

ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA

*Efeito do fenofibrato sobre o metabolismo de ratos com ou
sem indução de esteatose hepática*

Tese de doutorado apresentada à banca examinadora designada pelo programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Leida Maria Botion

Belo Horizonte, 2007

Ao meu querido Birú,
aos meus pais Waldir e Luzdalva
e irmãos Neubio e Danúbio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Orientadora, Prof. Dra. Leida Maria Botion, pela excelente orientação, plena de competência e profissionalismo, imprescindível na minha formação científica e, sobretudo pela confiança e amizade.

Agradeço aos colegas do Laboratório de metabolismo celular: Eva Abeles, Ana Carolina, Adriana, Thiago, Natália, Jonas e em especial às amigas de coração: Érica, Laura e Zélia pela ajuda na execução do trabalho e pelos momentos divertidos!!

Agradeço à prof. Dra. Gleydes Gambogi Parreira e ao prof. Dr. Almir Martins pela importante colaboração neste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela troca de idéias e amizade adquirida.

Agradeço à amiga Helen pela ajuda, disponibilidade e momentos agradáveis convvidos durante a execução do PCR em tempo real. Agradeço também à Virgínia e ao Serginho pela constante troca de idéias a respeito da técnica.

Agradeço ao prof. Dr. Cândido Celso Coimbra pela cooperação e pela dosagem de insulina neste trabalho. Agradeço também ao André pelas dicas constantes e apoio técnico.

Agradeço ao prof. Dr. Robson Santos pela cooperação e por permitir a execução da técnica Western Blot em seu laboratório.

Agradeço à Betinha, Léo, Walquíria, Rodrigo e Fabiano pelas trocas de idéias e ajuda constante a respeito do Western.

Agradeço à prof. Dra. Ana Lúcia Cândido pelas dicas, apoio, incentivo e amizade adquirida.

Agradeço à Adelaide pela amizade e claro, pelos animais disponibilizados. Agradeço também à Vanessa pelo cuidado dos mesmos.

Agradeço aos amigos conquistados no departamento pelo convívio, momentos de festa e culinária!

Agradeço também à Rose, pela alegria e convívio agradável.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela disposição, persistência e seriedade no trabalho.

Agradeço à Celinha, secretária do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia pela cooperação, eficiência e dedicação naquilo que faz.

Agradeço ao meu pequeno Birú pela ajuda constante na correção, formatação e trocas de idéias sobre o trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve por finalidade estudar os efeitos do fenofibrato, ativador do PPAR α (receptor nuclear ativado pelos proliferadores de peroxissomos- α) e da esteatose hepática, induzida pela administração dietética de ácido orótico, sobre o metabolismo do tecido adiposo (TA) e fígado de ratos.

Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) alimentados com dieta balanceada (C); 2) alimentados com dieta balanceada adicionada de 100 mg.Kg⁻¹PC.dia⁻¹ de fenofibrato (C+F) 3) alimentados com a dieta C suplementada com 1% de ácido orótico (AO); 4) alimentados com dieta balanceada contendo 1% de AO adicionado de 100 mg.Kg⁻¹PC.dia⁻¹ de fenofibrato (AO+F). Os animais foram alimentados por um período de 9 dias.

O tratamento com fenofibrato reduziu o ganho de peso corporal, a adiposidade, a concentração plasmática de triacilglicerol (TAG) e de colesterol total mas não influenciou a ingestão alimentar e as concentrações plasmáticas de leptina, glicose, glicerol, ácidos graxos e insulina quando comparado aos animais controles. A atividade da enzima lípase lipoprotéica (LPL) do TA epididimal apresentou-se diminuída nos animais tratados com fenofibrato em relação aos controles. Além disso, pode ser verificada uma redução de 34 % na lipogênese *de novo* do tecido adiposo induzida pelo tratamento com fenofibrato quando comparada aos controles. A captação de glicose por adipócitos foi avaliada a partir da incubação dessas células com 2- deoxi [³H]glicose (2-DG), e os resultados mostraram que o tratamento com fenofibrato aumentou a captação de glicose tanto no estado basal quanto estimulada pela insulina por adipócitos quando comparada ao controle. Esse efeito não foi devido ao aumento no conteúdo da proteína GLUT-4 (transportador de glicose) no TA. Os resultados também demonstraram que o fenofibrato aumentou a expressão do mRNA da enzima acil CoA oxidase (ACO) e do PPAR α no fígado e da enzima carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) e ACO no TA em relação aos controles.

