) de ratas WK e SHR ovariectomizadas tratadas com estrógeno (E) ou com óleo (O).....	38
Figura 16	Transporte de glicose em condições basais e estimuladas pela insulina em adipócitos mesentéricos (M) de ratas WK e SHR ovariectomizadas tratadas com estrógeno (E) ou com óleo (O).	39
Figura 17	Glicerol liberado por adipócitos isolados do tecido adiposo periuterino de ratas WK tratadas com estradiol ou óleo.	39
Figura 18	Glicerol liberado por adipócitos isolados do tecido adiposo periuterino de ratas SHR tratadas com estradiol ou óleo.	40
Figura 19	Glicerol liberado a partir de adipócitos isolados do tecido adiposo mesentérico de ratas WK tratadas com estradiol ou óleo.....	41
Figura 20	Glicerol liberado a partir de adipócitos isolados do tecido adiposo mesentérico de ratas SHR tratadas com estradiol ou óleo.....	41
Figura 21	Comparação das respostas lipolíticas entre os tecidos obtidos de animais WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo.....	42
Figura 22	Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA da leptina por RT-PCR extraído dos tecidos adiposos periuterino (P), mesentérico (M) de ratas WK (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O).....	43

Figura 23	Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA do PPAR γ por RT-PCR extraído dos tecidos adiposos periuterino (P), mesentérico (M) e retroperitoneal de ratas WK (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O).	44
Figura 24	Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA do PPAR α por RT-PCR extraído do fígado (F), coração (C) e rim (R) de ratas WK ovariectomizadas (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O).....	45

Índice de tabelas

Tabela 1	Número e diâmetro de adipócitos isolados a partir dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico de ratas WK e SHR.....	34
Tabela 2	Características plasmáticas de fêmeas WK e SHR.....	36

È bem estabelecido que os hormônios ovarianos modulam o metabolismo das células adiposas e possuem um efeito protetor contra doenças cardiovasculares. No presente estudo avaliamos o papel do estradiol sobre o metabolismo do tecido adiposo de ratas Wistar-Kyoto normotensas (WK) e espontaneamente hipertensas (SHR). As ratas foram ovariectomizadas e 21 dias após, receberam injeções do veículo (0,1 mL de óleo/100 g de peso corporal) ou com estradiol (5µg/0,1 mL/100 g de peso corporal).

Foi verificado que a administração de estradiol após a ovariectomia (OVX) reduziu significativamente a pressão arterial sistólica, apenas do grupo SHR. A administração de estradiol reduziu, nos dois grupos de animais, o diâmetro celular dos adipócitos mesentéricos e periuterinos, e aumentou o número de células apenas nos tecidos das fêmeas WK. O número de células do grupo SHR foi sempre superior ao dos WK, independentemente do tratamento.

A atividade da enzima lipase lipoprotéica do tecido adiposo aumentou nas ratas ovariectomizadas dos dois grupos, embora a os valores obtidos para as SHR fossem cerca de 50 – 300% inferiores aos obtidos para as WK. A administração de estradiol reduziu a atividade da enzima, independentemente do grupo ou tratamento.

A presença de insulina (2,5 ng/mL) no meio de incubação, estimulou a captação de glicose pelos adipócitos periuterinos e mesentéricos dos dois grupos de animais. Entretanto, o efeito foi mais acentuado nas ratas que receberam estradiol. O tratamento com estradiol aumentou a lipólise basal dos adipócitos periuterinos nos dois grupos, WK e SHR. Quanto aos adipócitos mesentéricos, o tratamento com estradiol aumentou a lipólise basal apenas do grupo WK. A curva dose-resposta para o efeito antilipolítico da insulina mostrou que os adipócitos mesentéricos das SHR tratadas com estradiol foram mais sensíveis à inibição da lipólise estimulada pelo isoproterenol. A atividade lipolítica dos adipócitos isolados das SHR foi superior ao das WK independentemente do tratamento, sugerindo uma sensibilidade aumentada ao isoproterenol, em relação ao WK.

Observou-se que apenas no tecido periuterino de ratas WK tratadas com estradiol, ocorreu um aumento significativo nos níveis de expressão do gene do receptor de ativação peroxissomal (PPAR) do tipo γ . Nas SHR, observou-se um nível menor de expressão do gene do PPAR γ em relação às WK e não foram observadas diferenças de expressão deste gene nos tecidos periuterino em resposta ao tratamento. Entretanto, no tecido adiposo mesentérico, os níveis do mRNA do PPAR γ foram maiores que os de outros tecidos e o tratamento com estradiol aumentou de maneira significativa os níveis de expressão deste gene. Quanto ao PPAR α , verificou-se que o tratamento com estradiol aumentou significativamente os níveis de expressão deste fator de transcrição no fígado dos dois grupos de animais. A expressão deste gene aumento no coração das SHR tratadas com estradiol.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a falta de estradiol pode aumentar o risco cardiovascular, através de um aumento da pressão arterial, conforme evidenciado nas ratas SHR. A redução da sensibilidade à insulina após OVX reduziu a capacidade da insulina em suprimir a lipólise após estímulo com isoproterenol, bem como redução da captação de glicose pelos adipócitos. Por outro lado, o aumento da sensibilidade insulínica evidenciado pela administração de estradiol, pode ser conseqüente ao aumento da expressão do PPAR γ e indiretamente do PPAR α (através de seu efeito redutor da adiposidade). Os adipócitos viscerais são considerados lipolíticamente mais ativos que outros depósitos lipídicos, de modo que o aumento da captação de glicose, importante para o fornecimento de glicerol-3-fosfato, pode contribuir para reduzir a liberação de ácidos graxos através de um aumento da esterificação e desta forma, reduzir o afluxo de ácidos graxos ao fígado.

It is well established that ovarian hormones modulate the metabolism of adipose cells and present a protective effect against cardiovascular disease. This study evaluated the estradiol's effects on adipose tissue metabolism of normotensive, Wistar-Kyoto (WK) and spontaneously-hypertensive rats (SHR). Twenty one days after ovariectomy (OVX) the rats received vehicle (0,1 mL oil/100 g bw) or estradiol (5 μ g/0,1 mL/100 g bw).

Following estradiol administration, a significant decrease of systolic arterial pressure in the SHR was observed. Our results show in both groups, that adipocytes isolated from estradiol treated animals were smaller than that isolated from the vehicle treated rats, and increase in the cell number was observed only in WK rats. The number of adipocytes from SHR was higher than WK, independently of treatment.

Adipose tissue lipoprotein lipase activity increased after OVX in both groups, although in the SHR the values were 50% - 300% smaller than that observed in WK rats. Estradiol administration decreased the enzyme activity, independently of the group or treatment.

The presence of insulin (2,5 ng/mL) in the incubation media, stimulated glucose uptake by periuterine and mesenteric adipocytes from WK and SHR groups. However, the effect was more evident in the estradiol treated rats. The replacement with estradiol significantly increased basal lipolysis in periuterine adipocytes from both groups. In relation to mesenteric adipocytes, the treatment with estradiol significantly increased basal lipolysis only in WK rats. The dose-response relationship for insulin inhibition of lipolysis demonstrated that mesenteric adipocytes from SHR treated with estradiol are considerably more sensitive to insulin inhibition of isoproterenol-stimulated lipolysis than those from WK animals. The lipolytic activity in the SHR was higher than that of WK independent of the treatment, suggesting an increased sensitivity to isoproterenol in relation to the WK rats.

It was observed that in the periuterine tissue of WK treated with estradiol, a significant increase occurred in the expression levels of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), not observed in the mesenteric tissue. In the SHR it was observed a lower expression of PPAR γ in relation to the WK and differences of expression of this gene due to the treatment was not observed in periuterine tissue. However, in the mesenteric tissue, the levels of PPAR γ mRNA were higher than that of other sites and the treatment with estradiol significantly increased the expression levels of this gene. The treatment with estradiol significantly increased the expression of PPAR α in the liver, of both groups. In the SHR the treatment with estradiol increased, in a significant way, the levels of PPAR α also in the heart.

The results presented in the present work suggest that the estradiol deficiency can increase the cardiovascular risk, through the increase in blood pressure, as shown in SHR. The reduction of sensitivity to insulin after OVX unchains problems such as the inability of the insulin to suppress lipolysis after stimulus by catecholamines. The reduction of sensitivity for insulin was also harmful to the glucose uptake after OVX. It was evidenced that, the administration of estradiol, through the increase of PPAR γ and PPAR α expression increased the sensitivity for insulin. Visceral adipocytes are lipolytically more active than other depots, and the increase in glucose uptake, important for glycerol-3-phosphate production, may contribute to decrease fatty acids secretion by increasing esterification and consequently decreasing the flux of fatty acids to liver.

1. Revisão da literatura

O acúmulo de lipídios no tecido adiposo está associado a alterações profundas do sistema cardiovascular, incluindo entre outras, um aumento da pressão sanguínea sistêmica (FERRANINI, 1992). Um número crescente de evidências sugere que a distribuição de tecido adiposo em humanos, é um fator crítico na relação entre obesidade e doenças cardiovasculares, uma vez que o acúmulo de gordura abdominal está associado ao risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e mortalidade (LARSSON e cols, 1984; DONAHUE e cols, 1987; BJORNTORP, 1984; KISSEBACH e cols, 1994). Indivíduos obesos apresentam alto risco para o desenvolvimento de diabetes tipo II e outras anormalidades metabólicas que promovem o desenvolvimento de aterosclerose (PI-SUNYER, 1993). Desta forma, a obesidade é atualmente considerada um importante e independente fator de risco para morbidade cardiovascular e mortalidade, especialmente quando do tipo visceral (KISSEBACH e cols, 1994).

Observações clínicas indicam que os hormônios esteróides femininos estão envolvidos na determinação da distribuição da massa adiposa, isto é, maior acúmulo de gordura subcutânea na região glúteo-femural (KISSEBACH e cols, 1985) e menor na região visceral (KVIST e cols, 1988). Essa distribuição de gordura tende a desaparecer, ou pelo menos reduzir parcialmente na menopausa, quando ocorre acúmulo de gordura visceral, a qual pode ser prevenida pela terapia de reposição hormonal (HAARBO e cols, 1991; WAJCHENBERG, 2000). A perda sistêmica de estrógenos está associada ao aumento da adiposidade, e conseqüentemente da incidência de doenças metabólicas tanto em humanos (TCHERNOF e cols, 2004) quanto em camundongos (D'EON e cols, 2005). A reposição, somente com estrógenos ou combinada com progesterona, pode prevenir o acúmulo de massa adiposa (REUBINOFF e cols, 1995). Por exemplo, foi descrito no *Women's Health Initiative* que as mulheres que receberam terapia de reposição hormonal ficaram mais magras, mais sensíveis à insulina e menos propensas a desenvolver diabetes tipo II (MARGOLIS e cols, 2004). Essas

observações sugerem uma importante e benéfica função para os estrógenos na regulação energética.

1.1. Metabolismo do tecido adiposo

Tradicionalmente, a principal função do tecido adiposo é armazenar energia sob a forma de triacilgliceróis (TAG), a qual é determinada pelo balanço entre a síntese e a hidrólise destes lipídios (KERSTEN 2001). Nesse tecido, a síntese de TAG depende da disponibilidade e captação de ácidos graxos (AG) liberados das lipoproteínas circulantes pela lipase lipoprotéica (LPL) (GOLDBERG, 1996), da síntese *de novo* (lipogênese) de ácidos graxos dentro do tecido (KERSTEN, 2001), e de um suprimento adequado de glicerol-3-fosfato para a esterificação a TAG (RESHEF e cols, 2003) (**Figura 1**).

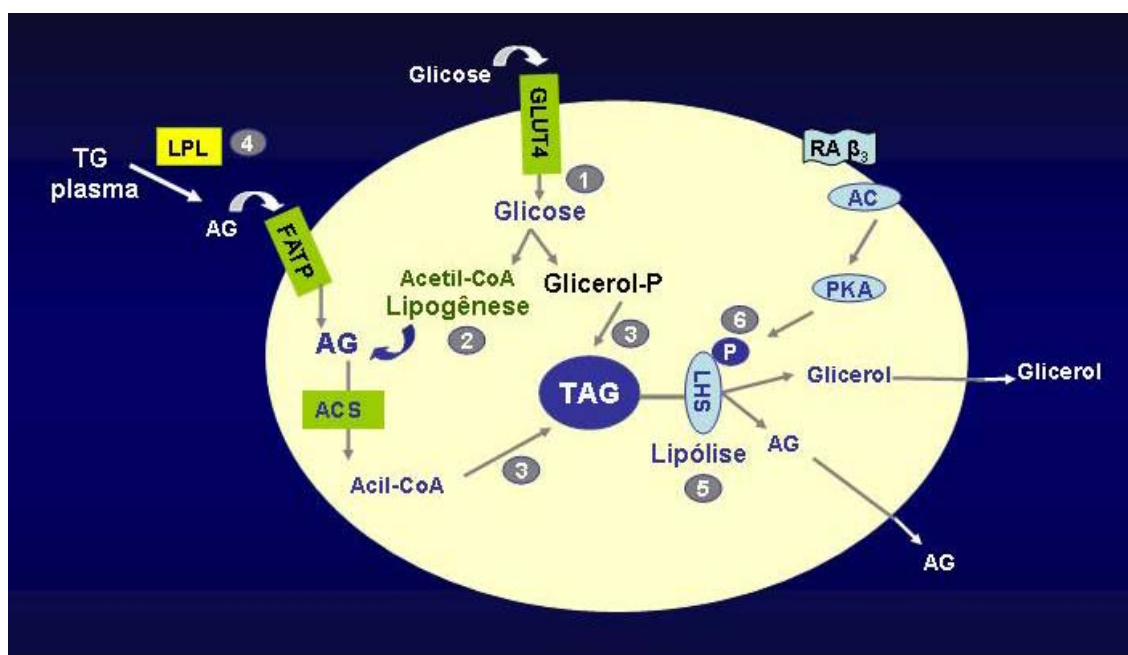


Figura 1. Metabolismo do tecido adiposo. 1. Captação de glicose através do transportador de glicose 4 (GLUT 4); 2. Lipogênese; 3. Síntese dos TAG; 4. Captação de ácidos graxos (AG) liberados das lipoproteínas circulantes pela lipase lipoprotéica (LPL); 5. Lipólise; 6. Ativação da enzima lípase hormônio sensível (LHS) por fosforilação pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA); AC(adenil ciclase; RA β_3 (receptor adrenérgico β_3)).

A disponibilidade aumentada de lipídios e de glicose estimula o transporte de AG e a atividade lipogênica, respectivamente, contribuindo, desta forma, para o aumento da deposição lipídica no tecido adiposo (SPIEGELMAN e cols, 1996). No estado alimentado, os TAG provenientes da dieta são absorvidos e transportados nos quilomicra para o tecido adiposo, onde são hidrolizados pela LPL e os ácidos graxos liberados são captados e armazenados no tecido. O excesso de carboidratos na dieta estimula a síntese *de novo* de ácidos graxos (lipogênese) no fígado e no tecido adiposo (KERSTEN, 2001). Nestes tecidos, a glicose é convertida em piruvato, e então a acetil-CoA e posteriormente a malonil-CoA numa reação catalizada pela acetil-CoA carboxilase, enzima que cataliza o passo limitante da via lipogênica (DENTIN e cols, 2004). Os ácidos graxos sintetizados a partir da malonil-CoA são esterificados a TAG e armazenados no tecido adiposo, ou no caso do fígado, secretados em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (BROWNING e cols. 2004). Os TAG contidos nas VLDL também são hidrolizados pela lipase lipoprotéica e os ácidos graxos são captados e esterificados com glicerol-3-fosfato derivado da glicose, para posterior armazenamento no tecido adiposo (RAJALA e cols, 2003).

A LPL, uma enzima chave no metabolismo das lipoproteínas é sintetizada no tecido adiposo, e translocada ao seu sítio fisiológico de ação nos capilares, onde se liga às cadeias de proteoglicanas heparan sulfato no endotélio vascular (KARPE e cols, 1998). Neste local, a enzima pode atuar sobre as lipoproteínas ricas em TAG (quilomicron e VLDL). A hidrólise dos TAG pela LPL resulta na produção de ácidos graxos, os quais podem ser captados pelo tecido para esterificação ou oxidação ou liberados no plasma complexados à albumina como ácidos graxos não esterificados (AGNE). A atividade da LPL do tecido adiposo varia durante o dia de acordo com o estado nutricional e foi demonstrado que a quantidade de enzima ativa aumenta após uma sobrecarga oral de lipídios (KARPE, 1992). Além disso, verificou-se que a insulina aumenta a atividade da enzima (KARPE, 1992). A captação dos ácidos graxos pelos

adipócitos é realizada por difusão facilitada através de proteínas transportadoras. A CD36 foi descrita como uma das proteínas que facilitam o transporte de ácidos graxos (AITMAN e cols, 1999), e está presente em inúmeras membranas biológicas promovendo o processo de captação de ácidos graxos no coração, músculo esquelético e tecido adiposo. A CD36 apresenta a molécula de ácidos graxos para outra proteína, a proteína transportadora de ácidos graxos (FATP), que como a CD36, é uma proteína integral da membrana e atua como um facilitador da difusão para o interior da célula (ABUMRAD e cols, 1993).

A hidrólise dos TAG armazenados no tecido adiposo também constitui um fator importante na regulação dos estoques de lipídios corporais (**Figura 1**). Em condições de baixa oferta de substratos como durante o jejum, inanição, em períodos de demanda energética aumentada como no exercício, ou em certas condições de estresse observa-se um aumento da lipomobilização e conseqüente liberação de AGNE complexados à albumina, e de glicerol do tecido adiposo para utilização em uma variedade de tecidos, como músculo, fígado e rim. Durante o processo lipolítico, ocorre ativação da enzima lipase hormônio-sensível (LHS) (SZTALRYD e cols, 1995) por fosforilação pela proteína quinase dependente de AMP cíclico em resposta à ativação de receptores β_3 -adrenérgico (STRALFORS e cols, 1983; STRALFORS e cols, 1984; SZTALRYD e cols, 1995).

A ocorrência desses processos depende das necessidades energéticas do indivíduo e é regulada por sinais nutricionais, neurais e hormonais (SPIEGELMAN e cols, 1996). A lipogênese é estimulada por dieta rica em carboidratos (KERSTEN, 2001), inibida por ácidos graxos insaturados (JUMP e cols, 1994) e pelo jejum (KERSTEN, 2001). A insulina constitui o fator hormonal mais importante a influenciar a lipogênese ao estimular a captação de glicose pelas células adiposas, através de recrutamento dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática bem como pela ativação de enzimas glicolíticas e lipogênicas (KERSTEN, 2001). Esses efeitos são obtidos através da ligação da insulina ao seu

receptor na superfície da célula ativando, desta forma, a atividade de tirosina quinase e a indução dos efeitos *downstream*, através da fosforilação da tirosina (LANE e cols, 1990; NAKAE e cols, 1999). Além disso, a insulina também tem efeitos sobre a expressão de genes lipogênicos, provavelmente, através da proteína ligadora do elemento regulado por esterol (SREBP-1) (KERSTEN, 2001). A isoforma SRBP-1c é a principal mediadora da ação insulínica sobre a glicoquinase hepática (responsável pela fosforilação da glicose) e sobre a expressão de genes lipogênicos (FORETZ e cols, 1999).

Estudos recentes mostram que o tecido adiposo desempenha outras funções importantes ao atuar como um órgão endócrino (TRAYHURN e cols, 2001). Foi verificado que os adipócitos secretam proteínas envolvidas numa variedade de funções, incluindo homeostase da glicose, balanço energético e metabolismo dos lipídios, muitos dos quais são regulados pela insulina (TRAYHURN e cols, 2001; ARNER, 2003).