A administração dietética de AO aos animais durante 9 dias induziu um aumento

significante no conteúdo hepático de gordura total (160%) e redução na concentração plasmática de TAG (30%) e colesterol total (28%) comparado aos controles. A administração de fenofibrato aos animais alimentados também com AO (AO+F) impediu o acúmulo de gordura hepática e reduziu a concentração plasmática de TAG (50%) e colesterol (46%) em relação ao grupo não tratado com fenofibrato(AO). Consistentemente, a análise histológica do fígado dos animais AO mostrou um acentuado acúmulo de gordura ao passo que o tratamento com fenofibrato nesses animais impediu o desenvolvimento da esteatose. O tratamento com AO não alterou a lipogênese *de novo*, entretanto, a administração de fenofibrato diminuiu as taxas lipogênicas no tecido adiposo dos animais AO+F. Os resultados mostraram um aumento de 40% na atividade da enzima LPL do tecido adiposo dos animais AO comparado aos controles ao passo que o tratamento com fenofibrato (OA+F) reduziu em 50% a atividade dessa enzima em relação ao grupo AO. A suplementação com AO aumentou a captação de glicose no estado basal e estimulado com insulina por adipócitos em relação ao C. Esse efeito foi devido, pelo menos em parte, ao aumento no conteúdo da proteína GLUT-4 no TA dos animais AO. O tratamento com fenofibrato (OA+F) não alterou a captação basal ou estimulada pela insulina por adipócitos comparado ao grupo AO. A expressão hepática do mRNA para o PPAR α e a enzima ACO foram 85% e 68% reduzidas nos animais AO comparada aos controles, respectivamente. O tratamento com fenofibrato (OA+F) aumentou a expressão hepática do PPAR α e da enzima ACO ao passo que a expressão da CPT-1 não foi alterada quando comparado ao grupo não tratado, AO.

Em resumo, esse trabalho fornece evidências de que o fenofibrato impede o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pela administração dietética de AO através do aumento no catabolismo hepático de lipídios. Esse efeito é provavelmente mediado pelo PPAR α , principalmente através da indução da expressão da enzima alvo ACO envolvida no metabolismo de lipídios. Embora os compartimentos mitocondriais e peroxissomais contribuam para a oxidação dos AG, nossos dados não apontam a mitocôndria como um sítio

importante para a oxidação de lipídios induzida pelo tratamento com fenofibrato. Além dos efeitos no fígado, o fenofibrato tem influência relevante no metabolismo do tecido adiposo que contribui, por sua vez, para a redução da adiposidade, a qual parece ser conseqüente ao aumento da oxidação local de ácidos graxos, e melhora da captação celular de glicose.

ABSTRACT

The experiments reported here were designed to study the effect of fenofibrate (stimulant of peroxisome proliferator-activated receptor α - PPAR α) and hepatic steatosis induced by orotic acid administration on the metabolism of adipose tissue and liver.

Wistar male rats were divided into 4 experimental groups: 1) fed a balanced diet (C); 2) fed a balanced diet plus 100 mg.Kg⁻¹bw.day⁻¹ fenofibrate (C+F) 3) fed a balanced diet supplemented with 1% orotic acid (OA); 4) fed C diet containing 1% OA plus 100 mg.Kg⁻¹bw.day⁻¹ fenofibrate (OA+F), which were fed during 9 days.

Fenofibrate lowered body weight gain and adiposity, plasma triglyceride and total cholesterol but had no influence on food intake, plasma leptin, glucose, glycerol, free fatty acid (FFA) and insulin levels when compared to control animals. The activity of lipoprotein lipase (LPL) of treated animals decreased 50 % in epididymal adipose tissue. In this study, we have shown a 34 % decrease of epididymal adipose tissue *de novo* lipogenesis by fenofibrate compared to C. The glucose uptake was also evaluated by adipocyte incubation with deoxyglucose (2-DG). Fenofibrate treatment increased the glucose uptake in basal or insulin-stimulated adipocytes when compared to C. This effect was not due to increased GLUT-4 protein content on adipose tissue. The results also demonstrate that fenofibrate increased the mRNA expression of ACO and PPAR α in the liver and CPT-1 and ACO in the adipose tissue when compared to control animals.

The administration of OA to rats for 9 days induced significant increase in total fat liver content (160%) and decreases in plasma TG concentration (30%) and total cholesterol (28%) compared to control animals. Fenofibrate administration to rats fed OA (OA+F) prevented fat liver induction and reduced the plasma triglyceride (50%), and cholesterol (46%) concentrations in relation to the not treated group (OA). Consistently, histological examination of the liver from OA rats showed marked lipid accumulation whereas the treatment with fenofibrate in these animals prevented the development of fat liver. OA

treatment did not change *de novo* lipogenesis, however, fenofibrate administration caused a 40% decrease in the lipogenic rates in adipose tissue from OA+F treated rats. The results showed 40% increase in LPL activity in epididymal adipose tissue from OA treated rats when compared to C group while the fenofibrate treatment (OA+F) reduced in 50% the LPL activity in relation to OA group. OA administration enhanced the adipocyte glucose uptake in basal or insulin-stimulated conditions compared to control group. This effect was due, at least in part, to an increase in the adipose tissue GLUT-4 protein content of OA treated rats. The fenofibrate treatment (OA+F) did not change the glucose uptake in basal or stimulated adipocyte when compared to OA animals. The liver mRNA expression of PPAR α and ACO were 85% and 68% decreased in OA treated group when compared to control group, respectively. The fenofibrate treatment (OA+F) increased the liver PPAR α and ACO expression whereas the CPT-1 expression was not altered when compared to the not treated group OA.

In summary, we provide evidence that fenofibrate decreases the hepatic steatosis induced by orotic acid administration through enhancement of lipid catabolism in rat liver. This effect is probably mediated by PPAR α , mainly through the induction of the target enzyme ACO involved in hepatic lipid metabolism. Although both the peroxisomal and the mitochondrial compartments contribute to increased oxidation of fatty acids, our data did not support a role of mitochondria in wasting energy, which is instead an intrinsic property of peroxisomal β -oxidation. Besides its effects on liver, fenofibrate seems to play a relevant role on the metabolism of adipose tissue which may contribute to decrease adiposity, probably as a result of the local increased fatty acid oxidation in the tissue, and improve the glucose uptake by adipocyte.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo de carboidratos	1
1.2 Metabolismo lipídico	4
1.3 Adipócitos e a secreção de adipocininas	8
1.4 Esteatose hepática induzida pelo ácido orótico	10
1.5 Receptores nucleares (PPARs) e o metabolismo intermediário	12
1.6 PPAR α e adiposidade	15
2.0 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos específicos	17
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais e seu tratamento	18
3.2 Metodologia	19
3.2.1 Determinação do conteúdo hepático de lipídios	19
3.2.2 Análise morfologia dos hepatócitos	20
3.2.2.1 Processamento do material para a microscopia de luz (ML)	20
3.2.3 Isolamento de adipócitos	20
3.2.4 Captação de glicose	20
3.2.5 Análise semi-quantitativa do transportador de glicose (GLUT-4) no tecido adiposo por western blot	21
3.2.6 Medida da atividade da lipase lipoprotéica	22
3.2.7 Lipogênese <i>in vitro</i>	24
3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRTR) – quantificação absoluta	24
3.2.8.1 Extração do RNA total	24

3.2.8.2 Eletroforese em gel de agarose	25
3.2.8.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para RT-PCR e PCR em tempo real	26
3.2.8.4 Transcrição reversa	26
3.2.8.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.	27
3.2.8.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata	27
3.2.8.7 Purificação dos fragmentos do PPAR α , ACO, CPT-1 e β -actina	28
3.2.8.8 PCR em tempo real e quantificação absoluta	29
3.2.9 Dosagens bioquímicas	30
3.2.10 Análise dos dados	30
4.0 RESULTADOS	32
4.1 Ingestão alimentar, peso corporal e biometria dos tecidos	32
4.2 Parâmetros plasmáticos	33
4.3 Correlação entre o peso do tecido adiposo epididimal e a leptina plasmática	35
4.4. Conteúdo hepático de lipídios totais	36
4.5. Análise histológica do fígado	37
4.6 Captação de glicose por adipócitos do tecido adiposo epididimal	40
4.7 Conteúdo da proteína GLUT-4 do tecido adiposo epididimal	42
4.8 Atividade da enzima lípase lipoprotéica	44
4.9 Lipogênese “ <i>in vitro</i> ” do tecido adiposo epididimal	45
4.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRTR)	46
5.0 DISCUSSÃO	52
5.1 Efeito do fenofibrato sobre o metabolismo de animais alimentados	52
5.2 Efeito da esteatose hepática e do tratamento com fenofibrato sobre o metabolismo	61
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	86

LISTA DE FIGURAS

1- Ilustração do processo de captação de glicose através do transportador de glicose- GLUT 4.	03
2- Principais vias metabólicas do tecido adiposo.	04
3- Destinos metabólicos dos ácidos graxos no hepatócito.	06
4- Estrutura química do ácido orótico.	11
5- Estrutura química do fenofibrato.	14
6- Correlação positiva entre a leptina plasmática e peso do tecido adiposo epididimal.	35
7- Efeito dos diferentes tratamentos sobre o conteúdo hepático de lipídios totais.	36
8- Prancha 1 - Corte histológico de fígado.	39
9a- Efeito dos diferentes tratamentos sobre a captação basal (sem estímulo) de glicose por adipócitos.	40
9b- Efeito dos diferentes tratamentos sobre a captação de glicose estimulada por insulina por adipócitos.	41
10a- Autorradiograma representativo de western blot para a proteína GLUT-4 e a β -actina.	43
10b- Análise semi-quantitativa da proteína GLUT-4.	43
11- Atividade da enzima LPL (mU) no tecido adiposo epididimal de ratos submetidos aos diferentes tratamentos.	44
12- Efeito dos diferentes tratamentos sobre a lipogênese basal do tecido adiposo epididimal “in vitro”.	45
13- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática do PPAR α .	47
14- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão do PPAR α no tecido adiposo.	47
15- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática da ACO.	48
16- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão da ACO no tecido adiposo.	49
17- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática da CPT-1.	49
18- Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão da CPT-1 no tecido adiposo.	50
19- Esquema dos prováveis mecanismos redutores da adiposidade evidenciados através do tratamento com fenofibrato.	57
20- Esquema dos efeitos metabólicos induzidos pelo AO no fígado e tecido adiposo.	68