1.2. Obesidade e distribuição regional de gordura

Os adipócitos distribuem-se por dois tipos de compartimentos: o subcutâneo e o visceral, os quais diferem quanto à atividade metabólica. Os compartimentos subcutâneo e visceral constituem 80% e 10% da gordura corporal total, respectivamente (ARNER, 2001), e o restante compreende outros depósitos, tais como retroperitoneal e perirenal. Estudos realizados em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos do sexo masculino mostram que estas células possuem maior atividade lipolítica e resistência ao efeito antilipolítico da insulina, quando comparada com adipócitos proveniente de outros depósitos (KISSEBAH e cols, 1994; BJÖRNTORP 1996; BJÖRNTORP 1990; BOLINDER e cols, 1983).

O aumento da concentração plasmática de AG provenientes do tecido adiposo visceral, e drenados ao fígado pela circulação porta poderiam resultar em alterações do metabolismo

hepático e levar às complicações metabólicas observadas na obesidade (BJÖRNTORP, 1990). Estudos realizados em hepatócitos mostram que o aumento da concentração de AGNE no meio de incubação altera a sensibilidade celular à insulina (HENNES e cols, 1990). Além disso, a exposição do fígado a concentrações elevadas de ácidos graxos é acompanhada por aumento da síntese de apo B e de secreção hepática de VLDL (BJÖRNTORP, 1988).

A expressão do mRNA e atividade da LPL são maiores nas células adiposas glúteo-femorais que nos adipócitos abdominais de mulheres com produção normal de esteróides ovarianos (ARNER e cols, 1991). No que se refere ao processo lipolítico, tem sido verificada uma relação oposta, com o tecido adiposo visceral apresentando maior mobilização de ácidos graxos induzida por catecolaminas (LÖNNQVIST e cols, 1997).

O aumento crônico da concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados está associado à obesidade, ao diabetes tipo 2 e enfatiza o papel do adipócito no desenvolvimento da resistência à insulina (ARNER, 2002; BODEN e cols, 2002). Na obesidade visceral, existe diminuição na supressão da lipólise mediada pela insulina, levando ao aumento na circulação da concentração de AGNE, a qual contribui para resistência periférica e hepática à insulina por prejudicar as vias de sinalização do hormônio. Por exemplo, o aumento da concentração plasmática de AGNE diminui o transporte de glicose mediado por insulina no tecido muscular, por inibição dos eventos de sinalização, levando a redução da translocação do GLUT4 (BODEN e cols, 2002). Os principais alvos da inibição do transporte de glicose mediado pelos AGNEs incluem o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e a proteína quinase C, uma molécula chave envolvida na sinalização da insulina no músculo esquelético (IDRIS e cols, 2002).

Nos adipócitos, a resistência à insulina aumenta a atividade da lipase hormônio sensível (LHS) resultando em hidrólise elevada dos TAG e aumento no influxo de ácidos graxos ao fígado (BROWNING, HORTON, 2004). No fígado, os ácidos graxos podem ser

oxidados na mitocôndria para a produção de ATP, ou serem esterificados a TAG, conforme já mencionado, e incorporados nas partículas de VLDL (BROWNING JD, HORTON JD, 2004). No fígado, a hiperinsulinemia induz a proteína ligante do elemento responsivo ao estero1-1c (SREBP-1c) levando a ativação transcricional dos genes lipogênicos constituindo um ponto regulatório chave, a regulação da acetil CoA carboxilase pela insulina (HORTON e cols, 2002). Simultaneamente, a hiperglicemia ativa a proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP), a qual ativa a transcrição da enzima glicolítica piruvato kinase, e de genes lipogênicos (KAWAGUCHI e cols, 2002). As ações sinérgicas de SREBP-1c e ChREBP ativam as enzimas necessárias para conversão do excesso de glicose para ácidos graxos. No fígado, a consequência da ativação da via lipogênica é o aumento da produção de malonil-CoA, a qual inibe a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), proteína responsável pelo transporte dos ácidos graxos para dentro da mitocôndria (MCGARRY e cols, 1977), com consequente inibição da β -oxidação, aumento dos ácidos graxos e acúmulo de TAG no fígado no estado de resistência à insulina (BROWNING JD, HORTON JD, 2004).

1.3. Tecido adiposo e atividade estrogênica

Embora não se observe síntese *de novo* de estrógenos no tecido adiposo, ele expressa as enzimas e os receptores necessários para a atividade tecidual dos mesmos (SIMPSON e cols, 1997; PEDERSEN e cols, 1996), como por exemplo, a aromatase, uma enzima importante na conversão de androgênios a estrogênios (SIMPSON e cols, 1997).

A via clássica de ação estrogênica, refere-se ao efeito nuclear envolvendo a participação direta dos receptores como fatores de transcrição, sem afetar passos anteriores da ação estrogênica (NADAL e cols, 2001). No que se refere às vias alternativas, a sinalização pode ser iniciada na membrana ou no citosol e resulta em efeitos locais diretos (como modulação da atividade de um canal iônico e excitabilidade celular) ou em efeitos tais como a

regulação da transcrição gênica secundária à ativação de cascatas de sinalização via AMPc ou proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (NADAL e cols, 2001) (**Figura 2**).

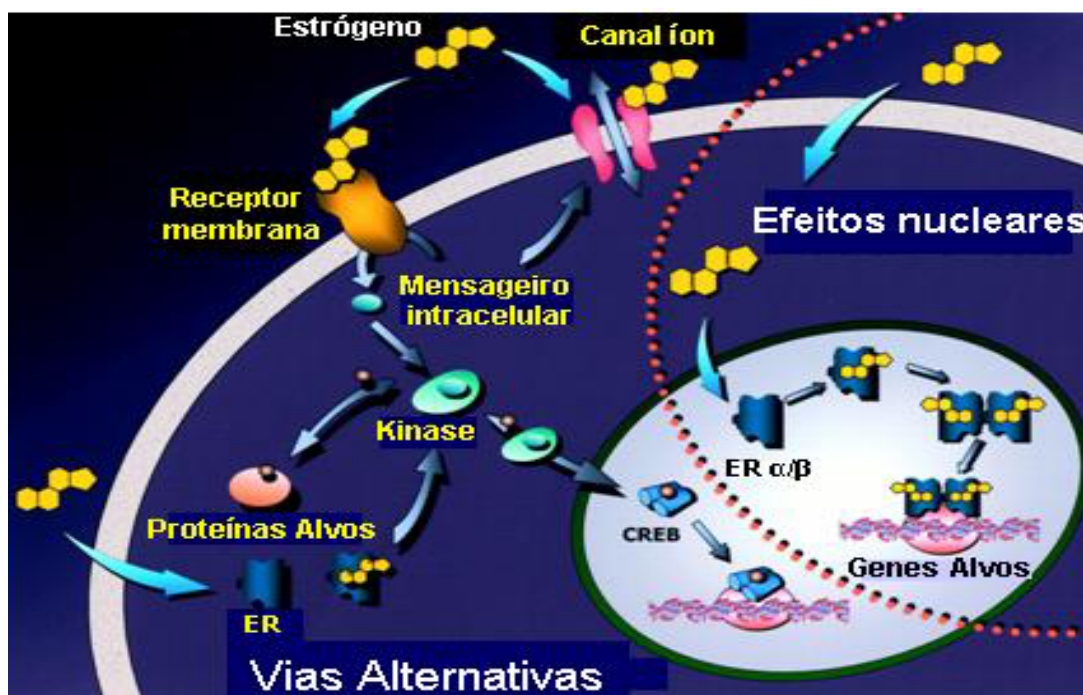


Figura 2. Mecanismos de ação dos estrógenos. Os alvos aparecem em 3 níveis celulares diferentes: **1.** Na membrana incluindo os receptores nucleares clássicos (ER), os ERs não clássicos e os canais iônicos ativados por voltagem e por ligantes. **2.** Alvos citosólicos representados pelos ER α e ER β clássicos. **3.** Alvos nucleares que modulam a expressão gênica. CREB (proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc) (NADAL e cols, 2001).

Um aspecto importante da sinalização por estrógenos foi a identificação de sítios de ligação existentes na membrana de células β -pancreáticas (**Figura 3**). A modulação da secreção de insulina nesta célula pelo 17 β -estradiol (NADAL e cols, 1998) é mediada pelo receptor de membrana denominado γ -adrenérgico, mas não relacionado com os receptores nucleares clássicos (ER), conforme demonstrado em experimento de imunohistoquímica (NADAL e cols, 2000). O efeito dos estrógenos nas células β -pancreáticas determina fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP e a potenciação subsequente dos sinais de cálcio e secreção de insulina através da cascata de sinalização envolvendo GMPC

(NADAL e cols, 2001). O efeito do 17β -estradiol potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose (NADAL e cols, 2001).

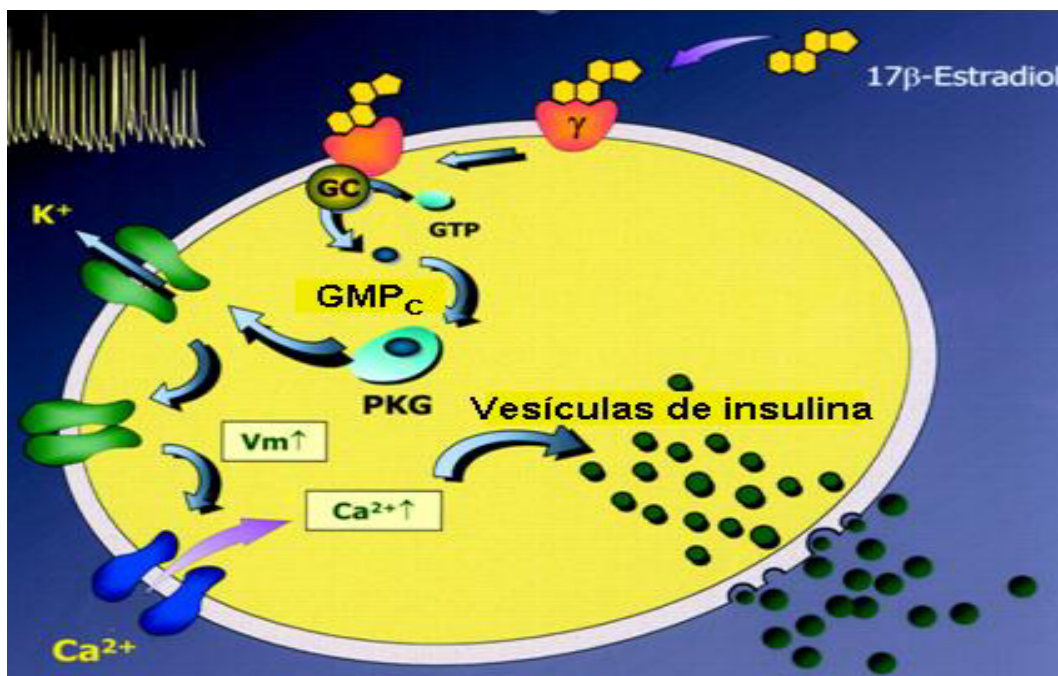


Figura 3. Modulação da secreção de insulina pelo estrógeno. A ligação do 17β -estradiol ao receptor γ -adrenérgico ativa a guanilato ciclase (GC) e subseqüentemente a fosforilação de canais de potássio dependentes de voltagem pela proteína quinase G, (PKG). A fosforilação do canal de potássio resulta em seu fechamento, despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A entrada de cálcio promove a secreção de insulina (NADAL e cols, 2001).

Uma das primeiras evidências da existência de receptores para estrógenos no tecido adiposo foi reportada por WADE e GRAY em 1978. Estes autores demonstraram ligação de alta afinidade do [3 H]-estradiol em extratos citosólicos dos tecidos adiposos parametrial e inguinal de ratas ovariectomizadas. Esses dados indicaram a existência de receptores de estrógenos no tecido adiposo com propriedades semelhantes aos receptores do tecido reprodutivo, porém, em concentrações menores. Estudo posterior destes pesquisadores (GRAY e cols, 1981) revelou a presença de [3 H]-estradiol no núcleo de células adiposas.

Foi verificado que as concentrações de receptores de estrógeno e de progesterona são maiores no tecido adiposo subcutâneo que no visceral, enquanto a concentração dos receptores de andrógenos é maior no visceral que no subcutâneo em camundongos tanto machos como fêmeas. Essas diferenças nas concentrações dos receptores dos hormônios esteróides nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo podem explicar o fato dos homens apresentarem maior acúmulo central de gordura e as mulheres terem maior acúmulo de gordura na região glúteo/femural (MAYES e cols, 2004). Portanto, os efeitos biológicos dos estrógenos nos tecidos-alvos são dependentes da concentração dos receptores estrogênicos e da concentração intracelular dos estrógenos, sendo esta última, dependente da concentração plasmática, da biossíntese e do metabolismo local do hormônio (MIETTINEN e cols, 2000).

Os hormônios sexuais parecem regular vários componentes do sistema de sinalização de membrana, incluindo a cascata do AMPc e a cascata do fosfatidilinositol (MAYES e cols, 2004). Estudos anteriores mostram que o tratamento de adipócitos com estradiol produziu aumento da concentração intracelular de AMPc e da lipólise em 5 minutos (MITZNEGG e cols, 1974). Além disso, foi verificado que a administração de estradiol a fêmeas ovariectomizadas (OVX) aumentou a resposta lipolítica de adipócitos incubados com isoproterenol, epinefrina entre outros, a qual foi acompanhada por aumento da concentração de AMPc e atividade da adenil ciclase (PASQUIER e cols, 1988). Estas respostas para os estrógenos parecem ser depósito-específicas, pois a ovariectomia causa uma diminuição na produção de AMPc em adipócitos parametriaes de ratas, mas não em adipócitos subcutâneos.

A cascata do fosfatidilinositol, também parece ser regulada pelos hormônios esteróides sexuais. Verificou-se que o conteúdo de proteína quinase C, em células adiposas subcutâneas e parametriaes de ratas foi reduzido pela ovariectomia e restaurado por tratamento com estradiol e progesterona (LACASA e cols, 1994). Além disso, foi demonstrado que os estrógenos ativam a via das MAPK em adipócitos de ratos (LACASA e cols 1997). Foi

postulado que esta via envolve ER α de membrana, proteína G, proteína quinase C e MAP quinase quinase (MEK) (DOS SANTOS e cols, 2002).

1.3.1. Estrógenos e adipogênese

A adipogênese é entendida como a capacidade de pré-adipócitos, presentes no parênquima do tecido, se diferenciarem em novos adipócitos e reconstituírem o tecido. Mudanças do número de adipócitos ocorrem mediante um complexo arranjo de eventos que envolvem proliferação e diferenciação dos pré-adipócitos (FONSECA-ALANIZ e cols, 2006). A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado. Fatores de transcrição adipogênicos incluindo o PPAR γ , a proteína ligadora do elemento regulado por esterol (SREBP) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/*enhancer binding protein* – C/EBPs) desempenham um papel chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante adipogênese (FREYTAG e cols, 1994; HU e cols, 1995). A insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), o hormônio de crescimento e os glicocorticóides são sinais positivos importantes para diferenciação do adipócito *in vivo* e *in vitro* (AILHAUD e cols, 1994; SMAS e cols, 1995).

Os pré-adipócitos são linhagens celulares derivadas de células-tronco embrionárias multipotentes de origem mesodérmicas, com capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteoblastos e miócitos (KONIECZNY e cols, 1984; TOMLINSON, STEWART, 2002) (**Figura 4**).

As isoformas do C/EBPs (α , β e δ) são altamente expressas no adipócito e são induzidas durante a adipogênese. O C/EBP α tem um papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e atua na conversão de fibroblastos em adipócitos (HU e cols, 1995). O C/EBP β também induz adipogênese, possivelmente por estimular a expressão do receptor γ ativado por proliferadores dos peroxissomos (PPAR γ), cujo gene contém sítios

C/EBP na sua região promotora (TONTONAZ e cols, 1994b). O envelhecimento é um processo caracterizado pelo declínio funcional de muitos sistemas, incluindo o tecido adiposo branco, que se reduz em indivíduos idosos. A capacidade de pré-adipócitos em se diferenciar e acumular lipídios diminui com a idade (KIRKLAND e cols, 1994).



Figura 4. Esquema do processo de diferenciação do adipócito (TOMLINSON, STEWART, 2002).

A função dos hormônios sexuais na adipogênese é ainda pouco entendida. Tem sido descrito que no tecido adiposo humano, os estrógenos modulam a adipogênese *in vitro* por aumentar a replicação de pré-adipócitos (RONCARI e cols, 1978) sem alterar o processo de diferenciação (HAUNER e cols, 1987). Outros trabalhos realizados em fêmeas OVX mostraram que o 17 β -estradiol produziu um efeito positivo sobre a capacidade proliferativa de pré-adipócitos subcutâneos, mas não de parametriaes (DIEUDONNE e cols, 2000).

Os efeitos biológicos dos hormônios esteróides são principalmente mediados por seus receptores específicos. Os receptores de estrógenos e andrógenos são expressos em pré-adipócitos e adipócitos de ratos (PEDERSEN e cols, 1991; DIEUDONNE e cols, 1995) e humanos (MIZUTANI e cols, 1994; MILLER e cols, 1990). Nestas células, os números de receptores de estrógenos e andrógenos são variáveis de acordo com a origem anatômica (DIEUDONNE e cols, 1995; JAUBERT e cols, 1995) sugerindo que pré-adipócitos e adipócitos são células-alvo para os hormônios sexuais.

1.4. Tecido adiposo e leptina

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo que influencia a deposição de lipídios neste tecido. Este hormônio foi identificado como o produto de um gene designado OB (obeso), e desempenha papel importante na regulação da ingestão alimentar, gasto energético e peso corporal (ZANG e cols, 1994). A leptina afeta principalmente o tecido adiposo, inibindo a lipogênese (SIEGRIST-KAISER e cols, 1997) e promovendo oxidação e catabolismo dos TAG, e em doses elevadas produz depleção total do tecido adiposo branco (HALAAS e cols, 1997). Esses efeitos são obtidos, em parte, por redução da expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e de TAG (SOUKAS e cols, 2000).

A ovariectomia tem sido descrita por alguns autores como causadora de diminuição da expressão do gene da leptina no tecido adiposo branco de ratas e essa diminuição pode ser revertida pela reposição com estrógenos (SHIMIZU e cols, 1997; YONEDA e cols, 1998; BRANN e cols, 1999). Por outro lado, outros estudos mostram que a reposição com estrógeno não altera a expressão do gene da leptina nesses tecidos (WU PENG e cols, 1999; LUKKAA e cols, 2001). Essas discrepâncias poderiam ser causadas por diferenças na regulação da secreção de leptina por sítios diferentes de tecidos adiposos. SHIMUZU e cols (1997) mostraram que embora a expressão de gene da leptina diminua no tecido adiposo branco

subcutâneo e retroperitoneal de ratas ovariectomizadas, a expressão do gene da leptina aumentou no tecido adiposo branco mesentérico desses animais. MACHINAL e cols (1999) observaram que ovariectomia diminuiu em 25% a expressão da leptina em adipócitos perirenais. Trabalhos nos quais os adipócitos de fêmeas ovariectomizadas foram expostos por 24 horas ao 17β -estradiol mostraram aumento da expressão do gene *ob* e aumento da secreção de leptina por células do tecido adiposo subcutâneo, perirenal e parametrial (MAYES, 2004). Esse aumento pode ser prevenido por antiestrógenos e actinomicina (KRISTENSEN e cols, 1999). Portanto a distribuição regional do tecido adiposo pode influenciar acentuadamente os níveis de leptina e sua regulação pelos hormônios esteróides (MAYES e cols, 2004). Também foi verificado que a leptina estimula a produção de estrógenos através do aumento da expressão e atividade da aromatase em células da granulosa e células adiposas (CATALANO e cols, 2003).