LISTA DE TABELAS

- 1-** Composição básica da dieta controle (%). **18**
- 2-** Efeito dos diferentes tratamentos sobre o a ingestão alimentar por dia, peso corporal e **32**
de tecidos.
- 3-** Efeito dos diferentes tratamentos sobre a glicemia, a concentração plasmática de **34**
insulina, ácidos graxos livres, glicerol e leptina.
- 4-** Efeito dos diferentes tratamentos sobre a expressão dos genes para PPAR α , ACO e **51**
CPT-1 no fígado e tecido adiposo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Acil CoA oxidase
AGL	Ácidos graxos não esterificados
AgRP	Proteína <i>agouti</i>
AO	Ácido orótico
AO+F	Dieta controle contendo ácido orótico (1 %) e fenofibrato (100 mg ⁻¹ .Kg ⁻¹ de PC.dia ⁻¹)
ApoB	Apolipoproteína B
ASP	“Acylation Stimulating Protein”
C	Dieta controle
C+F	Dieta controle contendo fenofibrato (100 mg ⁻¹ .Kg ⁻¹ de PC.dia ⁻¹)
CART	Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
cDNA	DNA complementar
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
GLUT-4	Transportador de glicose - 4
HSL	Lípase hormônio sensível
IL-6	Interleucina 6
LPL	Lípase lipoprotéica
MTP	Proteína de transferência de triacilgliceróis microsomal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRTR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
POMC	Pro-ópio-melanocortina
PPARs	Receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos
RE	Elementos responsivos
RT	Transcrição reversa
TAG	Triacilgliceróis
TNFα	Fator de necrose tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

Em condições normais, a regulação do metabolismo de lipídios e de carboidratos se dá através da integração de diferentes órgãos-chaves como o fígado e os tecidos adiposo e muscular. A eficiência dessa relação é essencial para a manutenção tanto da normolipemia quanto da normoglicemia. Juntos, esses tecidos representam os polos de um grande ciclo metabólico nos quais os metabólitos de um tecido são usados como substratos para o outro. O controle do metabolismo de lipídios e carboidratos é, em grande extensão, dependente da regulação eficiente desse ciclo.

1.1 Metabolismo de Carboidratos

Em indivíduos normais a concentração plasmática de glicose é mantida dentro de limites estreitos os quais dependem do balanço entre a absorção intestinal, a produção hepática e renal, a captação periférica e o metabolismo da glicose pelos tecidos periféricos.

Os passos metabólicos que levam à oxidação ou armazenamento da glicose são regulados por sistemas enzimáticos que são estimulados pelos substratos e inibidos pelos produtos. Isto pode ser demonstrado, em particular, pelo aumento da oxidação e armazenamento da glicose após uma refeição rica em carboidratos e pela inibição da síntese de glicogênio via excesso intracelular desse polímero de glicose. Essa regulação está sob o controle da insulina, que estimula o armazenamento de substratos energéticos, e dos hormônios contra-reguladores, especialmente adrenalina e glucagon, que estimulam a mobilização desses substratos quando há necessidade de energia (SALTIEL & KAHN, 2001).

A insulina, principal hormônio envolvido no metabolismo de carboidratos, estimula a captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo e diminui a produção hepática de glicose,

agindo assim como um regulador primário da concentração sanguínea da hexose. Além disso, a insulina também estimula o crescimento e a proliferação celular.

O aumento da captação de glicose pelos tecidos adiposo e muscular ocorre por estímulo da translocação do GLUT-4 (transportador de glicose) dos sítios intracelulares para a membrana celular. Mais de 75% da utilização de glicose dependente de insulina ocorre no músculo esquelético, ao passo que o tecido adiposo contribui apenas com uma pequena fração dessa utilização (KLIP & PAQUET, 1990). Apesar desta baixa utilização de glicose pelo tecido adiposo, foi observado que camundongos *knockout* para o receptor de insulina do tecido muscular apresentam tolerância normal à glicose (BRUNING, et al., 1998), ao contrário dos camundongos *knockout* para o GLUT-4 no tecido adiposo que apresentam tolerância alterada à glicose (KAHN & ABEL, 2001). Os trabalhos de Peroni (2001) e Zisman et al. (2000) demonstraram que a deleção do GLUT-4 tanto no músculo como no tecido adiposo causa intolerância à glicose nos animais. Entretanto, a deleção sítio específica desse gene no tecido adiposo causa o desenvolvimento de diabetes mais severo quando comparado à deleção do GLUT-4 especificamente no músculo. Além disso, o trabalho de Kotani e colaboradores (2004) mostrou que a insulinemia dos animais com deleção do GLUT-4 do tecido adiposo apresentou-se maior em relação aos animais com deleção do GLUT-4 no músculo. Esses dados sugerem uma função importante do tecido adiposo na regulação da captação de glicose e no desenvolvimento de diabetes. A figura 1 demonstra resumidamente como ocorre a translocação do GLUT-4 para a membrana celular sob o estímulo da insulina.