1.5. Receptores ativados por proliferadores dos peroxissomos (PPARs)

O controle do metabolismo lipídico e a homeostase da glicose são processos complexos que envolvem a expressão coordenada de numerosos genes. A expressão destes genes pode ser regulada através de fatores de transcrição ativados por ligantes, denominados receptores nucleares, os quais respondem a sinais de moléculas lipofílicas. Entre estes receptores nucleares, os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) desempenham uma função importante no metabolismo quando ativados por ácidos graxos e seus derivados (BOCHER e cols, 2002). Esses receptores foram identificados em 1990 quando a isoforma α (PPAR α) demonstrou ser um receptor de xenobióticos capaz de induzir a proliferação de peroxissomos no fígado de roedores. Posteriormente, outros genes dos PPARs foram identificados, o PPAR γ e PPAR β (também chamado de PPAR δ) (BOCHER e cols, 2002).

Os receptores nucleares reconhecem e se ligam ao DNA em sítios específicos chamados de elementos responsivos, os quais consistem de duas seqüências de hexanucleotídeos (AGGTCA) intercaladas por um ou dois espaços e um nucleotídeo (STAELS e cols, 1998). Após ativação por seus respectivos ligantes, os PPARs formam heterodímeros com o receptor retinóico X (RXR), o qual é ativado pelo ácido 9cis-retinóico,

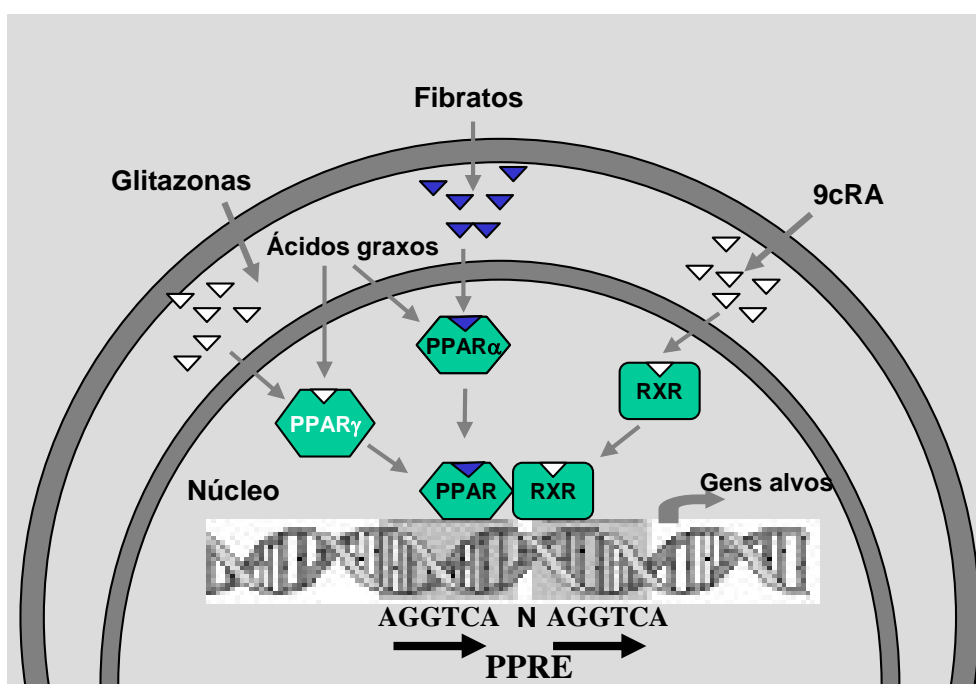


Figura 5. Ativadores naturais e sintéticos dos PPARs. Após ativação pelos seus respectivos ligantes, os PPARs heterodimerizam com o receptor retinóico X (RXR), e então se ligam aos elementos responsivos específicos na região regulatória dos genes alvos denominados PPREs. 9cRA, ácido 9cis-retinóico (STAELS e cols, 1998).

e liga-se aos elementos responsivos dos PPARs denominados PPREs (**Figura 5**). O complexo (PPAR-RXR), depois de ligado nos elementos responsivos, pode ativar ou reprimir a expressão de vários genes (STAELS e cols, 1998).

Dentre os vários ligantes dos PPARs já identificados, os ácidos graxos de cadeia longa são os ligantes naturais das três isoformas (WILLSON e cols, 1997). Os fibratos, uma classe

de drogas hipolipidêmicas são agonistas sintéticos dos PPAR α , enquanto que as glitazonas são os ligantes de alta afinidade para PPAR γ (WILLSON e cols, 1997).

A relação entre os PPARs e obesidade tem incentivado as pesquisas sobre estes fatores de transcrição, devido à sua importância na regulação do metabolismo energético (KERSTEN, 2002). O PPAR γ é a isoforma mais expressa no tecido adiposo. Foram identificadas duas isoformas do PPAR γ : o PPAR γ_1 e o PPAR γ_2 . Este último tem 30 aminoácidos adicionais na porção N-terminal que confere a ele um domínio de ativação independente de ligantes, tornando-o mais efetivo na ativação da transcrição do gene (ZANG e cols, 2004; VIDAL-PUIG e cols, 1997).

O PPAR γ estimula tanto adipogênese durante a fase de diferenciação celular, quanto a deposição lipídica na fase adulta (KERSTEN, 2002); além de melhorar a ação da insulina (SCHIFFRIN e cols, 2003) e induzir apoptose em adipócitos maduros de ratos obesos Zucker (OKUNO e cols, 1998). Verificou-se, que o PPAR γ é um potente estimulante da cascata de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos em cultura, onde ele atua sinergicamente com C/EBP α para promover (TONTONOZ e cols, 1994) ou para induzir a diferenciação de fibroblastos em adipócitos (HU e cols, 1995). Foi demonstrado que a ativação do PPAR γ induz acentuadamente a expressão gênica da gliceroquinase (GUAN e cols, 2002), a gliceroneogênese (TORDJMAN e cols, 2003) resultando em aumento do fornecimento de glicerol-3-fosfato e conseqüente aumento da re-esterificação de ácidos graxos no tecido adiposo (BOTION e cols, 1995; RESHEF e cols, 2003) e fígado (BOTION e cols, 1998; RESHEF e cols, 2003). Os agonistas do PPAR γ , como tiazolidienodionas e seus derivados rosiglitazonas, troglitazonas e pioglitazonas melhoraram a sensibilidade insulínica, e por isso têm sido usadas como antidiabéticos eficientes (SCHIFFRIN e cols, 2003).

O PPAR α é um alvo nuclear para os ácidos graxos, drogas hipolipidêmicas (fibratos) (PATSOIRIS e cols, 2004) e está envolvido em vários aspectos da função mitocondrial, incluindo biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos (GULICK e cols, 1994). O PPAR α é expresso principalmente em tecidos ricos em mitocôndrias, tais como o fígado, músculo, tecido adiposo marrom e rim, e parece coordenar um programa genético que adapta os tecidos à oxidação de ácidos graxos (GULICK e cols, 1994). Em roedores, o PPAR α regula a expressão de genes envolvidos na captação de ácidos graxos, ativação dos ésteres acil-CoA, β -oxidação mitocondrial e peroxissomal bem como a síntese de corpos cetônicos (STAELS e cols, 1995). As concentrações intracelulares de ácidos graxos são controladas por proteínas transportadoras, como a FAT/CD36 e FATP1 que controlam a entrada de ácidos graxos através da membrana celular; e pela acil-CoA sintetase (ACS) que mantém os ácidos graxos dentro da célula através da conversão para derivados de ésteres (BOCHER e cols, 2002). Os ativadores do PPAR α induzem a expressão da carnitina palmitoil-transferase I (KERSTEN e cols, 1999) no músculo e fígado, favorecendo, desta forma, a captação e oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Através desses efeitos sobre a expressão dos transportadores e dos genes que expressam as enzimas envolvidas na oxidação, os agonistas do PPAR α aumentam a oxidação e diminuem a quantidade de ácidos graxos disponíveis para síntese de TAG (BOCHER e cols, 2002).

Desta forma, o PPAR γ modula a homeostase lipídica promovendo a diferenciação dos pré-adipócitos e armazenamento de lipídios no tecido adiposo, enquanto o PPAR α regula a oxidação dos ácidos graxos e o metabolismo do glicerol, estimulando a conversão de glicerol para glicose no fígado (PATSOIRIS e cols, 2004) (**Figura 6**).

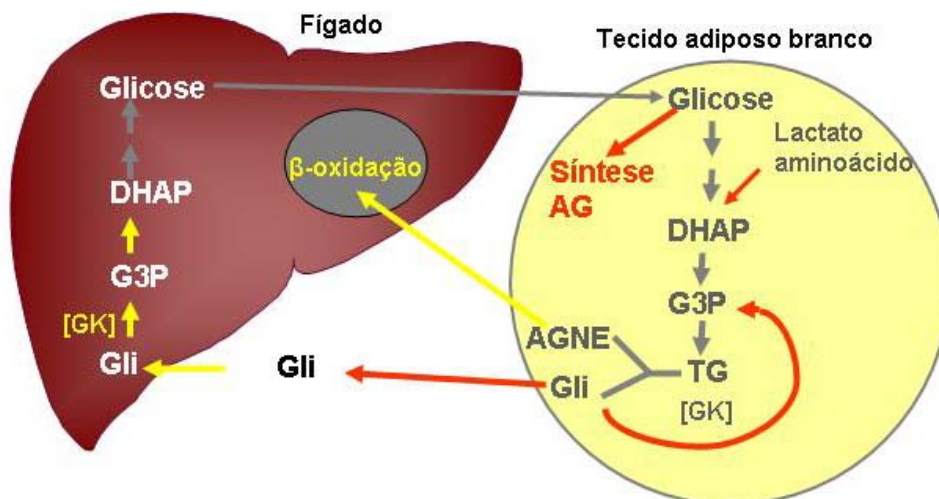


Figura 6. Função dos PPARs no controle do metabolismo dos TAG (TG), dos ácidos graxos (AG) e do glicerol. As setas em vermelho representam as vias reguladas pelo PPAR γ e setas amarelas pelo PPAR α . Gli, glicerol; AG, ácidos graxos; AGNE, ácidos graxos não esterificados; GK, gliceroquinase; DHAP, dihidroxiacetonafofato; G3P, glicerol 3-fosfato (PATSOURIS e cols, 2004).

1.6. Modelos de estudo

1.6.1 Menopausa: ovariectomia

A ovariectomia ou a perda da função ovariana devido à menopausa diminui a concentração de estrógenos, aumenta o peso corpóreo e a massa de tecido adiposo branco em animais (PALLIER e cols, 1980) e humanos (TONKELAAR e cols, 1989), os quais são revertidos pela reposição hormonal (MAYES e cols, 2004; HAARBO e cols, 1991). Tem sido verificado que a prevalência de síndrome metabólica aumenta com a menopausa o que pode explicar parcialmente a aceleração de doenças cardiovasculares após menopausa (CARR, 2003). A transição de pré- para pós-menopausa está associada ao aparecimento de muitas características da síndrome metabólica incluindo a obesidade central (intra-abdominal), aumento do peso corporal, hipertensão, e mudança para um perfil lipídico mais aterogênico, além de aumento dos níveis plasmáticos de glicose e de insulina (DESPRES, 1993). O aparecimento destes fatores de risco pode ser resultado direto da falência ovariana ou, pode

ser conseqüente às alterações metabólicas resultantes da redistribuição de gordura central pela deficiência de estrógenos (CARR, 2003). Um melhor entendimento dessas alterações metabólicas durante a menopausa ajudará no reconhecimento e tratamento de mulheres com risco para doenças cardiovasculares contribuindo para intervenções mais apropriadas (CARR, 2003).

1.6.2 Linhagem de rato espontaneamente hipertenso (SHR)

Não está claro se a transição à menopausa aumenta o risco de doenças cardiovasculares em todas as mulheres ou somente naquelas que desenvolvem as características da síndrome metabólica. Desta forma, avaliamos no presente estudo, os efeitos dos estrógenos sobre o processo de deposição lipídica em fêmeas espontaneamente hipertensas (SHR), uma vez que existem poucos estudos na literatura sobre o assunto.

A linhagem de rato espontaneamente hipertenso (SHR) é um modelo experimental da síndrome metabólica humana, na qual a hipertensão arterial está associada à dislipidemia e redução da utilização de glicose mediada pela insulina (REAVEN e cols, 1989; AITMAN e cols, 1997; CESARETTI e cols, 2006). Nesta linhagem, assim como na hipertensão essencial humana, o aumento da pressão arterial se dá de forma progressiva, e a hipertensão arterial se associa com outros fatores de risco, como a hipertrofia ventricular esquerda, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e intolerância à glicose (PRAVENEK e cols, 2004). A resistência à insulina tem sido atribuída também à maior atividade adrenérgica verificada nesses animais, a qual diminui a sensibilidade à insulina, por promover inibição direta da cascata de transdução do sinal e conseqüentemente menor translocação do GLUT4 para a membrana celular, determinando desta maneira, a hiperglicemia (CHIAPPE e cols, 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar a influência do estradiol sobre o metabolismo lipídico de diferentes sítios de tecido adiposo de ratas controle (Wistar-Kyoto) e espontaneamente hipertensas (SHR).

2.2. Objetivos específicos

Em ratas Wistar e SHR, ovariectomizadas e tratadas ou não com estradiol:

- a) Medir a pressão arterial dos animais;
- b) Avaliar a ingestão alimentar, peso corporal e dos tecidos e celularidade;
- c) Determinar os níveis de triglicerídeos, glicerol, insulina e glicose no sangue;
- d) Avaliar *in vitro*, a sensibilidade à insulina do sistema de transporte de glicose e o efeito antilipolítico da insulina;
- e) Avaliar a captação das lipoproteínas circulantes através da medida da atividade da lipase lipoprotéica;
- f) Determinar a expressão de leptina, PPAR γ e PPAR α nos tecidos adiposos e órgãos.

3. Material e métodos

3.1. Animais e seu tratamento

Foram utilizadas ratas Wistar-Kyoto (WKY) normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR) com aproximadamente três meses de idade e pesando cerca de 200 g, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia-CEDEME da UNIFESP, São Paulo, SP. O protocolo experimental foi aprovado pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA) da UFMG, sob número 064/03. As ratas foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- WKY e SHR intactas,
- WKY castradas, tratadas com estradiol,
- WKY castradas, tratadas com veículo,
- SHR castradas, tratadas com estradiol,
- SHR castradas, tratadas com veículo.

Esses grupos (4 animais por caixa) foram mantidos em ambiente com controle de luz (14 horas luz, das 6 às 20 h) e temperatura (23 ± 3 °C) tendo livre acesso à água e ração. Com a finalidade de caracterizar o estado hipertensivo, foram realizadas pelo menos 3 medidas pressóricas de cada animal através do método de pletismografia de cauda (modelo do aparelho: RT BP 2000 - *Kent Scientific*, USA).

As ratas foram submetidas a ovariectomia bilateral e após um período de três semanas, os animais receberam tratamento com estradiol ou veículo por quatro dias. No quinto dia, as ratas foram sacrificadas por decapitação e os tecidos adiposos (periuterino, mesentérico e retroperitoneal), fígado, coração e rim removidos e utilizados imediatamente ou congelados em nitrogênio líquido e conservados em congelador a -80 °C. O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados ou citratados para obtenção de plasma.

3.2. Ovariectomia e reposição hormonal

Após anestesia com tribromoetanol a 2,5% (1 mL da solução para cada 100 g de peso corporal) foram feitas incisões em ambos os flancos, para a remoção dos ovários e a pele foi suturada, de acordo com técnica corrente em endocrinologia. Para reposição hormonal foi utilizado benzoato de estradiol (Benzoginoestril, SARSA – Hoechst Marion Roussel) diluído em óleo de milho. Foi administrada a dose de 5 µg/0,1 mL por 100 g de peso corporal, durante quatro dias consecutivos, transfixando-se a massa muscular da coxa traseira das ratas (BELO e cols. 2004). Os animais controle receberam 0,1 mL de óleo de milho por 100 g de peso corporal durante o mesmo período.

3.3. Isolamento de adipócitos

As ratas foram sacrificadas por decapitação e os adipócitos isolados a partir dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico, conforme descrito por RODBEL (1964). Após digestão com colagenase as células foram filtradas, lavadas três vezes com tampão HEPES 30 mmol/L (pH 7,4) contendo NaCl 137 mmol/L, KCl 5 mmol/L, NaHCO₃ 4,2 mmol/L, CaCl₂ 1,3 mmol/L, MgCl₂ 0,5 mmol/L, MgSO₄ 0,5 mmol/L, KH₂PO₄. Em seguida, as células foram ressuspensas na proporção de 1 grama de tecido para 20 mL de tampão, de modo que cada mL do meio continha 50 mg de células, e utilizadas para os estudos de lipólise, captação de glicose, medida do número e do diâmetro celular.

3.4. Estudo de lipólise

A liberação de glicerol para o meio de incubação foi utilizada como índice lipolítico. Os adipócitos foram incubados em condições basais ou estimulados pelo isoproterenol (0,1 µmol/L) ou 0,1 µmol/L de isoproterenol mais diferentes concentrações de insulina regular

(0,1 a 25 ng/mL) durante 60 minutos. Ao término do período de incubação, uma alíquota do infranadante foi colhida e a concentração de glicerol foi medida por espectrofotometria.

3.5. Diâmetro e número de células

A suspensão de células de adipócitos, preparadas no ponto 3.3, foram analisadas em câmara de Neubauer. O diâmetro das células foi medido no quadrante interno e o número de células foi contado nos 4 quadrantes externos da câmara. Para o cálculo do número de células utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas}) \div (\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}) \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$$

3.6. Captação de glicose

A captação de 2-deoxy-[³H]glucose foi utilizada para determinar a sensibilidade insulínica sobre a captação de glicose (Botion e cols, 1999). Os adipócitos (~200.000) foram incubados em condições basais e estimuladas pela insulina (2,5 ng/mL) e a captação de 2-deoxy-[³H]glucose foi avaliada após 3 minutos de incubação. Logo após, as células foram separadas do meio de incubação através de centrifugação em tubos contendo óleo de silicone, e a radioatividade contida nos adipócitos foi determinada por cintilação líquida.

3.7. Medida da atividade da lipase lipoprotéica

A lipase lipoprotéica foi extraída dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico em tampão tris-HCl contendo detergentes (IVERIUS e cols, 1986). A atividade da enzima foi determinada no homogenato, através da hidrólise do substrato contendo [9,10-³H]trioleína

emulsificada com lecitina (NILSSON-EHLE e cols, 1976), e contendo soro de rato em jejum por 24 h como fonte de apolipoproteína CII. O ensaio enzimático fundamenta-se na reação:



A reação foi interrompida pela adição da mistura clorofórmio-metanol-heptana na proporção 1,41:1,25:1(v/v/v) (BELFRAGE e cols, 1969), e os [³H]-ácidos graxos liberados por atividade da enzima, foram quantificados por espectrometria de cintilação líquida.

3.8. Extração e determinação do glicogênio hepático

O glicogênio hepático foi extraído de 0,5 g de tecido em KOH 30%, submetido a fervura em banho-maria, por 1 hora e após retirar do banho acrescentou-se 5 gotas de Na₂SO₄ saturado e 4,5 mL de etanol absoluto para tornar a solução alcoólica a 70%. Após centrifugação a 2000xg por 10 minutos o sobrenadante foi decantado e lavado 2 vezes com água e etanol e posteriormente diluído 100 vezes com água destilada. Para determinação do glicogênio utilizou-se o método da antrona (HASSID, 1957) e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 620 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de glicogênio por 100 mg de fígado (%).

3.9. Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O RNA total foi extraído com TrizolTM (Life Technologies) e posterior extração com clorofórmio-isopropanol conforme protocolo do fabricante. Para reação da transcriptase reversa, foi utilizado kit da Pharmacia/Biotech para síntese do cDNA. O cDNA foi então amplificado para a leptina, PPAR γ e PPAR α utilizando iniciadores específicos. Como

controles da quantidade de RNA utilizado, foram determinados também os níveis de expressão de beta-actina de cada uma das amostras. Foram utilizados os seguintes iniciadores:

Leptina

5'CCTGCTCCAGCAGCTGCAAG3' (Sense)

5''CATGATCCTCGGGAGCCCG3' (Anti-sense)

Beta-actina

5'CGAGGCCAGAGCAAGAGAG3' (Sense)

5'AGGAAGAGGATGCGGCAGTGG3' (Anti-sense)

PPAR γ

5'TTATGGGTGAAACTCTGGG3' (Sense)

5'CAACCATTGGGTCAGCTC3 (Anti-sense)

PPAR α

5'GGCCCGGGTCATACTCGC3' (Sense)

5'CAGTACATGTCTCTGTAGATC3 (Anti-sense)

As amostras eram então submetidas ao seguinte protocolo de incubação:

- 1) 95⁰ C por 4 minutos,
- 2) 95⁰ C por 45 segundos,
- 3) 1 min e 30 seg, a 60⁰ C para a leptina e PPAR α e a 51⁰ C para PPAR γ e 62⁰ C para β -actina,
- 4) 72⁰ C por 1 minuto,
- 5) Repetir as etapas de 2 a 4 por 36 vezes,
- 6) 72⁰ C por 5 minutos para assegurar o processo completo de extensão final.

As amostras provenientes do PCR foram aplicadas em gel de agarose a 1% e após corrida eletroforética a 100 volts por 45 minutos, a banda de interesse foi visualizada com os seguintes pares de base (pb): leptina, 536; PPAR α , 735; PPAR γ , 272 e β -actina, 536.

3.10. Dosagens bioquímicas

O glicerol liberado no meio de incubação, a glicose e os triglicerídeos plasmáticos foram quantificados por métodos enzimáticos (LABTEST, Lagoa Santa, MG). A insulina foi quantificada por radioimunoensaio utilizando o kit LINCO research (Saint Louis, Missouri, EUA). Para a medida da concentração plasmática de glicerol utilizou-se kit enzimático gentilmente fornecido pelo Dr. Leonides Rezende Junior da KATAL diagnóstica (Belo Horizonte, MG).

3.11. Análise dos dados

As comparações estatísticas entre vários grupos foram feitas por ANOVA *one way* seguida de Newman-Keuls. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste t de student. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Pressão sanguínea

Os resultados apresentados na **Figura 7** mostram que as fêmeas SHR utilizadas nos experimentos apresentaram pressão arterial sistólica superior ao grupo WK utilizado como controle, em todos os tratamentos a que foram submetidas.

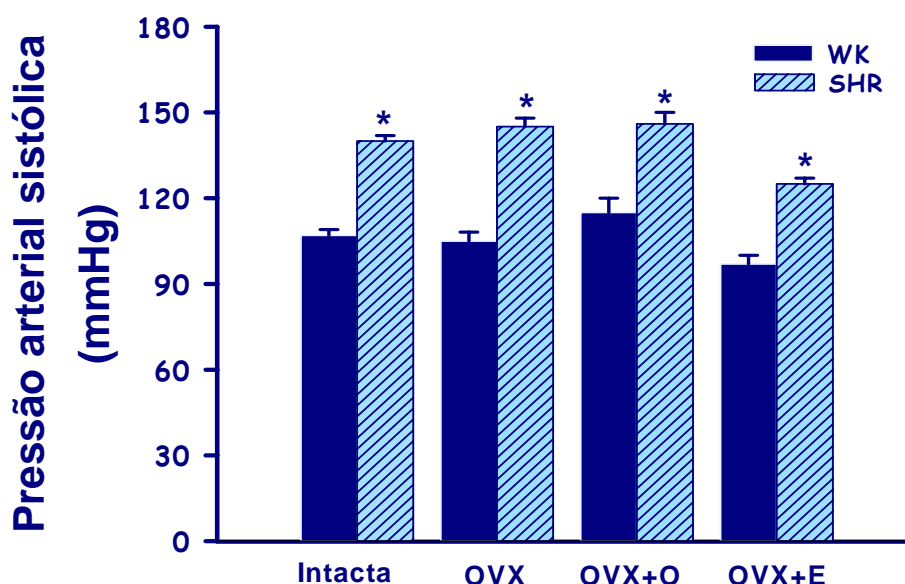


Figura 7. Pressão arterial sistólica de ratos WK e SHR intactas e ovariectomizadas (OVX) submetidas ou não a tratamento com veículo (OVX+O) ou com estradiol (OVX+E). * $P < 0,05$ vs WK; $N = 6$.

Quanto ao efeito dos diferentes tratamentos sobre a pressão arterial sistólica de ratos WK não foram observadas diferenças significativas. No que se refere ao grupo SHR, verificou-se que a administração de estradiol reduziu significativamente a pressão arterial sistólica destes animais, mas não o suficiente para atingir os níveis de pressão normais observados nos animais controle WK.

4.2. Ingestão alimentar

A reposição com estradiol nas ratas WK provocou uma diminuição significativa da ingestão alimentar, o que não foi observado nas ratas SHR. Nas SHR verificou-se que, independente do tratamento a ingestão alimentar foi superior à das ratas WK (**Figura 8**).

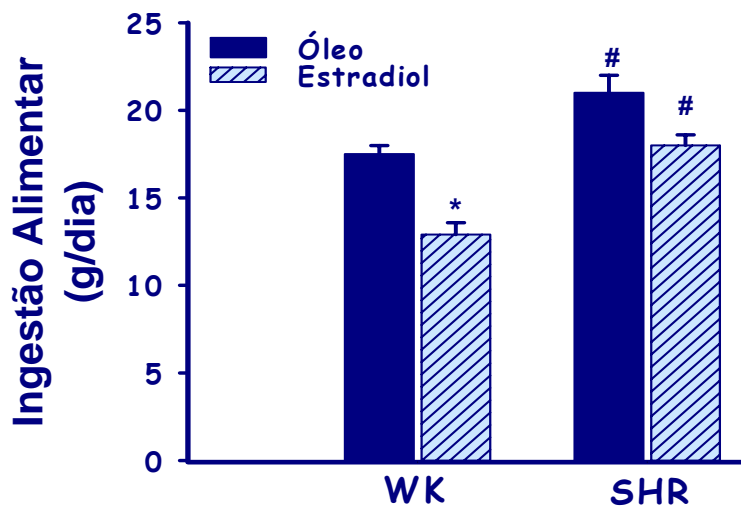


Figura 8. Ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas Wistar e SHR após reposição com estradiol e óleo. * $P < 0,05$ vs Óleo; # $P < 0,05$ vs WK ($N=4$)

4.3. Peso corporal

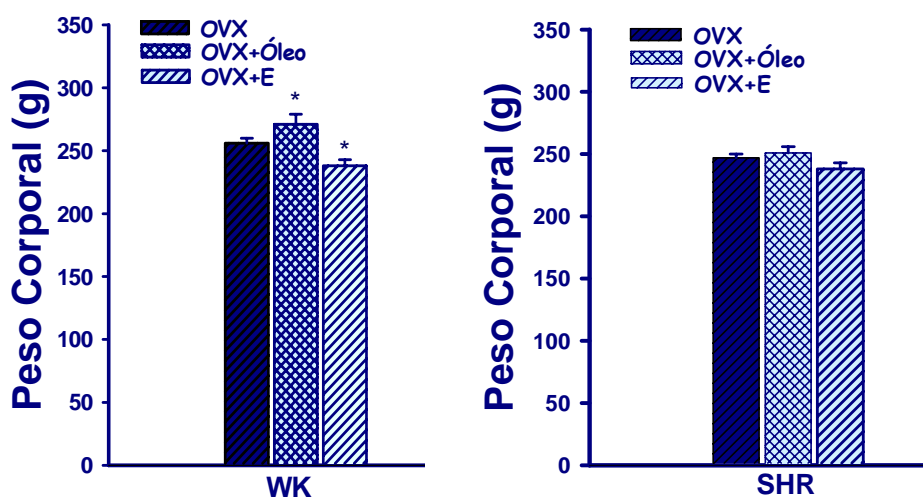


Figura 9. Peso corporal de ratas WK e SHR ovariectomizadas, após reposição com estradiol ou óleo. * $P < 0,05$; $N=8$.

Foi observado no grupo WK que a ovariectomia seguida de administração do veículo produziu aumento de peso corporal e que o tratamento com estradiol diminuiu significativamente o peso destes animais. Entretanto não foram observadas alterações nas fêmeas SHR (Figura 9).

4.4. Peso dos tecidos adiposos, número e diâmetro celular

O tratamento com estradiol reduziu significativamente o peso dos tecidos adiposos periuterino e retroperitoneal tanto das ratas WK, quanto das SHR ovariectomizadas. O peso dos tecidos adiposos das ratas SHR, independentemente do tratamento utilizado, é acentuadamente menor do que o das fêmeas WK (**Figura 10**).

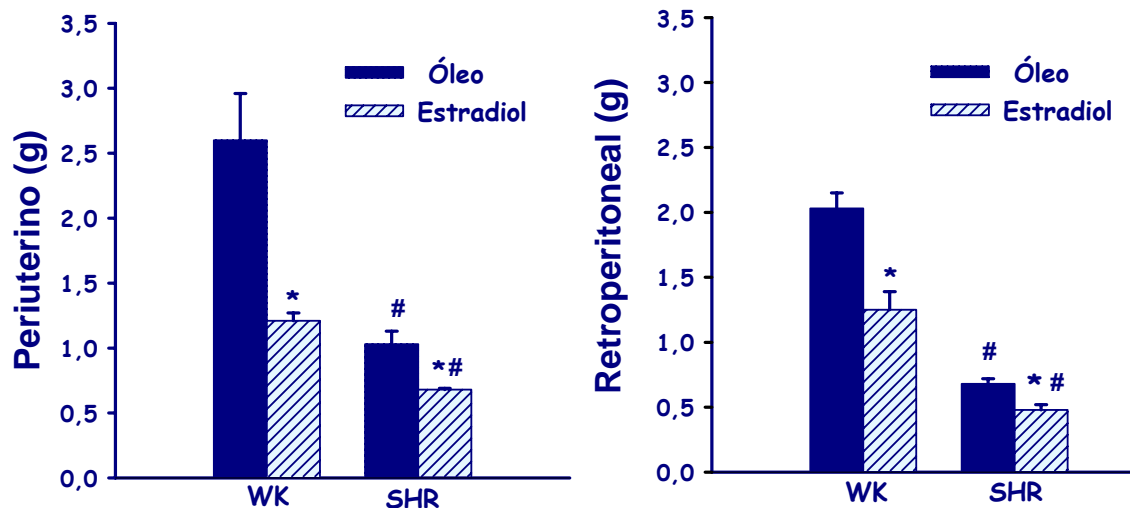


Figura 10. *Peso dos tecidos adiposos periuterino e retroperitoneal de ratas WK e SHR ovariectomizadas e tratadas com óleo ou estradiol. * $P < 0,05$ vs óleo; # $P < 0,05$ vs WK (N = 3).*

Os dados da **Tabela 1** mostram o número e diâmetro dos adipócitos isolados a partir dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico. Conforme pode ser observado, a administração de estradiol reduziu o diâmetro celular nos dois grupos de animais e nos dois tecidos adiposos utilizados. No que se refere ao número de células, verificou-se que a administração de estradiol aumentou o número de células apenas nos tecidos das fêmeas WK. O número de células nos tecidos das SHR foi maior (50 a 300%) que nos tecidos das WK, independentemente do tratamento. Também pode ser observado que o número de células do tecido mesentérico é superior ao do periuterino nos dois grupos de animais.

Tabela 1. Número e diâmetro de adipócitos isolados a partir dos tecidos adiposo periuterino e mesentérico de ratas WK e SHR

Tecido adiposo	Tratamento	WK		SHR	
		Diâmetro (μm)	Nº de células ($\times 10^{-3}$)	Diâmetro (μm)	Nº de células ($\times 10^{-3}$)
Periuterino	Veículo (óleo)	97 ± 2	57 ± 4	75 ± 1	147 ± 28
	Estradiol	$75 \pm 1^*$	$105 \pm 15^*$	$69 \pm 2^*$	167 ± 13
Mesentérico	Veículo (óleo)	68 ± 1	$92 \pm 6^\#$	$60 \pm 1^\#$	$278 \pm 18^\#$
	Estradiol	$63 \pm 1^*$	$171 \pm 16^{*\#}$	$54 \pm 1^{*\#}$	$299 \pm 40^\#$

* $P < 0,05$ vs óleo; $^\# P < 0,05$ vs periuterino ($n = 4$).

As **Figuras 11** e **12** representam a distribuição de freqüência dos diâmetros das células adiposas periuterinas e mesentéricas. Conforme pode ser observado, a administração de estradiol deslocou a curva de distribuição de freqüência das células adiposas periuterinas (**Figura 11A**) e mesentéricas (**Figura 12A**) para a esquerda nos animais WK.

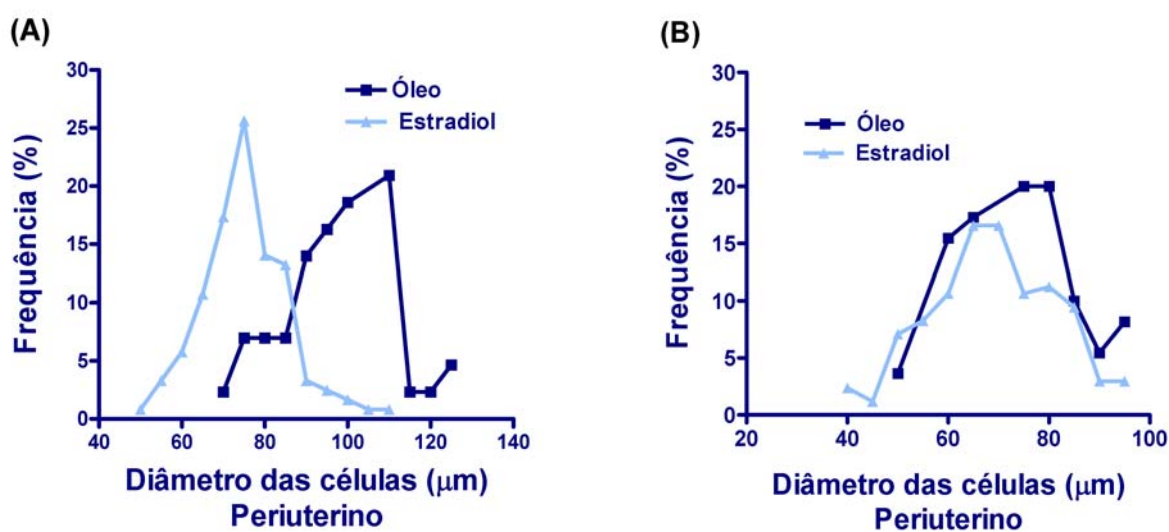


Figura 11. Diâmetro das células adiposas do tecido periuterino de (A) WK e (B) SHR. $N = 4$.

Nas fêmeas SHR, este deslocamento da curva de distribuição da frequência não foi tão aparente quanto no grupo WK, sendo que apenas o tecido mesentérico mostrou tendência em desviar para a esquerda (**Figuras 11B e 12B**).

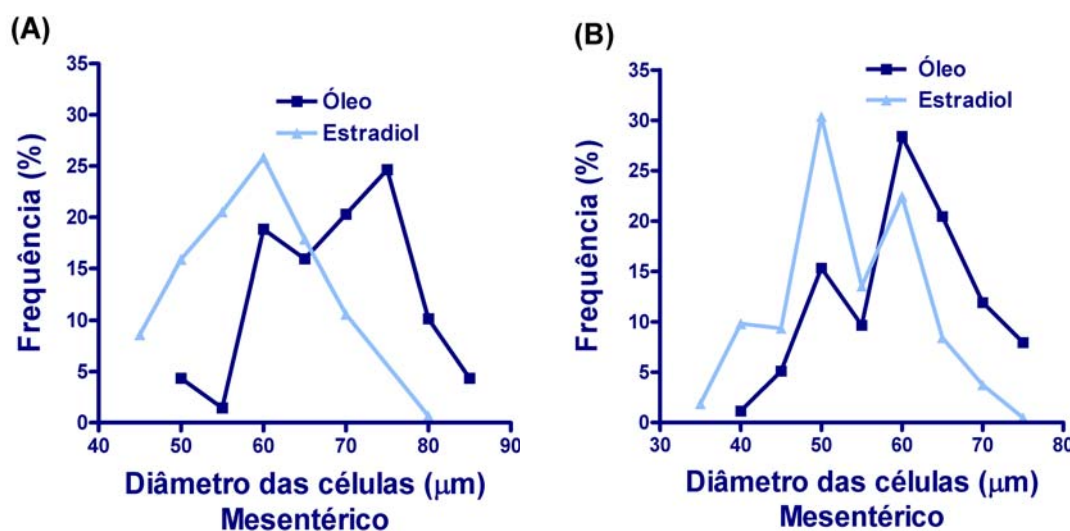


Figura 12. Diâmetro das células adiposas do tecido mesentérico de WK (A) e SHR (B). $N = 4$.

4.5. Características plasmáticas das fêmeas WK e SHR

A **Tabela 2** mostra as características plasmáticas gerais dos dois grupos de animais. Conforme pode ser observado, a reposição com estradiol não alterou a concentração plasmática de glicose, nos dois grupos de animais, entretanto, o grupo SHR apresentou aumento da glicemia em relação ao grupo WK. A concentração de insulina no plasma não sofreu alteração no grupo WK. Por outro lado, verificou-se que a concentração plasmática de insulina das fêmeas SHR que receberam veículo foi maior em relação ao mesmo tratamento nas fêmeas WK, e a administração de estradiol reduziu a hiperinsulinemia deste grupo de animais. O tratamento com estradiol aumentou de forma significativa a concentração plasmática de glicerol em ratas SHR ovariectomizadas, sendo que nas WK não foram observadas diferenças significativas. No que se refere aos triacilgliceróis, verificou-se que o tratamento com estradiol aumentou de forma significativa a concentração de triacilgliceróis no plasma, em ambas as linhagens, sendo que o aumento foi maior na SHR.

Tabela 2. Características plasmáticas de fêmeas WK e SHR

Parâmetro	WK		SHR	
	Óleo	Estradiol	Óleo	Estradiol
Glicose (mmol/L)	7,36 ± 0,09	7,01 ± 0,20	8,08 ± 0,12 [#]	8,10 ± 0,26 [#]
Insulina (pmol/L)	164 ± 8	148 ± 9	215 ± 17 [#]	173 ± 10*
Glicerol (mmol/L)	0,230 ± 0,13	0,256 ± 0,17	0,167 ± 0,14	0,216 ± 0,11*
TAG (mmol/L)	0,47 ± 0,11 [#]	0,88 ± 0,07*	0,72 ± 0,07 [#]	1,15 ± 0,12*

Os valores representam a média ± EP. (n = 6). *P<0,05 vs óleo mesmo grupo; [#]P<0,05 vs WK mesmo tratamento.

4.6. Atividade da enzima lipase lipoprotéica

Os níveis de atividade da enzima LPL dos tecidos adiposos mesentérico e periuterino de ratas WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo são representados na **Figura 13**.