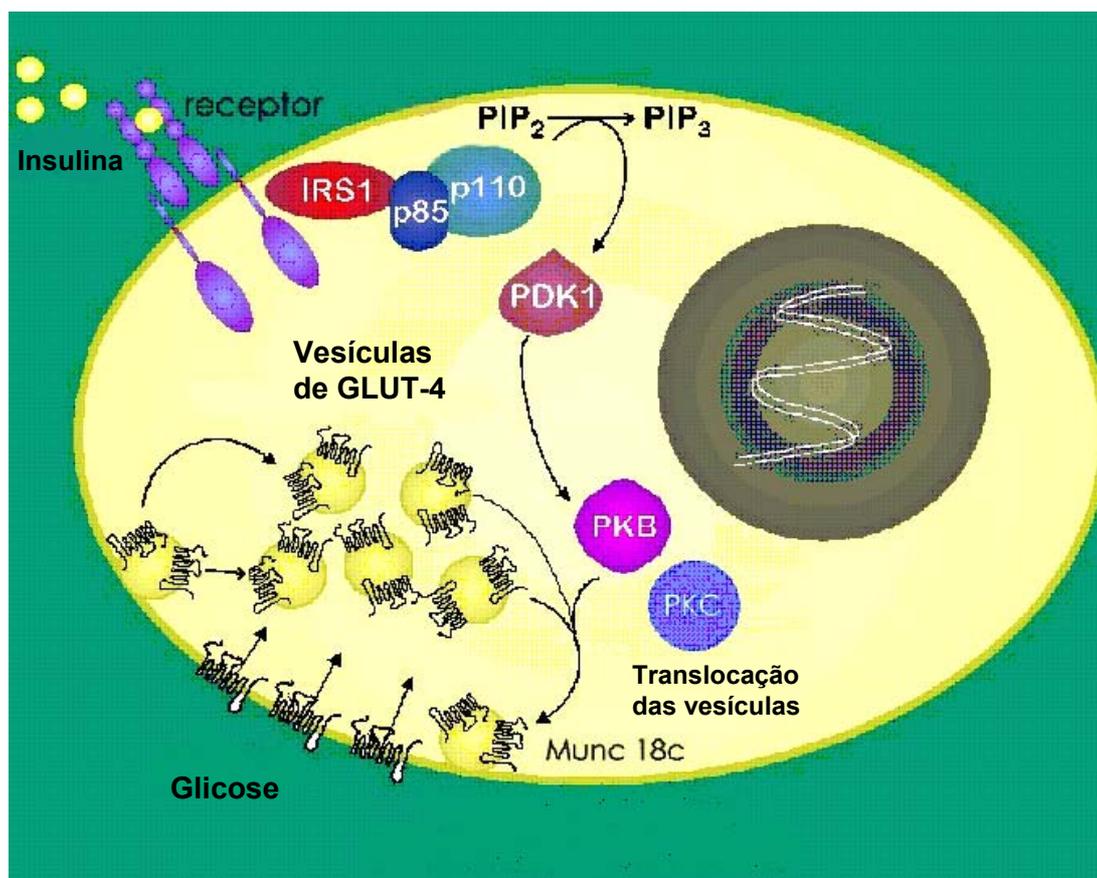


Figura 1. Ilustração do processo de captação de glicose através do transportador de glicose, GLUT-4.

Várias doenças de origem metabólica estão associadas a estados de resistência à insulina tais como a obesidade (revisão: KAHN & FLIER, 2000), a hiperlipidemia, a aterosclerose (revisão: NIGRO et al., 2006), a esteatose hepática (MARCHESINI et al., 2003) e a síndrome do ovário policístico (ROBINSON et al., 1996). A intolerância à glicose pode ser consequente a uma menor sensibilidade tecidual aos efeitos da insulina, os quais se manifestam por alterações do sistema de sinalização, de captação, do metabolismo ou ainda do armazenamento da glicose. A redução da sensibilidade à insulina em pacientes obesos e/ou com diabetes tipo II resulta em diminuição do transporte de glicose e falha na supressão da produção hepática de glicose em resposta a esse hormônio.

1.2 Metabolismo lipídico

O conteúdo de gordura corporal é determinado pelo balanço entre a deposição e a mobilização de lipídios do tecido adiposo. A deposição lipídica, na forma de triacilgliceróis (TAG), é dependente da velocidade de síntese *de novo* de ácidos graxos (lipogênese) no tecido adiposo e da disponibilidade e captação de ácidos graxos não esterificados (AGL) liberados dos triacilgliceróis transportados por lipoproteínas plasmáticas, enquanto que a liberação de AGL para a circulação é dependente principalmente, da velocidade de hidrólise dos TAG armazenados no próprio tecido (Figura 2).