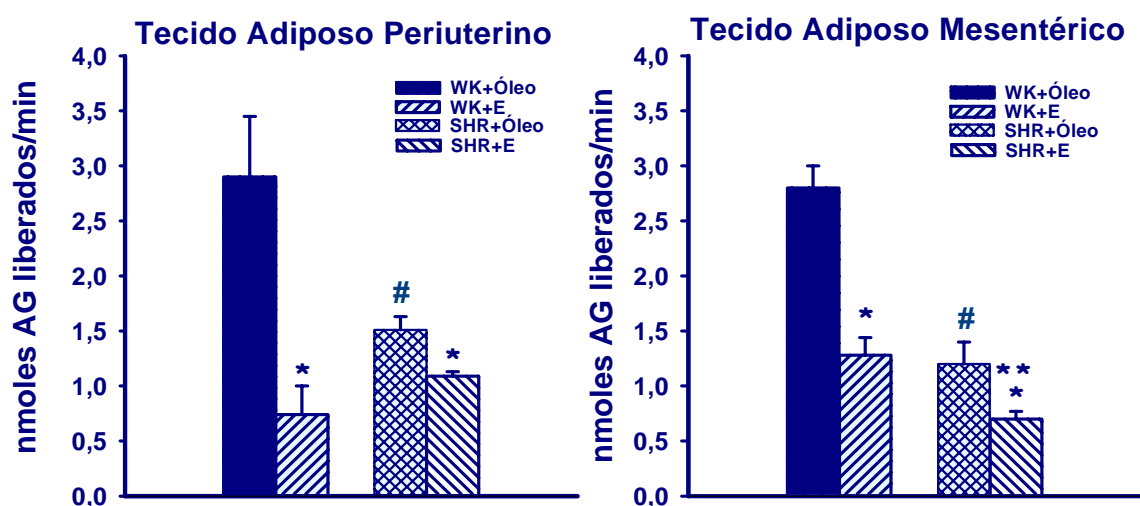


Figura 13. Atividade da enzima LPL no tecido adiposo mesentérico e periuterino de ratas WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo. *P<0,05 vs óleo; [#]P<0,05 vs WK óleo; **P<0,05 vs WK E. (N = 3).

Em ambos os tecidos e nas duas linhagens observou-se diminuição da atividade da LPL após tratamento com estradiol em comparação com o veículo (óleo). Os resultados da figura 13 também mostram que os valores obtidos para o grupo SHR foram inferiores aos obtidos para as WK.

4.7. Concentração hepática de glicogênio

A concentração hepática de glicogênio foi semelhante nas duas linhagens de animais ovariectomizados que não receberam a reposição hormonal. A administração de estradiol aumentou significativamente a concentração hepática de glicogênio das ratas WK e SHR, embora os valores obtidos para as WK fossem superiores aos das SHR (**Figura 14**).

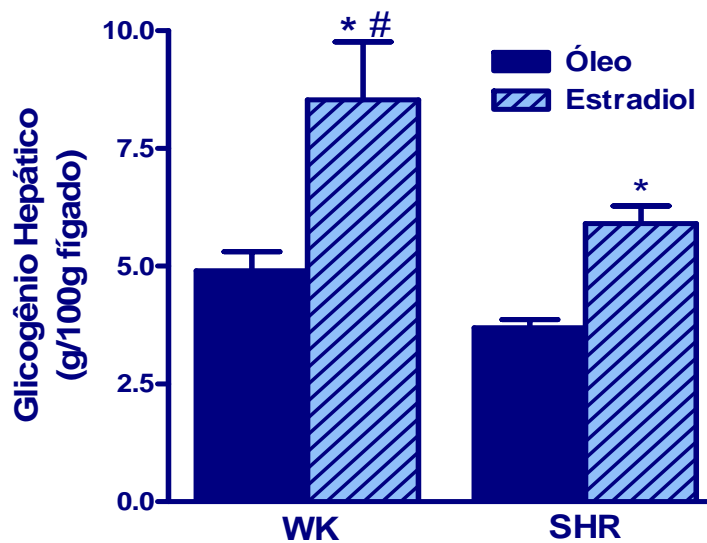


Figura 14. Concentração hepática de glicogênio em ratas WK e SHR ovariectomizadas e tratadas com óleo (O) e estradiol (E). N=5. * $P < 0,05$ mesmo grupo; # $P < 0,05$ vs SHR E.

4.8. Captação de glicose por adipócitos periuterinos

A captação da 2-deoxi-glicose foi avaliada em condições basais (sem adições) ou estimulada por insulina (2,5 nmol/L). Conforme pode ser observado nos adipócitos periuterinos, houve aumento da captação de glicose estimulada pela insulina em relação ao

basal nos dois grupos de animais (**Figuras 15A1 e 15A2**). Entretanto, nos animais que receberam estradiol o transporte de glicose estimulado pela insulina foi superior quando comparado às fêmeas não tratadas, tanto no grupo WK quanto no SHR (**Figura 15**).

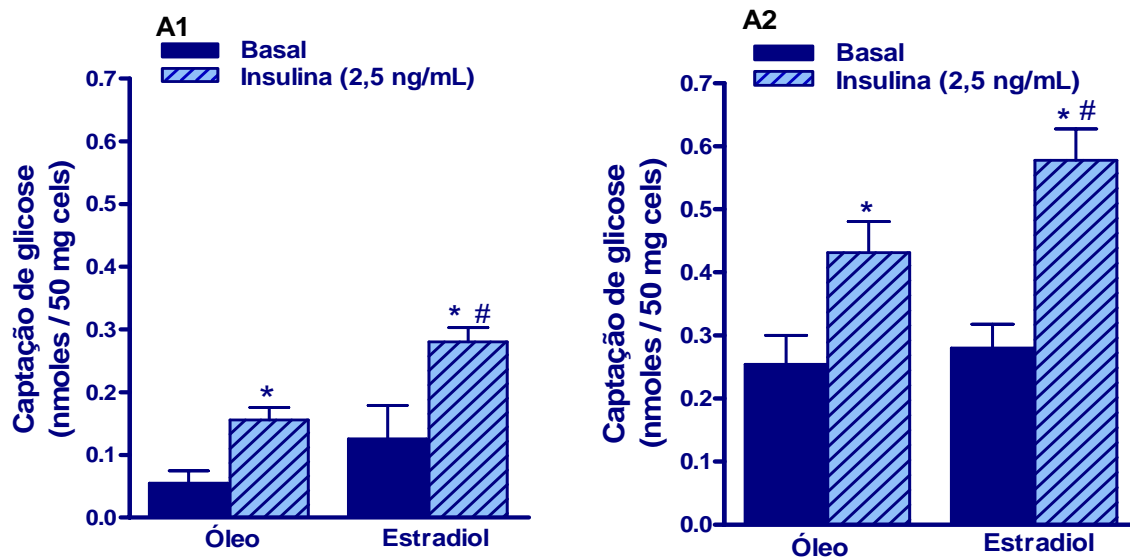


Figura 15. Transporte de glicose em condições basal e estimulada pela insulina em adipócitos periuterinos (P) de ratas WK (A1) e SHR (A2) ovariectomizadas tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O). $N = 5$. * $P < 0,05$ vs basal; # $P < 0,05$ vs PO Ins.

4.9. Captação de glicose por adipócitos mesentéricos

Nos adipócitos mesentéricos das fêmeas WK, verificou-se um aumento do transporte de glicose estimulado pela insulina em relação ao basal, tanto nos animais que receberam, quanto naqueles que não receberam a reposição hormonal (**Figura 16A1**), e os níveis de captação de glicose estimulados pela insulina foram maiores nos animais que receberam estradiol. Os dados da **Figura 16A2** mostram que a insulina aumentou a captação de glicose nos adipócitos mesentéricos de ratas SHR, em relação ao basal nos dois grupos de animais, e que os valores tanto da captação basal quanto da estimulada pela insulina foram maiores no grupo tratado com estradiol. O tratamento com estradiol aumentou significativamente a captação de glicose no estado basal.

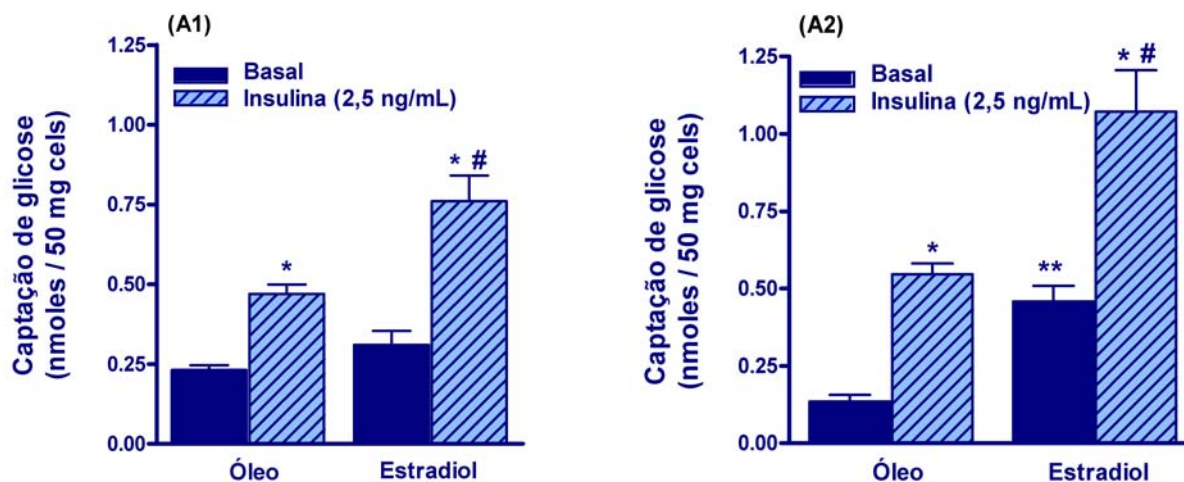


Figura 16. Transporte de glicose em condições basal e estimulada pela insulina em adipócitos mesentéricos de ratas WK (A1) e SHR (A2) ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou com óleo. $N = 4$. * $P < 0,05$ vs basal; ** $P < 0,05$ vs MO basal; # $P < 0,05$ vs MO Ins.

4.10. Atividade lipolítica do tecido adiposo periuterino

O índice lipolítico foi medido através do glicerol liberado para o meio de incubação por adipócitos isolados do tecido adiposo periuterino de ratas WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo, e são expressos por 50 mg de células representado nas **Figuras 17A e 18A**.

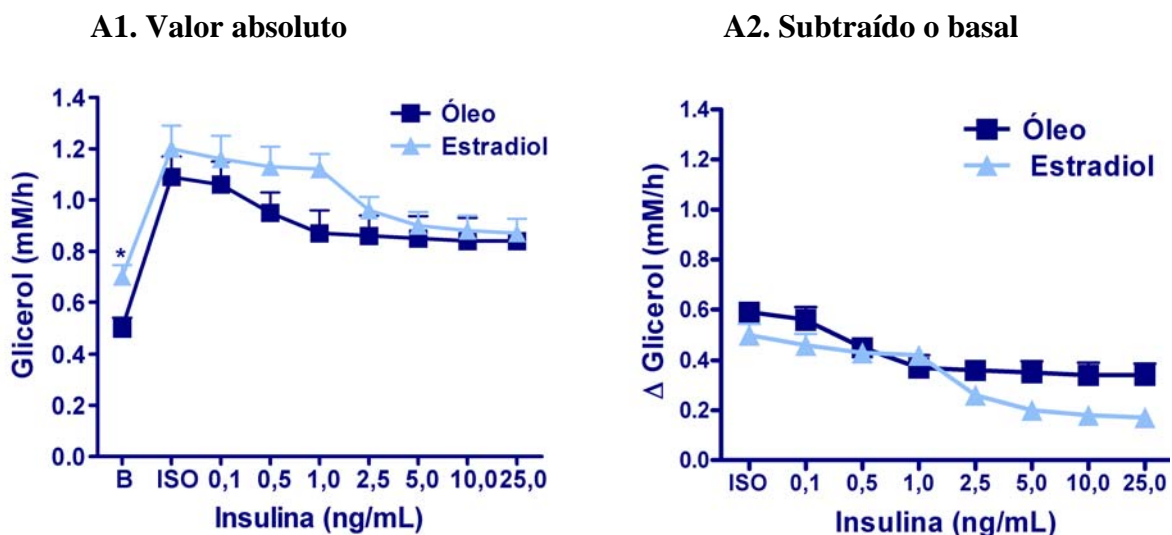


Figura 17. Glicerol liberado por adipócitos isolados do tecido adiposo periuterino de ratas WK tratadas com estradiol ou óleo. Os resultados são expressos por 50 mg de células. B, basal; Iso, isoproterenol. Wistar ($N = 4$). * $P < 0,05$ vs óleo.

Também está representado o efeito estimulante do isoproterenol ($0,1 \mu\text{M}$) sobre o processo lipolítico, no qual são descontados os valores da liberação basal de glicerol (**Figuras 17A2 e 18A2**). Os resultados mostram que nas ratas WK o tratamento com estradiol aumentou significativamente a lipólise do tecido adiposo periuterino em condições basais (sem adições), enquanto que nem o efeito anti-lipolítico ou o efeito estimulante do isoproterenol foram diferentes entre os grupos (**Figura 17A1e 17A2**).

Nas SHR constatou-se também um aumento significativo da lipólise basal dos adipócitos periuterinos, após o tratamento com estradiol. Quanto ao efeito anti-lipolítico da insulina não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (**Figuras 18A e 18B**).

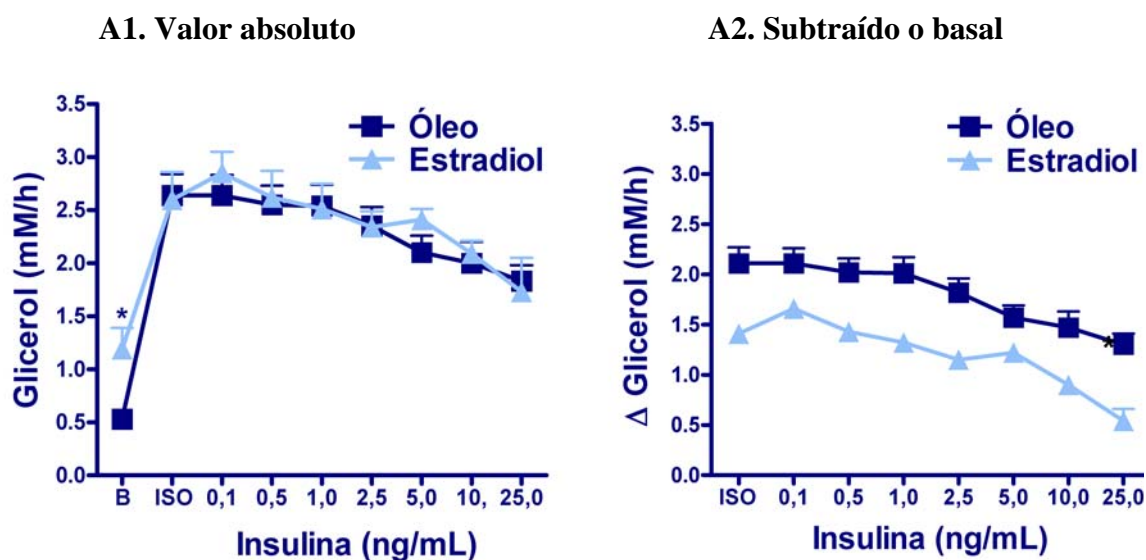


Figura 18. Glicerol liberado por adipócitos isolados do tecido adiposo periuterino de SHR tratadas com estradiol ou óleo. Os resultados são expressos por 50 mg de células. B, basal; Iso, isoproterenol. SHR ($N = 6$). * $P < 0,05$ vs óleo.

4.11. Atividade lipolítica do tecido adiposo mesentérico

Neste tecido, e na linhagem WK, o tratamento com estradiol aumentou significativamente a lipólise basal do tecido adiposo mesentérico (**Figura 19A1**). Quanto ao efeito anti-lipolítico da insulina não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos (**Figura 19A1**).

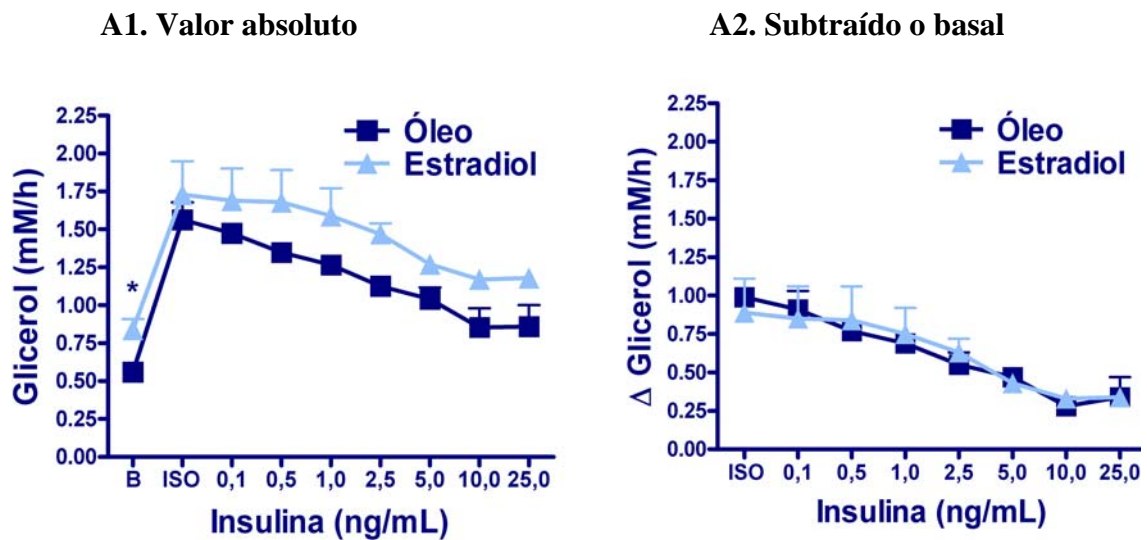


Figura 19. Glicerol liberado a partir de adipócitos isolados do tecido adiposo mesentérico de ratas WK tratadas com estradiol ou óleo. B, basal; Iso, isoproterenol. Wistar (N = 4). * $P < 0,05$ vs óleo.

A linhagem SHR mostrou um padrão de resposta diferente. Não foram observadas diferenças significativas na liberação, basal e estimulada pelo isoproterenol, de glicerol entre os tratamentos. Porém, o tecido mesentérico das ratas que receberam estradiol mostrou de maneira significativa sensibilidade maior ao efeito anti-lipolítico da insulina, ao contrário das

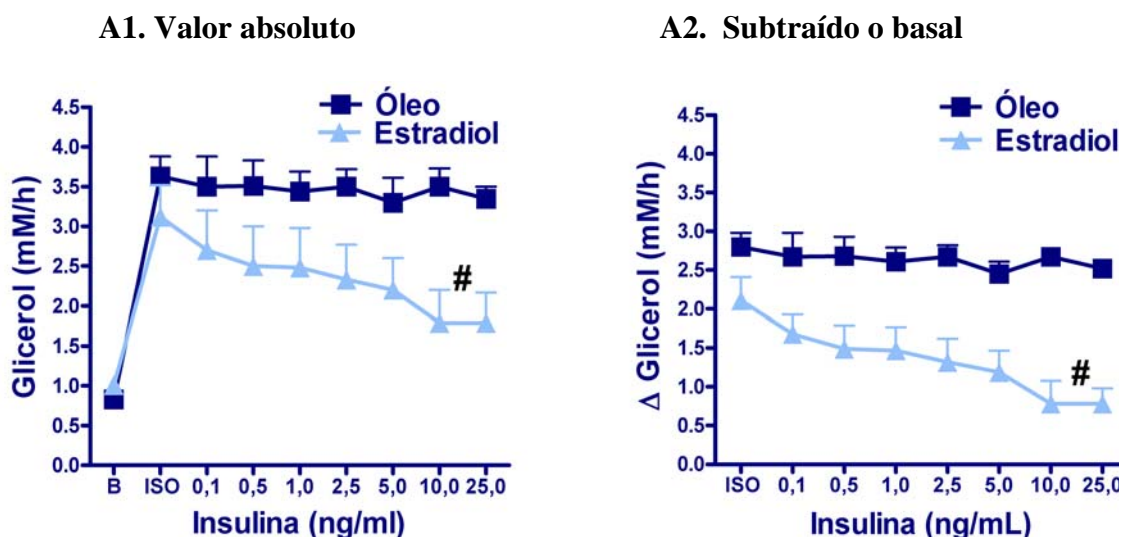


Figura 20. Glicerol liberado a partir de adipócitos isolados do tecido adiposo mesentérico de ratas SHR tratadas com estradiol ou óleo. B, basal; Iso, isoproterenol. SHR (N = 4). # $P < 0,05$ vs óleo.

não tratadas, que não apresentaram resposta ao efeito anti-lipolítico da insulina (**Figuras 20A1, 20A2**). Este fato foi comprovado através das inclinações das curvas dos tratamentos que são diferentes, e através do test-t que apresentou diferença significativa para as inclinações.

Os resultados da figura 21 demonstram que a atividade lipolítica estimulada por 0,1 μ M de isoproterenol é superior nas SHR sugerindo uma sensibilidade aumentada ao isoproterenol em relação ao grupo WK.

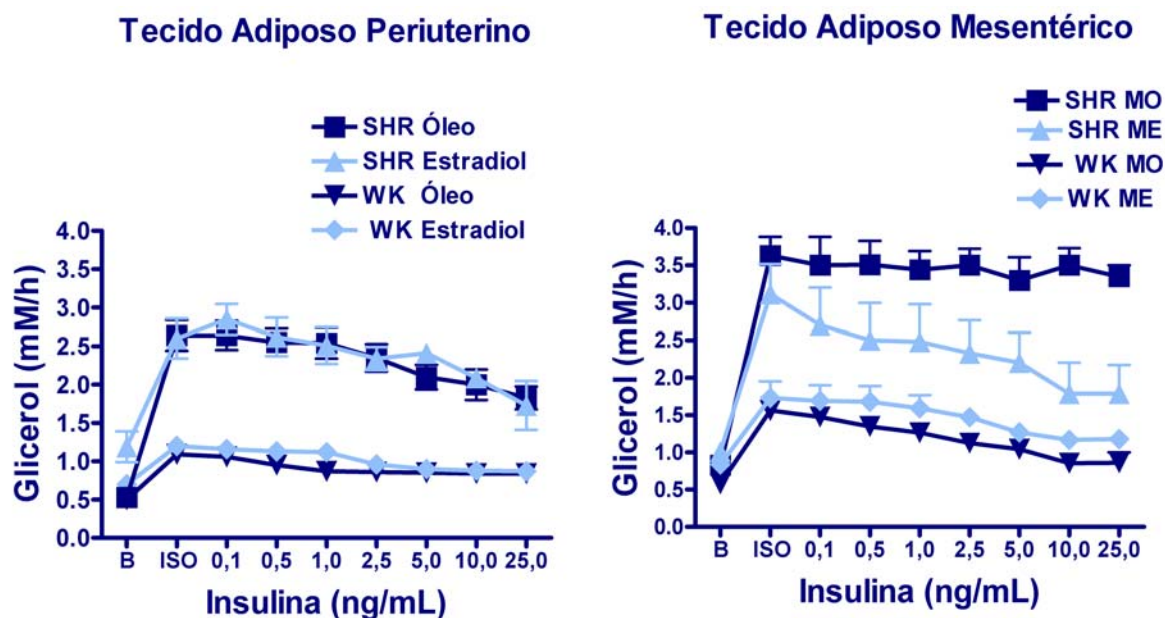


Figura 21. Comparação das respostas lipolíticas entre os tecidos obtidos de animais WK e SHR tratadas com estradiol ou óleo.

4.12. Expressão dos genes

Os níveis de expressão dos genes da leptina, PPAR α e PPAR γ nos tecidos adiposos periuterino, mesentérico e retroperitoneal, e dos tecidos hepático, cardíaco e renal de ratas WK e SHR tratadas com estradiol ou com óleo foram determinados através da técnica RT-PCR. Os níveis de expressão da β -actina foram determinados como controle da quantidade de RNA utilizado para cada amostra. Desta forma, a relação entre os níveis de expressão dos

diferentes genes com os da β -actina dos diversos tecidos e órgãos servem de parâmetro de comparação para os tratamentos com estradiol ou óleo nas duas linhagens de ratas. Os produtos da reação em cadeia da polimerase foram aplicados em gel de agarose cujos resultados estão representados nas **Figuras 22, 23 e 24**. Na parte A das figuras estão representados os produtos obtidos para os cDNAs da linhagem WK, enquanto que na parte B são apresentados os resultados obtidos para a linhagem SHR seguidos dos respectivos cDNA da β -actina. O tamanho dos produtos esperados para os diferentes cDNAs são os seguintes: leptina 589 pares de bases (pb), PPAR γ 272 pb, PPAR α 735 pb e β -actina 536 pb.

4.12.1. Níveis de expressão da leptina

Conforme demonstrado na **Figura 22A**, houve diferença nos níveis de expressão da leptina apenas no tecido adiposo mesentérico das fêmeas WK sem reposição hormonal. No grupo SHR, verificou-se que o tratamento com estradiol aumentou a expressão do mRNA da leptina nos tecidos adiposos periuterino (**Figura 22B**). Além disso, pode ser observado que a expressão do mRNA da leptina no grupo WK é maior que a do grupo SHR (**Figura 22**).

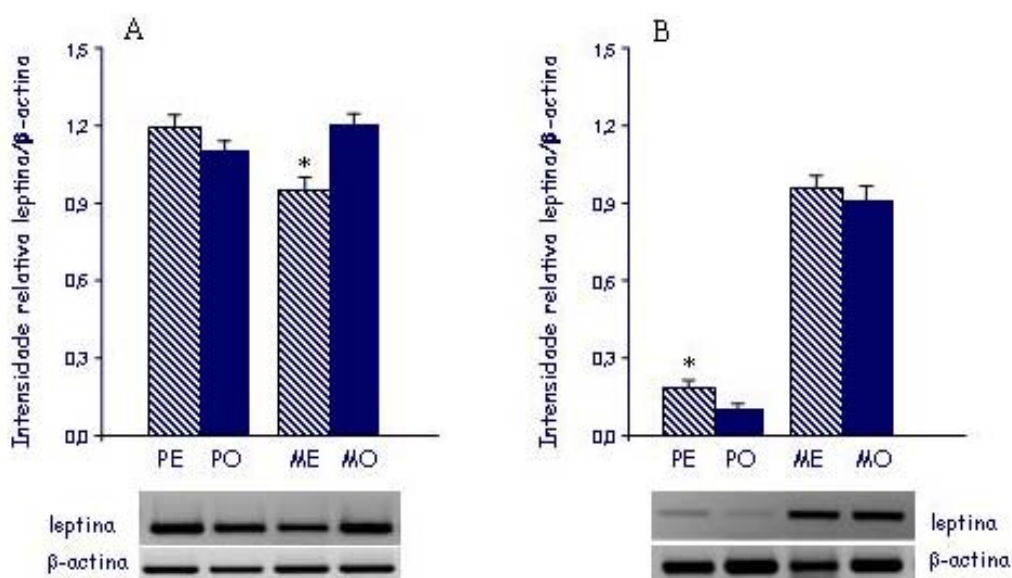


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA da leptina por RT-PCR extraído dos tecidos adiposos periuterino (P) e mesentérico (M) de ratas WK (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O). $N=3$. $*P<0,05$.

4.12.2. Níveis de expressão do PPAR γ

Observou-se que no tecido periuterino de ratas WK tratadas com estradiol, ocorreu um aumento significativo nos níveis de expressão do gene do PPAR γ (**Figura 23A**), não sendo observadas diferenças no tecido mesentérico. Porém, no tecido retroperitoneal o tratamento com estradiol provocou uma redução significativa dos níveis de expressão deste gene. Nas fêmeas SHR, observou-se uma expressão menor do gene do PPAR γ em relação às WK e não foram observadas diferenças da expressão deste gene nos tecido periuterino e retroperitoneal. Entretanto, no tecido mesentérico a expressão do mRNA PPAR γ foi superior à dos outros tecido e o tratamento com estradiol aumentou de maneira significativa os níveis de expressão deste gene (**Figura 23B**).

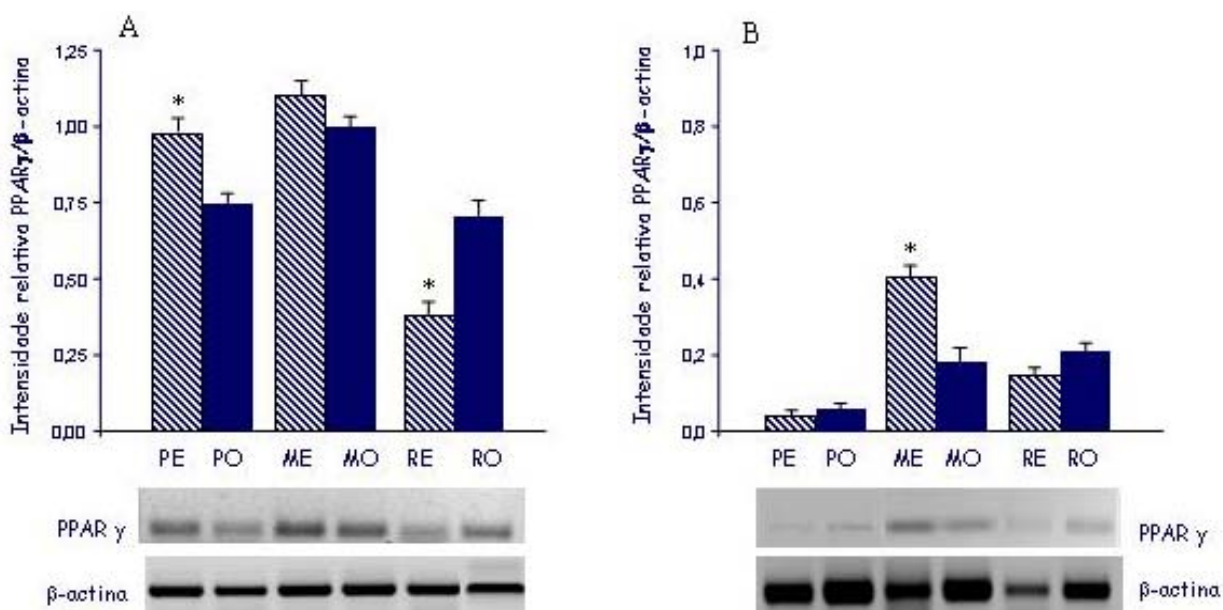


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA do PPAR γ por RT-PCR extraído dos tecidos adiposos periuterino (P), mesentérico (M) e retroperitoneal (R) de ratas WK (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O). $N = 3$. * $P < 0,05$.

4.12.3. Níveis de expressão do PPAR α

Na **Figura 24** estão representados os resultados obtidos para a expressão do PPAR α . Para as ratas WK o tratamento com estradiol aumentou significativamente os níveis deste gene no fígado, não havendo diferença significativa entre os grupos na expressão deste gene no coração. No rim, o tratamento com estradiol diminuiu de forma significativa a expressão do PPAR α (**Figura 24A**). Um aspecto interessante é que a expressão deste gene no coração foi superior à dos outros tecidos independentemente do tratamento utilizado (**Figura 24A**).

Nas SHR o tratamento com estradiol aumentou de forma significativa os níveis de PPAR α no fígado e no coração, porém, os níveis no coração são bem menores que os encontrados na WK. No rim, o tratamento com estradiol diminuiu de maneira significativa a expressão deste gene (**Figura 24A**).

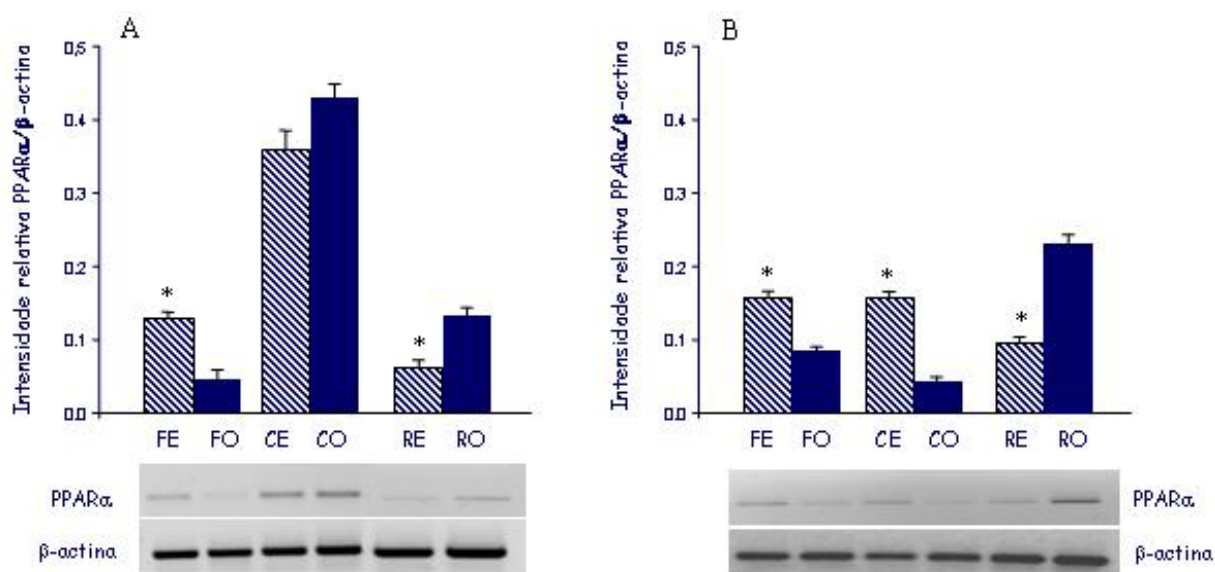


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação do cDNA do PPAR α por RT-PCR extraído do fígado (F), coração (C) e rim (R) de ratas WK ovariectomizadas (A) e SHR (B) tratadas com estradiol (E) ou com óleo (O). Wistar, N = 5 e SHR, N = 3, *P < 0,05.

5. Discussão

Nestes estudos foram avaliados os efeitos do estradiol sobre a adiposidade de fêmeas ovariectomizadas normotensas (WK) ou hipertensas (SHR). Os estrógenos são considerados reguladores importantes do desenvolvimento e da deposição lipídica no tecido adiposo, em humanos, em roedores e outras espécies (WADE e cols, 1985). A opção pela linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) deveu-se ao fato de os mesmos constituírem um modelo muito estudado de síndrome metabólica humana, no qual a hipertensão está associada à dislipidemia e à resistência insulínica do metabolismo da glicose (AITMAN e cols, 1997). O surgimento dos fatores metabólicos de risco em fêmeas pode ser resultado direto da falência ovariana ou alternativamente, resultado indireto de alterações metabólicas conseqüentes à deficiência de estrógeno. Não está ainda bem estabelecido se a deficiência de estrógeno aumenta o risco cardiovascular em todas as fêmeas ou somente naquelas que desenvolvem as características da síndrome metabólicas.

Os resultados obtidos mostram que a reposição com estradiol reduziu a pressão arterial nas fêmeas SHR ovariectomizadas, o que é condizente com estudos de outros laboratórios nos quais se observou que tanto a administração crônica de estradiol (SONG e cols, 2005) quanto a de curta duração (BELO e cols, 2004) promovem reduções significativas da pressão arterial. Os estudos de BELO e cols (2004) mostraram que a queda da pressão arterial induzida pelo tratamento com estradiol se correlacionou com o aumento dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial. Este peptídeo é liberado por em resposta ao estiramento dos cardiomiócitos secretores e reduz a pressão arterial através de seus efeitos natriurético e diurético (DE BOLD e cols, 1981; LANG e cols, 1985).

No entanto, a diminuição da pressão sanguínea em resposta à administração de estradiol observada nas SHR, não foi suficiente para atingir os níveis de pressão normal

observados nas ratas WK, o que sugere a existência de outros fatores também envolvidos no mecanismo de regulação da pressão sanguínea.

Estudos recentes confirmam que o tecido adiposo perivascular mesentérico libera o fator de relaxamento derivado do adipócito (ADRF), o qual possui uma ação inibitória sobre a resposta contrátil induzida por vários vasoconstritores (LÖHN e cols, 2002; VERLOHREN e cols, 2004). O efeito inibidor da resposta contrátil é mediado pela ativação do músculo liso vascular através da abertura de canais de potássio dependentes de voltagem nas artérias mesentéricas (VERLOHREN e cols, 2004). Esses achados reforçam a noção de que o tecido adiposo perivascular contribui para a manutenção do tônus basal das artérias mesentéricas e para a regulação da contratilidade destas artérias pela ativação dos canais de potássio (VERLOHREN e cols, 2004). Embora não tenha sido quantificada a massa de tecido adiposo mesentérico, a inspeção visual mostrou que as fêmeas SHR possuem massa reduzida deste tecido quando comparadas às fêmeas WK, confirmando os achados de GÁLVEZ e cols, (2006). A quantidade reduzida de tecido adiposo mesentérico nas SHR pode ser um fator adicional ao desenvolvimento de hipertensão nestes animais.

É bem estabelecido na literatura que a deficiência de estrógenos promove aumento do peso corporal, e que a administração deste hormônio reduz o peso corporal. No presente estudo verificou-se que a administração de estradiol resultou em queda do peso corporal nas fêmeas WK ovariectomizadas, a qual foi acompanhado por redução da ingestão alimentar e da massa adiposa. A redução da ingestão alimentar induzida pela administração de estradiol está de acordo com trabalhos já publicados (WADE e cols, 1985; LIANG e cols, 2002; SHIMOMURA e cols, 2002; D'EON e cols, 2005). Entretanto, diferença entre os grupos tratados e não-tratados não foi observada nas ratas SHR. Nesta linhagem, os resultados sugerem que a redução da adiposidade ocorrida após tratamento com estradiol não depende da

ingestão alimentar, uma vez que estes animais ingeriram maior quantidade de alimento que o grupo WK tratado com estradiol. Esses dados são consistentes com aqueles relatados em trabalhos que utilizaram camundongos nocaute para o receptor- α de estrógeno (α ERKO) (HEINE e cols, 2000) e com aqueles observados em camundongos transgênicos portadores de deficiência da aromatase (ArKO) (MISSO e cols, 2003) os quais apresentam aumento da adiposidade sem variação da ingestão alimentar. O aumento de ingestão alimentar verificada nas fêmeas SHR poderia ser conseqüente à redução da expressão do mRNA da leptina verificada nos tecidos adiposo periuterino e mesentérico desses animais, quando comparada aos animais WK. Dentro do mesmo grupo das SHR, o tratamento com estradiol aumentou a expressão da leptina no tecido periuterino. Estes dados são consistentes com trabalhos da literatura que mostram que estradiol aumenta leptina em ratas OVX (SHIMIZU e cols, 1997; YONEDA e cols, 1998; BRANN e cols, 1999). Nas ratas WK-OVX, o tratamento com óleo, aumentou a expressão do gene no tecido mesentérico. Essa discrepância poderia ser causada por diferenças na secreção e regulação da leptina em vários tecidos adiposos. Outros trabalhos da literatura mostraram que embora a expressão da leptina diminua no tecido adiposo branco subcutâneo e retroperitoneal de ratas OVX, a expressão da leptina aumenta no tecido adiposo branco mesentérico desses animais (SHIMUZU e cols, 1997).

A partir dos resultados foi possível evidenciar que, associadas às reduções da massa dos tecidos adiposos periuterino, mesentérico e retroperitoneal das ratas WK, o tratamento com estradiol aumentou significativamente o número de células. Analisando os diâmetros celulares, verificou-se que a distribuição de freqüência encontra-se desviada para a esquerda, mostrando que o tratamento com estradiol induziu proliferação celular e redução do tamanho do adipócito. No que se refere às fêmeas SHR, o tratamento com estradiol aumentou de forma significativa o número de células em relação ao grupo WK. Quanto aos tecidos adiposos

periuterino e mesentérico ficou evidenciada apenas redução do diâmetro celular. A massa adiposa reflete tanto o número, quanto o tamanho do adipócito, sendo que este último é uma evidência direta do teor de triacilgliceróis armazenados (D'EON e cols, 2005). Desta forma, a redução da massa de tecido adiposo nas fêmeas SHR coincidente com a redução do diâmetro médio do adipócito, sugere que o efeito do estradiol neste tecido é mediado, em grande parte, pelos efeitos deste hormônio sobre o tamanho do adipócito. O efeito hiperplásico do estradiol observado neste trabalho com as ratas WK foi observado também em estudos que mostraram a participação do estradiol na formação de novos adipócitos (adipogênese) no qual estradiol estimulou a proliferação de pré-adipócitos da linhagem de células 3T3-L1 (LEA-CURRIE e cols, 1999). O estradiol estimulou a proliferação de pré-adipócitos em fêmeas, mas este efeito não foi observado em machos (DIEUDONNE e cols, 2000).