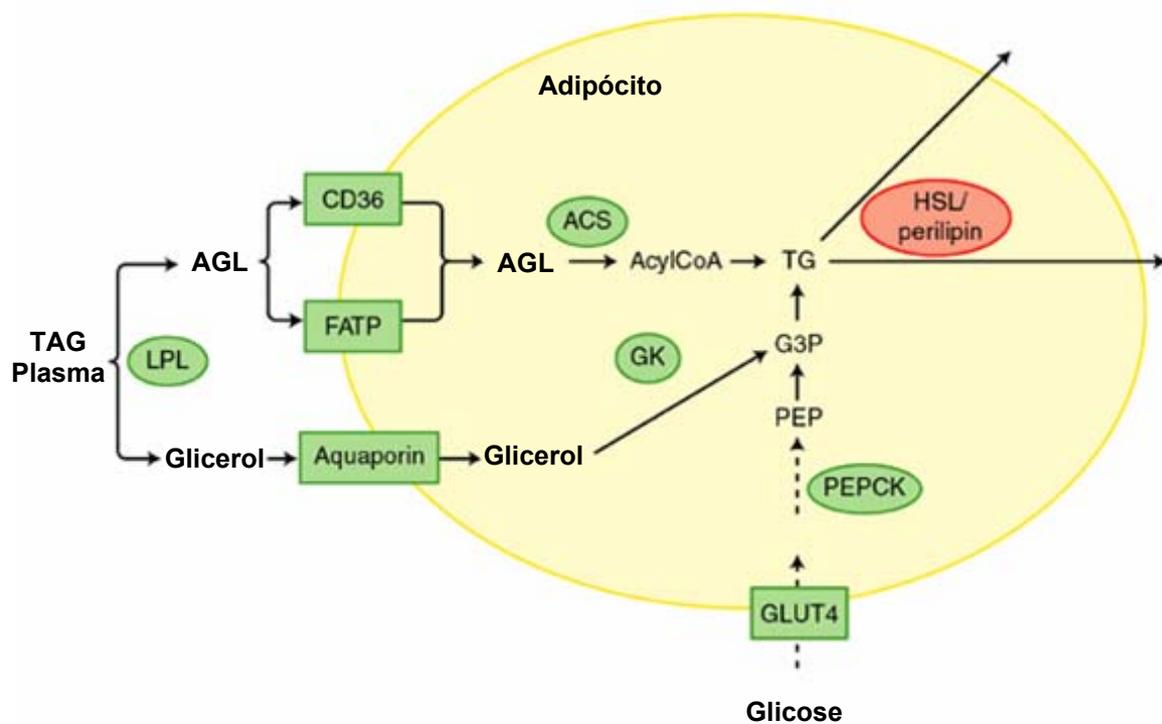


Figura 2. Principais vias metabólicas do tecido adiposo. **CD36** e **FATP**: Transportadores de AGL; **ACS**: Acil-CoA sintetase; **GK**: gliceroquinase; **G3P**: glicerol-3-fostato; **PEPCK**: fosfoenol piruvato carboxiquinase; **PEP**: fosfoenol piruvato; **LPL**: Lípase lipoprotéica; **HSL**: lípase hormônio sensível (Adaptado de Savage, 2005).

A síntese de ácidos graxos é um processo que ocorre tanto no tecido adiposo quanto no fígado de mamíferos. É bem estabelecido que dietas ricas em carboidratos e o conseqüente aumento da secreção de insulina pelo pâncreas estimulam a atividade lipogênica, enquanto

que o jejum inibe este processo (KERSTEN, 2001). O principal substrato utilizado para a síntese *de novo* de ácidos graxos é a glicose, embora tanto o piruvato quanto o lactato possam ser utilizados como precursores lipogênicos e gliceroneogênicos (KATZ & WALS, 1974; BOTION et al, 1995). Após a síntese no tecido adiposo, os ácidos graxos são esterificados e o armazenamento como TAG constitui o principal substrato energético. No fígado, além da disponibilidade de ácidos graxos e de glicerol, a síntese de TAG é dependente de outros mecanismos complexos de regulação tais como o transporte de ácidos graxos para a oxidação mitocondrial, síntese de apoproteínas e transporte das partículas nascentes de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) através do compartimento celular (AARSLAND et al, 1996). Além da utilização dos ácidos graxos sintetizados *de novo*, os AGL provenientes da dieta ou da mobilização lipídica no tecido adiposo também podem ser utilizados para a síntese hepática de TAG. Desta forma, o fígado constitui um sítio chave na integração metabólica para onde os ácidos graxos são mobilizados e dependendo das necessidades corporais podem ser estocados ou utilizados como fonte energética através da β -oxidação ou ainda serem exportados como VLDL (Figura 3).