Foi possível observar neste estudo, que a reposição hormonal não alterou a glicemia dos dois grupos de animais. Entretanto, a concentração plasmática de glicose nas WK foi menor que a observada nas SHR, tanto nas fêmeas que receberam estradiol quanto naquelas que receberam o veículo. No que se refere à insulina, observou-se aumento da concentração plasmática deste hormônio no grupo SHR em relação ao WK, independentemente do tratamento, e também que a administração de estradiol, apenas no grupo SHR, reduziu significativamente a concentração plasmática de insulina. Esses achados indicam que, apesar do aumento da insulina, este não foi suficiente para manter a concentração plasmática de glicose no mesmo nível que a observada para o grupo WK. Além disso, verificou-se que as fêmeas SHR tratadas com estradiol, requerem menos insulina para manter uma glicemia semelhante à do grupo tratado com o veículo, o que sugere que estes animais possuem maior sensibilidade à insulina que o grupo não tratado. A redução da concentração plasmática de insulina provavelmente também desempenha um papel no aumento da concentração

plasmática de glicerol, observada no grupo tratado com estradiol, o que poderia resultar de uma atividade lipolítica aumentada. Nossos estudos sugerem um papel do estradiol sobre a sensibilidade insulínica apenas nas SHR, corroborando resultados anteriores obtidos por GALIPEAU e cols (2002), nos quais foi demonstrado que as fêmeas requerem menos insulina para manusear uma mesma quantidade de glicose e apresentavam maior sensibilidade insulínica em relação a ratos machos submetidos ao teste oral de tolerância à glicose. Além disso, outras evidências sugerem que a hiperinsulinemia/resistência insulínica poderiam levar à hipertensão tanto em humanos quanto em animais (VERMA, 2000; REAVEN, 2003), o que poderia contribuir parcialmente para o estado hipertensivo observado nas fêmeas SHR. Outros estudos demonstraram que drogas que melhoram a sensibilidade insulínica e diminuem a concentração plasmática de insulina previnem o desenvolvimento da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (BHANOT e cols, 1994; VERMA e cols, 1994). Os resultados deste trabalho apresentaram diminuição da pressão arterial na linhagem SHR após o tratamento com estradiol. A resistência à insulina pode levar diretamente a hipertensão por ativação do sistema nervoso simpático (REAVEN, 1988). O aumento do tônus simpático pode contribuir para aumento da concentração de ácidos graxos livres (AGLs) associados com síndrome metabólica desde que hipertensão tratada com β bloqueadores tem menor concentração de AGLs comparado com hipertensão tratada com diuréticos (MAISON e cols, 2000).

Nossos resultados também mostram que a administração de estradiol aumentou a concentração plasmática de TAG e reduziu a atividade da enzima LPL dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico, nos dois grupos de animais. Dados da literatura confirmam os resultados citados acima, os quais mostram que estradiol diminuiu o diâmetro das células. O estrógeno pode inibir diretamente a deposição lipídica através da diminuição da atividade da

LPL, uma enzima que regula a captação de lípidos para os adipócitos (ENERBACK e cols, 1993, COOKE e cols, 2004). A LPL é uma enzima regulatória chave do metabolismo energético, responsável pela hidrólise dos TAG contidos nas lipoproteínas circulantes (quilomicron e VLDL) para posterior captação dos ácidos graxos pelo tecido adiposo. Vários estudos demonstram que a ovariectomia em ratas resulta em aumento da LPL do tecido adiposo, enquanto que a reposição hormonal diminui a atividade da enzima (PEDERSEN e cols, 1992; HAMOSH e HAMOSH, 1975; KIM e KALKHOFF, 1975; HOZUMI e cols, 2000). A atividade da enzima é regulada tanto ao nível transcricional quanto pós-transcricional (SEMENKOVICH e cols, 1989). Outros estudos mostraram que o estrógeno reduziu acentuadamente o acúmulo de lipídios e expressão da LPL, bem como o acúmulo de TAG em adipócitos 3T3-L1 diferenciados, e transfectados com receptor de estrógeno (HOMMA e cols, 2000), e que a reposição hormonal em camundongos diminui a expressão da LPL do tecido adiposo (D'EON e cols, 2005). Em geral, parece que a insulina promove acúmulo lipídico pelo aumento da atividade da LPL (BJORNTORP, 1996), o que poderia explicar parcialmente a diferença na massa adiposa entre as WK e SHR. O aumento da concentração plasmática de TAG após administração de estradiol pode ser conseqüente à redução da atividade da LPL. Além disso, a menor deposição lipídica, observada no presente trabalho, nas fêmeas tratadas com estradiol pode ser conseqüência, pelo menos em parte, da menor captação lipídica catalizada pela LPL.

Quanto ao metabolismo de carboidratos, verificou-se que nas ratas WK e SHR, a administração de estradiol provocou um aumento significativo na deposição de glicogênio hepático, fato que é condizente com outros estudos na literatura (CARRINGTON e cols, 1985; CAMPBELL e cols, 2002). Os valores obtidos para as fêmeas WK que receberam estradiol foram superiores aos obtidos para as SHR. A ingestão de carboidratos é rapidamente

seguida por aumento da oxidação de glicose e armazenamento como glicogênio no músculo e fígado, sendo este processo regulado pela insulina (FÉRY e cols, 2003). A mobilização destes estoques ocorre no estado pós-absortivo, quando a glicose retorna ao estado basal, ou quando existe necessidade de energia. (FELBER e cols, 1995). Dois parâmetros apontam para uma ação insulínica normal nestes animais: o aumento da deposição de glicogênio no fígado e o aumento da captação de glicose pelo tecido adiposo, corroborando os resultados observados por CAMPBELL e cols (2002).

Os estudos realizados com adipócitos *in vitro* mostram que a administração de estradiol estimulou a captação de glicose estimulada pela insulina nos dois grupos de animais. Nos adipócitos periuterinos, observou-se um padrão de resposta semelhante nos dois grupos, sendo que a insulina estimulou a captação tanto nos animais tratados quanto nos não tratados com o estradiol. Entretanto, os animais que receberam estradiol apresentaram uma captação estimulada pela insulina superior à verificada nas fêmeas não tratadas tanto nas WK quanto nas SHR. Quanto ao grupo SHR, verificou-se, em adipócitos mesentéricos, que a administração de estradiol aumentou a captação de glicose basal e estimulada pela insulina, confirmando que nesta linhagem de animais a reposição hormonal aumenta a sensibilidade insulínica. Estes resultados sugerem que a deficiência de estradiol em ratas com baixa sensibilidade à insulina pode afetar o metabolismo de carboidratos no tecido mesentérico. Foi verificado que a quantidade total de GLUT4 em animais tratados com estradiol era significativamente maior em células do tecido adiposo omental (WESTERGREN e cols, 2005), e desta forma, é possível sugerir que o aumento da captação de glicose estimulada pela insulina em adipócitos mesentéricos de animais tratados com estradiol esteja relacionada ao aumento da expressão deste transportador de glicose quando comparado ao grupo não tratado.

Entretanto, parte do aumento basal da captação de glicose por adipócitos mesentéricos do grupo tratado pode ser causada por níveis diferentes de expressão de GLUT1.

No que se refere à lipólise, a administração de estradiol aumentou a liberação basal de glicerol dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico das ratas WK não sendo verificadas diferenças no efeito anti-lipolítico da insulina após a reposição hormonal. Resultados semelhantes foram observados em fêmeas Wistar durante o diestro, bem como em estudos de microdiálise *in situ* realizados em fêmeas ovariectomizadas, após administração de estrógeno (DARIMONT e cols, 1997). Também pode ser observado que a estimulação adrenérgica pelo isoproterenol não foi influenciada pela reposição hormonal, corroborando resultados obtidos em fêmeas humanas, nas quais a terapia de reposição com estradiol não alterou a atividade lipolítica estimulada pela noradrenalina de adipócitos subcutâneos (REBUFFÉ-SCRIVE e cols, 1987).

Da mesma forma que a observada para o grupo WK, a atividade lipolítica basal de adipócitos periuterinos apresentou-se aumentada no grupo SHR tratado com estradiol, não sendo verificadas diferenças no efeito anti-lipolítico da insulina após a reposição hormonal. Quanto ao tecido adiposo mesentérico, pode ser observado que o tratamento com estradiol aumentou a sensibilidade deste tecido ao efeito anti-lipolítico da insulina, sem alterar a lipólise basal. Estes resultados reforçam a evidência de que as SHR ovariectomizadas apresentam diminuição da sensibilidade insulínica, e que a reposição hormonal melhora a atividade de vias metabólicas influenciadas pela insulina. Os dados encontrados mostraram que estradiol atenua o desenvolvimento da resistência à insulina, o que é condizente com a literatura (LIU e cols, 2004).

Os resultados de lipólise das WK e SHR agrupados dos tecidos adiposos mostram que as SHR apresentam maior liberação de glicerol que as WK. As SHR geralmente apresentam

fluxo simpático aumentado (CABASSI e cols, 2002) em relação às ratas WK, o que leva ao aumento da lipólise (YOUNGSTROM e cols, 1998). Em adipócitos de ratos, as catecolaminas controlam lipomobilização através da interação com receptores β adrenérgicos, os quais ativam adenilato ciclase, proteína kinase dependente de AMPc e lipase hormônio sensível. Essa sinalização resulta na hidrólise dos triacilgliceróis armazenados e diminui o tamanho do adipócito (LAFONTAN e cols, 1993). Esse mecanismo é de especial importância para o tecido adiposo mesentérico porque ele é densamente innervado pelo sistema nervoso simpático (YOUNGSTROM e cols, 1995). Além disso, lipólise estimulada por catecolaminas é mais efetivamente inibida por insulina nos adipócitos do mesentérico que outros depósitos (PONDE e cols, 1991). Assim, a diminuição da concentração de insulina no plasma da SHR tratada também favorece lipólise estimulada por catecolaminas no tecido adiposo mesentérico desta linhagem (GÁLVEZ e cols, 2006). No tecido adiposo, o mecanismo responsável pela resistência à insulina está associado ao aumento da liberação de ácidos graxos livres dentro da circulação, o que pode induzir resistência à insulina no tecido muscular e possivelmente no fígado (BODEN e SHULMAN 2002; RODEN e cols, 2000).

Conforme citado previamente, os adipócitos mesentéricos são considerados lipolíticamente mais ativos. Isso é compatível com, e requer, uma captação maior de glicose por estes adipócitos para fornecer o glicerol-3-fosfato necessário para aumentar a síntese de TAG. Essa síntese é importante para manter os estoques de TAG inalterados, em um tecido com alta taxa de lipólise. Além disso, a redução dos AGNE na veia porta regula o *clearance* hepático de insulina, reduzindo conseqüentemente a liberação hepática de glicose e a hiperinsulinemia. Foi relatado que o tecido adiposo perivascular atenuou a resposta vascular de anéis aórticos à epinefrina (SOLTIS e CASSIS, 1991). Outros estudos confirmaram o efeito inibitório da gordura perivascular aórtica (LÖHN e cols, 2002) e mesentérica

(VERLORHEN e cols, 2004) sobre a resposta contrátil a uma variedade de estímulos vasoconstritores. Um estudo mais recente mostrou que alterações da massa adiposa visceral pode contribuir para o aumento da resistência vascular na linhagem de rato espontaneamente hipertenso (GÁLVEZ e cols, 2006). Os autores observaram que os animais SHR têm menos tecido adiposo mesentérico perivascular com adipócitos menores e um conteúdo de lipídio total e de leptina menor, em relação ao grupo WK, corroborando os achados do presente trabalho.

A deposição lipídica é dependente do equilíbrio entre os processos de captação, síntese e mobilização dos triglicerídios no tecido adiposo (ARNER, 2001). Estudos demonstram que as vias metabólicas são controladas em diferentes níveis, em resposta a estímulos ambientais e hormonais (SPIEGELMAN e cols, 1996), e este controle é exercido, pelo menos em parte, ao nível transcricional da expressão gênica (KERSTEN e cols, 2002). A regulação da expressão gênica é executada por fatores de transcrição específicos, destacando-se os receptores ativados por proliferadores dos peroxissomos (PPARs) (KERSTEN e cols, 2000), mais diretamente ligados aos objetivos do presente estudo. Para examinar as mudanças mediadas pelo estradiol, as quais promovem redução da massa de tecido adiposo, foi investigada a expressão do PPAR α , cuja ativação está relacionada à redução da adiposidade. Os resultados mostram que as fêmeas que não receberam reposição hormonal, tanto as WK quanto as SHR, apresentaram redução da expressão deste fator de transcrição quando comparado com as tratadas. Esta redução da expressão do PPAR α observada no fígado das fêmeas ovariectomizadas não tratadas, tanto WK quanto SHR, pode ter contribuído para o aumento da massa lipídica nestes animais, uma vez que nestas condições ocorre redução da expressão das enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos. Esses resultados são condizentes com aqueles apresentados por CAMPBELL e cols, (2003). Esse efeito do estradiol na utilização de

lípidos como fonte de energia reflete o aumento da eficiência das vias metabólicas melhorando a eficácia do processo de oxidação dos ácidos graxos e inibição do estoque de gorduras (lipogênese) no tecido adiposo, fígado e músculo. O estradiol pode indiretamente afetar a lipólise por induzir a enzima lipolítica lipase hormônio sensível (PALIN e cols, 2003), por aumentar os efeitos lipolíticos da epinefrina (ACKERMAN e cols, 1981) e por promover aumento da oxidação dos ácidos graxos e contribuir para diminuição da deposição de tecido adiposo (MISSO e cols, 2003). A LPL e apolipoproteína C-III são suprimidas pelo PPAR α (AUWERS e cols, 1996; SCHOONJANS e cols, 1996). Estes dados são condizentes com os resultados deste trabalho que mostram que tratamento das ratas OVX com estradiol diminuiu LPL e aumentou em ambas as linhagens a expressão do PPAR α , o gene envolvido na oxidação dos ácidos graxos.

O tratamento de fêmeas ovariectomizadas com estradiol aumentou a expressão do PPAR γ nos tecidos adiposos periuterino das ratas WK e mesentérico das SHR. Estes resultados são condizentes com dados da literatura onde os estrógenos foram capazes de induzir a produção de ligantes endógenos do PPAR γ (MA e cols, 1998). O PPAR γ é um fator de transcrição que participa da ativação da adipogênese e aumento da sensibilidade insulínica (ROSEN e cols, 2001). Os resultados deste trabalho mostraram nas WK, após tratamento com estradiol, aumento do número de adipócitos e diminuição do diâmetro celular, e nas SHR apenas diminuição dos diâmetros. Estes dados são condizentes com trabalhos da literatura nos quais verificou-se que as thiazolidinedionas (TZDs), uma classe de fármacos que melhora a hiperglicemia, pelo ao menos em parte, por melhorar a sensibilidade à insulina (OLEFSKY e cols, 2000), ativam o PPAR γ (KAHN e cols, 2000). As TZDs aumentam o número e diminuem o tamanho dos adipócitos (FRAYN, 2002). O aumento do número pode ocorrer através da estimulação da adipogênese, enquanto a redução do tamanho das células pode ser

devido a diminuição tecidual dos níveis de insulina, resultando na redução do estoque de lípidos e do efeito antilipolítico. Os adipócitos pequenos são mais sensíveis à insulina (KAHN e cols, 2000), e podem atuar eficientemente no tamponamento do excesso de ácidos graxos livres no período pós-prandial, enquanto que nos adipócitos grandes esta eficiência no tamponamento dos ácidos graxos diminui (FRAYN, 2002).

A desativação dos genes relacionados ao metabolismo como o PPAR α e o PPAR γ é a principal fase para iniciação da síndrome metabólica (obesidade, resistência à insulina e hipertensão) (FERRE, 2004). A perda de peso induzida pela dieta aumenta PPAR α e PPAR γ no tecido adiposo e coração, e essas mudanças estão associadas com aumento da sensibilidade da insulina, redução da pressão sanguínea e frequência cardíaca (VERRETH e cols, 2006). Ainda em relação ao tecido adiposo mesentérico, somente nas SHR pôde ser observado que o tratamento com estradiol aumentou a sensibilidade deste tecido ao efeito anti-lipolítico da insulina. Esse fato acontece provavelmente devido a um aumento da expressão do PPAR γ no tecido adiposo mesentérico e indiretamente através do aumento da expressão do PPAR α no fígado e coração.

Conclusões: A linhagem WK não apresenta predisposição genética para resistência à insulina e após ovariectomia não foi observada diminuição da sensibilidade à insulina. Os tecidos adiposos periuterino e mesentérico não foram comprometidos respondendo ao efeito anti-lipolítico da insulina e aumento da captação de glicose após estímulo com insulina. O estradiol diminuiu significativamente o diâmetro das células e aumentou o número de células provavelmente devido ao aumento do PPAR γ no tecido periuterino. Após administração de estradiol observou-se aumento do PPAR α no fígado, e no coração observou-se grande expressão deste gene quando comparado com as fêmeas SHR, mas entre o grupo WK não foi

significativamente diferente. Provavelmente o aumento da expressão deste gene pode ser responsável pela diminuição ectópica dos estoques de lípidos no fígado e grande sensibilidade da insulina nas ratas WK.

A predisposição genética à resistência à insulina apresentada nas SHR pode estar mascarada pelo estrógeno e após ovariectomia a deficiência de estrógeno induziu o surgimento da síndrome metabólica. A redução da sensibilidade à insulina após OVX desencadeou problemas tais como a inabilidade da insulina para suprimir a lipólise após estímulo das catecolaminas. Observou-se que o tecido adiposo mais prejudicado foi o mesentérico, por ser esse densamente inervado pelo sistema nervoso simpático.

A administração de estradiol, através do aumento da expressão gênica do PPAR γ pode ter contribuído para o aumento da sensibilidade à insulina, evidenciada através do aumento da captação de glicose. O aumento da expressão do PPAR α no fígado, através de um aumento da β -oxidação dos ácidos graxos associado à redução da atividade da lipase lipoproteica contribuíram para a menor deposição lipídica observada nas fêmeas que receberam estradiol. O achado de um efeito anti-lipolítico aumentado, associado ao aumento da sensibilidade insulínica do sistema de transporte da glicose em adipócitos mesentéricos isolados de fêmeas tratadas com estradiol poderia contribuir para a manutenção dos estoques de TAG. Isto, por sua vez, poderia contribuir para a redução da pressão arterial observada no grupo SHR após tratamento com estradiol.

6. Referências bibliográficas

Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA, 1993. Cloning of rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during pre-adipocyte differentiation: homology with human CD36. *J Biol Chem* 268: 17665-17668

Ackerman GE, Macdonald PC, Gudelsky G, Mendelson CR, Simpson ER, 1981. Potentiation of epinephrine-induced lipolysis by catechol estrogens and their methoxy derivatives. *Endocrinology* 109:2084-2088.

Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Doré C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M, Scott J, 1997. Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 16:197-201.

Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graj D, St LE, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahim A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J, 1999. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 21: 76-83.

Aihaud G, Grimaldi P, Negrel R, 1994. Hormonal regulation of adipose differentiation. *Trends Endocrinol* 5: 32-136.