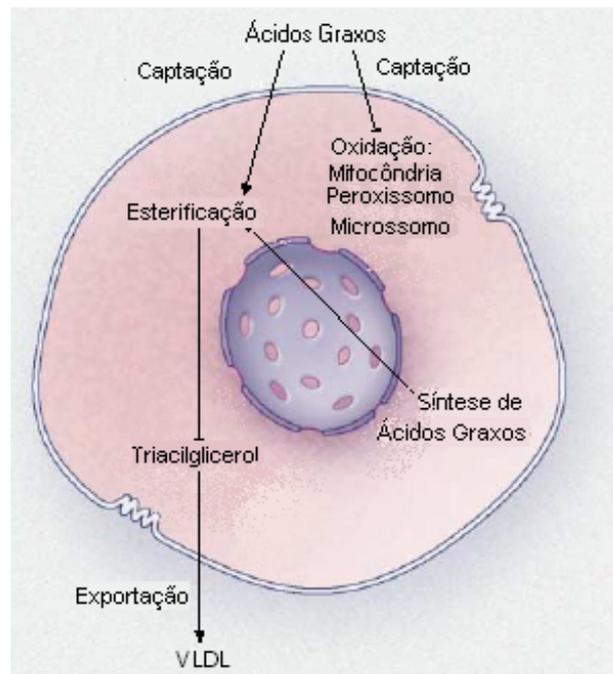


Figura 3. Destinos metabólicos dos ácidos graxos no hepatócito.

(Adaptado de Angulo, 2002).

Os TAG plasmáticos constituem duas classes: a) os quilomicra derivados dos lipídios dietéticos e b) as lipoproteínas de muito baixa densidade secretadas pelo fígado. A captação e a deposição dos TAG plasmáticos no tecido adiposo requerem sua conversão inicial para AGL e glicerol, numa reação catalisada pela enzima lipase lipoprotéica (KARPE et al., 1998; LADU et al., 1991).

A lipase lipoprotéica (LPL) é uma enzima localizada no endotélio vascular de tecidos extra-hepáticos, como tecido adiposo, coração e músculo esquelético, a qual, é responsável pelo “clearance” das lipoproteínas circulantes. Sua atividade pode ser alterada rapidamente em resposta ao estado nutricional (BOTHAM et al, 1997). São conhecidas duas isoformas da enzima: uma que é cataliticamente ativa, tem alta afinidade pela heparina e encontra-se predominante no tecido adiposo de animais alimentados, e outra que é cataliticamente inativa,

tem baixa afinidade por heparina e predomina no tecido adiposo durante o jejum (WU et al, 2003).

A atividade da LPL no tecido adiposo branco não é modulada somente pelo estado nutricional, mas também pela composição da dieta (DESHAIES et al, 1988). Estudos de Bravo et al (1994) mostraram que diferentes tipos de ácidos graxos originários da dieta são removidos do plasma pela hidrólise dos quilomicra em velocidades diferentes. Por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados n-6, como o ácido linoleico, são removidos do plasma mais rapidamente quando comparados aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Esses resultados indicam que a atividade da LPL pode ser modulada de maneira diferenciada de acordo com o tipo de ácido graxo ingerido.

Picard et al. (1999) demonstraram que o aumento na concentração da insulina plasmática é necessário e determinante das alterações da atividade da LPL tanto no músculo como no tecido adiposo e que a modulação pós-prandial da atividade da enzima é tecido-específica. Após uma refeição, a atividade da enzima é aumentada no tecido adiposo ao passo que no músculo sua atividade é diminuída (BOTION, 2001). Estudos do grupo de Robinson (CRYER et al., 1976) demonstraram a existência de uma forte correlação entre a atividade da LPL e a captação de ácidos graxos de quilomicra marcados radioativamente, pelo tecido adiposo de ratos, sugerindo que a LPL é um determinante importante da distribuição de lipídios entre os tecidos (PREISS-LANDL et al., 2002).

No estado de jejum, as fontes energéticas corporais alternam de carboidratos e gorduras para gorduras, principalmente, e os ácidos graxos que foram estocados no período pós-prandial são liberados pelos adipócitos. O fluxo de AGL é primariamente dependente dos TAG armazenados no tecido adiposo os quais são liberados deste pelo processo de lipólise, e transportados para os tecidos onde são oxidados para produção de energia, e no caso do

figado, também podem ser incorporados em lipoproteínas, conforme já relatado (ARNER, 2001).

A lipase hormônio sensível (HSL), enzima que controla o passo limitante na mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, é regulada agudamente pelo seu estado de fosforilação. As catecolaminas são potentes agentes lipolíticos que ativam a enzima através de fosforilação de resíduos de serina, num processo dependente do aumento intracelular de AMPc e posterior ativação da proteína kinase A (ARNER, 1996; LARGE & ARNER, 1998). A insulina é um inibidor potente da lipólise do tecido adiposo e sua ação se dá por inibição da atividade da HSL, primariamente através da redução dos níveis intracelulares de AMPc conseqüentes à ativação da enzima fosfodiesterase 3B, específica do tecido adiposo (DEGERMAN et al, 1997).