Arner P, Lithell H, Wahrenberg H, Brönnergard M 1991. Expression of lipoprotein lipase in different human subcutaneous adipose tissue regions. *J Lipid Res* 32:423-429.

Arner P 2001 Free fatty acids – do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 3 (Suppl. 1) S11-S19.

Arner P, 2002. Insulin resistance in type 2 diabetes: roloe of fatty acids. *Diabetes Metab Res* 18: S5-S9.

Arner P, 2003. The adipocyte in insulin resistance: Key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 14: 137-145.

Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B, 1996. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis* 124:S29-S37.

Belfrage P, Vaughan M, 1969. Simple liquid-liquid partition system partition system for isolation of labeled oleic acid mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10: 341-344.

Belo NO, Barra JS, Carnio EC, Rodrigues JA, Gutkowska J, Reis AM, 2004. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regulatory peptides* 117: 53-60.

Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson IC, Carlsson LM, Carlsson B, 1998. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and estrogen. *Neuroendocrinology* 67:29-36.

Bhanot S, McNeill JH, Bryer-Ash M, 1994. Vanadyl sulfate prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. *Hypertension* 23:308-312.

Björntorp P, 1988. Abdominal obesity and development of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metabol Rev* 4:615-622.

Björntorp P, 1990. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493-496.

Björntorp P, 1996. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:291-302.

Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staeles B, 2002. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci* 967: 7-18.

Boden, G and Shulman, GI, 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J clin Invest* 32:14-23.

Bolinder J, Kager L, Ostman J, Arner P, 1983. Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes* 32:117-123.

Botion LM, Green A, 1999. Long-Term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. *Diabetes* 48: 1691-1697.

Botion LM, Kettelhut IC, Migliorini RH 1995. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm Metab Res* 27:310-313.

Botion LM, Brito MN, Brito NA, Brito SR, Kettelhut IC, Migliorini RH 1998. Glucose contribution to *in vivo* synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* 47:1217-1221.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W, 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366.

Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL, Mahesh VB, 1999. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 64: 659-663.

Browning JD, Horton JD, 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114: 147-152.

Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, Quartieri F, Moschini L, Cavazzini S, Cavatorta A, Borghetti A, 2002. Sympathetic activation in adipose tissue and Skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension* 36: 656 - 661.

Campbell SE, Febbraio MA, 2002. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1139-E1146.

Campbell SE, Mehan KA, Tunstall RJ, Febbraio MA, Cameron SD, 2003. *J mol Endocrinol* 31: 37-45.

Carr MC, 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2404-2411.

Carrington LJ, Bailey CJ, 1985. Effects of natural and synthetic estrogens and progestins on glycogen deposition in female mice. *Horm Res* 21: 199-203.

Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno ML, Ando S, 2003. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem* 278: 28668-28676.

Cesaretti MLR, Kohlmann OJ, 2006. Experimental models of insulin resistance and obesity: Lessons Learned. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50/2: 190-197.

Chiappe de cingolone GE, Caldiz CL, 2004. Insulin resistance and GLUT4 glucose transporter in adipocytes from hypertensive rats. *Metabolism* 53: 382-387.

Collison M, Glazier AM, Graham D, Morton JJ, Dominiczak MH, Aitman TJ, Connell JMC, Gould GW, Dominiczak AF 2000. CD36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-Prone spontaneously hypertensive rat. *Diabetes* 49: 2222-2226.

Cooke PS, Naaz A, 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 229: 1127-1135.

Darimont C, Delansorne R, Paris J, Ailhaud G, Negrel R, 1997. Influence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue in vivo: *na in situ* microdialysis study. *Endocrinology* 138: 1092-1096.

De Bold AJ, Boreinstein HB, Veress AT, Sonnenberg H, 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89 – 94.

D'eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obion MS, Fried SK, Greenberg AS, 2005. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 43: 35983-35991.

Dentin R, Girard J, Postic C 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87:81-86.

Despres JP, 1993. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition* 9: 452-459.

Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y, 2000. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: Evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and PPAR γ ₂. *Endocrinol* 141: 649-656.

Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y, 1995. Androgen receptor in cultured rat adipose precursor cells during proliferation and differentiation: regional specificities and regulation by testosterone. *Endocrine* 3: 537-541.

Enerback S, Gimble JM, 1993. Lipoprotein lipase gene expression: Physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169: 107-125.

Felber JP, Golay A, 1995. Regulation of nutrient metabolism and energy expenditure. *Metabolism* 44 (Suppl 2): 4-9.

Ferranini E 1992. The haemodynamics of obesity: a theoretical analysis. *J Hypertens* 10: 1417-1423.

Ferre P, 2004. The biology of peroxisome proliferators-activated receptor: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53: S43-S50.

Féry F, Plat L, Balasse EO, 2003. Level of glycogen stores and amount of ingested glucose regulate net carbohydrate storage by different mechanisms. *Metabolism* 52: 94-101.

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

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB, 2006. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50: 216-227.

Frayn KN, 2002. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45: 1201-1210.

Freytag So, Paielli DL, Gilbert JD, 1994. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8: 1654-1663.

Galipeau DM, Yao L, McNeill JH, 2002. Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H562-H567.

Gálvez B, Castro J, Herold D, Dubrovská G, Arribas S, González MC, Aranguez I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M, Alfonso MSF, 2006. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1297-1302.

Goldberg IJ, 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37: 693-707.

Gray JM, Dudley SD, Wade GN, 1981. In vivo cell nuclear binding of 17β -[3 H]-estradiol in rat adipose tissues. *Am J Physiol* 240: E43-E46.

Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA 2002. A futile cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nature Medicine* 8: 1122-1128.

Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP, 1994. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11012-11016.

Haalas JL, Boozer C, Blair West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8878-8883.

Haarbo J, Marslew U, Gottfredsen A, Christiansen C, 1991. Post-menopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 40: 323-326.

Hamosh M, Hamosh P, 1975. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 55: 1132-1135.

Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF, 1987. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *L Clin Endocrinol Metab* 64: 832-835.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS, 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α Knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12729-12734.

Hennes MM, Shrago E, Kissebah AH. Receptor and postreceptor effects of free fatty acids (FFA) on hepatocyte insulin dynamics. *Int J Obes* 14: 831-841.

Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y, 2000. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 275: 11404-11411.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, 2002. SREBPS: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125-1131.

Hozumi Y, Kawano M, Hakamata Y, Miyata M, Jordan VC, 2000. Tamoxifen inhibits lipoprotein activity: in vivo and in vitro studies. *Horm Res* 53: 36-39.

Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM, 1995. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9856-9860.

Iverius PH, Ostlund-Lindquist AM, 1986. Preparation, characterization, and measurement of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol* 129: 691-704.

Idris, I et al, 2002. Insulin action in skeletal muscle: Isozyme-specific effects of protein kinase C. *ANN New York Acad Sci* 967, 176-182.

Jaubert AM, Pecquery R, Dieudonne MN, Cloix JF, Giudicelli Y, 1995. Estrogen binding sites in hamster white adipose tissue: Sex and site related variations, modulation by testosterone. *Gen Comp Endocrinol* 100: 179-187.

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J lipid Res* 35:1076-1084.

Kahn BB, Flier JS, 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481.

Karpe F, Olivecrona T, Olivecrona G, Samra JS, Summers LKM, Humphreys SM, Frayn KN, 1998. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissue in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *J Lipid Res* 39:2387-2393.

Kawaguchi I, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K, 2002. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose induced transcription. Regulation of carbohydrate responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 3829-3835.

Kersten S, Seydoux J, Petrs JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Washli W, 1999. Peroxisome proliferators-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498.

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

Kersten S, 2002. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol* 440: 223-234.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405: 421-424.

Kim HJ, Kalkchoff RK, 1975. Sex steroid influence on triglyceride metabolism. *J Clin Invest* 56: 888-896.

Kirkland JL, Hollenberg CH, Kindler S, Gillon WS, 1994. Effects of age and anatomic site on preadipocyte number in rat fat depots. *J Gerontol* 49: B31-35.

Kissebach AH, Evans DJ, Peiris A, Wilson CR, 1985. Endocrine characteristics in regional obesity: role of sex steroids. In: Vague J, Björntorp P, Guy Grand B, Rebuffé-Scrive M, Vague P (eds) *Metabolic Complications of Human Obesity*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 115-130.

Kissebach AH, Krakower GR 1994 Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 74: 761-811.

Konieczny SF, Emerson CP, 1984. 5-azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38: 791-800.

Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B, 1999. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 624-630.

Kvist H, Chowdhury B, Grangard U, Tylén U, Sjöström L 1988. Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: Predictive equations. *Am J Clin Nutr* 48: 1351-1361.

Lacasa D, Agli B, Mur B, Dausse JP, Giudicelli Y, 1994. Influence of ovarian status and regional fat distribution on protein kinase C in fat cells. *J Endocrinol* 140: 275-282.

Lacasa D, Garcia E, Agli B, Giudicelli Y, 1997. Control of rat preadipocyte adipose conversion by ovarian status: regional specificity and possible involvement of the mitogen-activated protein kinase-dependent and c-fos signaling pathways. *Endocrinol* 138: 2729-2734.

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

Lane MD, et al, 1990. Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diab Care* 13: 565-575.

Lang R, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T 1985. Atrial natriuretic factor - a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 314: 264.

Langin D, Holm C, Lafontan M 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: A major regulator of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc* 55: 93-109.

Lea-Currie YR, Monroe D, Mcintosh MK, 1999. Dhydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123: 17-25.

Liang YQ, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Lijama K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y, 2002. Estrogen receptor is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1103-1109.

Liu M, Xu X, Rang W, Li Y, Song H, 2004. Influence of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Card* 97: 485-493

Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM, 2002. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J* 16: 1057-1063.

Lönnqvist F, Thorne A, Large V, Arner P 1997. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1472-1480.

Luukkaa V, Savontaus E, Rouru J, Virtanen KA, Boss O, Huhtaniemi I, Koulu M, Pesonen U, Huupponen R, 2001. Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat. *Gynecol Endocrinol* 15: 103-112.

Ma H, Sprecher HW, Kolattukudy PE, 1998. Estrogen induces the production of PPAR γ endogenous ligands. *J Biol Chem* 273, 30131-30138.

Machinal F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R, Giudicelli Y, 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 140: 1567-1574.

Maison P, Byrne CD, Hales CN, Wareham NJ, 2000. Hypertension and its treatment influence changes in fasting nonesterified fatty acid concentrations: a link between the sympathetic nervous system and the metabolic syndrome? *Metabolism* 49: 81-87.

Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV, 2004. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the women's health initiative hormone trial. *Diabetologia* 47: 1175-1187.

Mayes JS, Watson GH, 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5: 197-216.

McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW, 1977. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60: 265-270.

Miettinen M, Isomaa V, Peltoketo H, Ghosh D, Vihko P 2000. Estrogen metabolism as a regulator of estrogen action in the mammary gland. *J Mamm Gland Biol Neopl* 5: 259-265.

Miller LK, Kral JG, Strains GW, Zumoff B, 1990. Androgen binding to ammonium sulfate precipitates of human adipose tissue cytosols. *Steroids* 55: 410-415.

Misso ML, Murata Y, Boon WC, Jones ME, Britt KL, Simpson ER, 2003. Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. *Endocrinology* 144: 1474-1480.

Mitznegg P, Estler CJ, Schubert E, 1974. Effect of estradiol on lipolysis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 23: 2337-2339.

Mizutani T, Nishikawa Y, Adachi H, Enomoto T, Ikegami H, Nomura T, Miyake A, 1994. Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 950-954.

Nadal A, Díaz M, Valverde MA, 2001. The estrogen Trinity: Membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* 16: 251-255.

Nakae J, Accili D, 1999. The mechanism of insulin action. *J Pediatr endocrinol Metab* 12: 721-731.

Nilsson-Ehle PE, Schotz MC, 1976. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res* 17: 536-541.

Nolan C, Proietto J, 1995. The effects of oophorectomy and female sex steroids on glucose kinetics in the rat. *Diab Res Clin Procl* 30: 181-185.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T, 1998. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101(6): 1354-1361.

Olefsky, JM, 2000. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J Clin Invest* 106: 467-472.

Pallier E, Aubert R, Lemonnier D, 1980. Effect of diet and ovariectomy on adipose tissue cellularity in mice. *Reprod Nutr Dev* 20: 631-363.

Palin SL, McTernan PG, Anderson LA, Sturdee DW, Barnett AH, Kumar S, 2003. 17β -Estradiol and Anti-estrogen ICI: Compound 182,780 Regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism* 52: 383-388.

Pasquier Yn, Pecquery R, Giudicelli Y, 1988. Increased adenylate cyclase catalytic activity explains how estrogens “in Vivo” promote lipolytic activity in rat white fat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 1151-1159.

Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Kersten S, 2004. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 114: 94-103.

Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B, 1992. Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 85: 13-19.

Pedersen SB, Fuglsig S, Sjogren P, Richelsen B. 1996. Identification of steroid receptors in human adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 26: 1051-1056.

Pi-Sunyer FX 1993. Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med* 119: 655-660.

Pravenec M, Zildek V, Landa V, Simakova M, Mlejnek P, Kazdova L, et al, 2004. Genetic analysis of “metabolic syndrome” in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Res* 53 (suppl 1): S15-22.

Prins JB, O’Rahilly S, 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci* 92: 3-11.

Pond CM, Mattacks CA, 1991. The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int J Obes* 15: 609-618.

Puah JH, Bailey CJ, 1985. Effect of ovarian hormones on glucose metabolism in mouse skeletal muscle. *Endocrinol* 117:1336-1340.

Rajala MW, Scherer PE, 2003. The adipocyte – at the crossroads of energy homeostasis. Inflammation and atherosclerosis. *Endocrinol* 144: 3765-3773.

Reaven GM, Chang H, Hoffman BB, Azhar S 1989. Resistance to insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes from spontaneously hypertensive rats. *Diabetes* 38: 1155-1160.

Reaven GM, 2003. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2399-2403.

Rebuffé-Scrive M, 1987. Sex Steroid hormones and adipose tissue metabolism in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Acta Physiol Scand* 129: 471-477.

Rebuffé-Scrive M, Eldh J, Hafström LO, Björntorp P, 1989. Metabolism of mammary, abdominal and femoral adipocytes in women before and after menopause. *Metabolism* 35: 792-797.

Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW, 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 33: 30413-30416.

Reubinoff BE, Wurtman J, Rojansky N, Adler D, Stein P, Schenker JG, Brzezinski A, 1995. Effects of ovarian hormone replacement therapy on weight, body composition, fat distribution. *Fertil Steril* 64: 963-968.

Rodbell M, 1964. Metabolism of isolated fat cells: Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-380.

Roden M, Stingl H, Chandramouli V, Schumann WC, Hofer A, Landau BR, Nowotny P, Waldhausl W, Shulman GI, 2000. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49: 701-707.

Roncari D, Van R, 1978. Promotion of human adipocyte precursor replication by 17-beta estradiol in culture. *J Clin Invest* 62: 503-508.

Rosen ED, Spiegelman BM, 2001. PPAR gamma: A nuclear regulator of metabolism, differentiation and cell growth. *J Biol Chem* 276: 37731-37734.

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN, 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42: 664-668.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwers J, 1996. PPAR α activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15: 5336-5348.

Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L, 1989. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L3 adipocytes is mediated by posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264: 9030-9038.

Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani k, Sato N, Mori M, 1997. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154: 285-292.

Shimomura K, Shimizu H, Tsuchiya T, Abe Y, Uehara Y, Mori M, 2002. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endoc J* 49: 417-423.

Shulman GI, 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, W-Chin W, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger GA, Zapt J, Meier CHA, 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100: 2858-2864.

Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-lorance S, Sun T, Fischer CR, Qin K, Mendelson CR, 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52: 185-213.

Sjostrom L, Smith U, Krotkiewski M, Björntorp P, 1972. Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism* 21: 1143-1153.

Smas CM, Sul HS, 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 309: 697-710.

Soltis EE, Cassis LA, 1991. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens* 275: 681-692.

Song D, Arikawa E, Galipeau DM, Yeh JN, Battell ML, Yuen VG, Mcneill JH, 2005. Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypert* 18: 1189-1194.

Soukas A, Coken P, Socco ND, Friedman JM, 2000. Leptin-specific patterns of genes expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 14: 963-980.

Spiegelman BM, Flier JS, 1996 Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC, 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-2093.

Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Ballongeville J, Auwerx J, 1995. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. *J Clin Invest* 95: 705-712.

Stralfors P, Belfrage P, 1983. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 258: 15146-15152.

Stralfors P, Bjorgell P, Belfrage P, 1984. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylation sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3317-3321.

Svedberg J, Björntorp P, Smith U, Lönnroth P, 1990. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 39: 570-574.

Sztalryd C, Kraemer FB, 1995. Regulation of hormone-sensitive lipase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 44:1391-1396.

Tchernof A, Desmeules A, Richard C, Laberge P, Daris M, Mailloux J, Rheaume C, Dupont P, 2004. Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3425-3430.

Tomlinson JW, Stewart PM, 2002. The functional consequences of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in adipose tissue. *Horm Metab Res* 34: 746-751.

Tonkelaar ID, Seidell JC, Van Noord PA, Baanders-van H, Jacobus JH, Bruning PF, 1989. Factors influencing waist/hip ratio in randomly selected pre- and post-menopausal women in the dom-project (preliminary results). *Int J Obes* 13: 817-824.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM 1994b. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156.

Trayhurn P, Beattie JH, 2001. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60: 329-339.

Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essine K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M, 2004. Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44: 271-276.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH, 1994. Metformin decreases plasma insulin levels and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 267: H1250-H1253.

Verreth W, Ganame J, Mertens A, Bernar H, Herregods MC, Holvoet P, 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor- α,γ -agonist improves insulin sensitivity and prevents loss of left ventricular function in obese dyslipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 922-928.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS, 1997. Peroxisome proliferators-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J clin Invest* 99: 2416-2422.

Wade GN, Gray JM. 1978. Cytoplasmic 17β -[^3H]estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology* 103: 1695-1701.

Wade GN, Gray JM, Bartness TJ, 1985. Gonadal influences on adiposity: *Int J Obes* 9 (suppl 1): 83-92.

Wajchenberg BL, 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their Relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 21: 697-738.

Westergren H, Danielsson A, Nyström FH, Stralfors P, 2005. Glucose transport is equally sensitive to insulin stimulation, but basal and insulin-stimulated transport is higher, in human omental compared with subcutaneous adipocytes. *Metabolism* 54: 781-785.

Willson TM, Wahli W, 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1: 235-241.

Wu-Peng S, Rosenbaum M, Nicolson M, Chua SC, Leibel RL, 1999. Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats. *Obes Res* 7: 586-592.

Wynne FL, Payne JA, Cain AE, Reckelhoff JF, Khalil RA, 2004. Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 43: 405-412.

Yoneda N, Saito S, Kimura M, Yamada M, Lida M, Murakami T, Irahara M, Shima K, Aono T, 1998. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res* 30: 263-265.

Youngstrom TG, Bartness TJ, 1998. White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol* 275: R1475-1493.

Youngstrom TG, Bartness TJ, 1995. Chatecholaminergic innervation of white adipose tissue in the Siberian hamster. *Am J Physiol* 268: R744-R751.

Zang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

Zang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li E, Song Q, Chen YE, 2004. Selective disruption of PPAR γ 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(29): 10703-10708.

7. 1. Comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **064/03** relativo ao projeto intitulado "Estudo dos possíveis mecanismos envolvidos no acúmulo lipídico associado à falta de estrógeno" que tem como responsáveis Leida Maria Botion, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **05.11.2003**.


Este certificado expira-se em **05.11.2008**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **064/03** related to the project entitled "Evolution of the mechanisms involved in the lipid accumulation associated with estrogen deficiency", under the supervision of Leida Maria Botion is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **05.11.2003**.

This certificate expires in **05.11.2008**

Belo Horizonte, 05 de novembro de 2003


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)