Assim, os AGL provenientes do tecido adiposo constituem uma fonte energética alternativa à glicose, poupando essa para os requerimentos do cérebro e das células sanguíneas e também reduzindo a utilização dos aminoácidos corporais como substratos para a gliconeogênese (ARNER, 2001).

O balanço entre as taxas de secreção hepática de triacilgliceróis e de captação extrahepática normalmente mantém constante a concentração de triacilgliceróis circulantes. Quando ocorre um influxo aumentado de ácidos graxos, o fígado responde aumentando a esterificação e oxidação. Entretanto, se houver limitação na taxa de oxidação de ácidos graxos e/ou de sua capacidade em secretar VLDL, a conseqüência é o aumento do armazenamento de triacilgliceróis dentro do hepatócito, condição denominada esteatose hepática.

1.3 Adipócitos e a secreção de adipocininas

Os adipócitos, que variam enormemente de tamanho (20- 200µm de diâmetro), estão embebidos em uma matriz de tecido conjuntivo e são adaptados a estocar e liberar energia.

Por constituírem depósitos localizados em diversas regiões do organismo envolvendo, ou mesmo se infiltrando em órgãos e estruturas internas, o tecido adiposo branco oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permite o adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e subcutâneo, e por ser um excelente isolante térmico, tem um papel importante na manutenção da temperatura corporal. Recentemente, além das funções mencionadas anteriormente, tem-se comprovado a habilidade do tecido adiposo em influenciar as atividades metabólicas de muitos outros tecidos, incluindo o músculo esquelético e fígado (MOHAMED-ALI et al., 2001) e também do sistema imune (RUDIN & BARZILAI, 2005).

O tecido adiposo participa ativamente da regulação do depósito de triacilgliceróis, através de uma rede endócrina, parácrina e autócrina de sinais. Em uma visão mais moderna inclui-se uma diversidade de sinalizadores liberados pelo tecido adiposo como a leptina, fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL-6), e seus respectivos receptores solúveis, ácidos graxos livres e “Acylation Stimulating Protein” (ASP). O tecido adiposo também secreta reguladores importantes do metabolismo das lipoproteínas incluindo a lipase lipoprotéica, a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e a apolipoproteína E (MOHAMED- ALI et al., 2001).

A leptina foi descoberta em 1994 e desde então esse hormônio tem assumido um papel importante no controle da homeostase energética. A leptina é um hormônio protéico constituído de 167 aminoácidos cuja secreção se dá pelo tecido adiposo em proporção à massa desse tecido. A leptina possui um importante papel na regulação do metabolismo energético, apresentando duas ações: a primeira, em neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico, onde estimula a expressão de neuropeptídeos ligados aos mecanismos de inibição da ingestão alimentar (pro-ópio-melanocortina, POMC e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina,

CART) e ao aumento do gasto energético total, via ativação simpática. A segunda, em outros neurônios do mesmo núcleo, inibindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e proteína *agouti* (AgRP), envolvidos na regulação do mecanismo de estimulação da ingestão alimentar e na redução do gasto energético. Seus efeitos também se estendem ao metabolismo lipídico, com a ativação da adenilato ciclase e aumento da oxidação lipídica no músculo esquelético e no fígado, suprimindo a atividade da esterol-CoA dessaturase e reduzindo a síntese de TAG a partir de ácidos graxos monoinsaturados (PITTAS et al., 2004).

Além de exercer um efeito importante lipostático (índice de depósitos lipídicos do organismo), a leptina também exerce outros efeitos na reprodução, na angiogênese, na resposta imune, no controle da pressão sanguínea e na osteogênese (FRUHBECK et al., 2001).

1.4 Esteatose hepática induzida pelo ácido orótico

Conforme descrito anteriormente, o conteúdo hepático de TAG é determinado pelo balanço entre a captação, oxidação e síntese de ácidos graxos, e sua esterificação posterior e secreção como triacilgliceróis. O aumento ou diminuição na atividade de alguma dessas vias tem um impacto no acúmulo de gordura no fígado (KERSTEN, 2002).

É relatado na literatura que certos agentes de importância terapêutica, tais como ácido valpróico, tetraciclinas, corticosteroides e alguns anti-inflamatórios não esteroidais são hepatotóxicos e produzem acúmulo hepático de lipídios ou esteatose, a qual segue uma distribuição microvesicular (FROMENTY et al., 1990; BREEN, et al., 1975, SCHENKER & HEIMBERG, 1975). Também foi verificado que o conteúdo hepático de gordura pode ser alterado por certas condições dietéticas. Por exemplo, observa-se um desenvolvimento severo de fígado gorduroso em ratos alimentados com dieta rica em lipídios (KUSUNOKI et al., 2002), ou uma dieta deficiente em colina ou metionina (ROGERS & NEWBERG, 1973), ou

ainda uma dieta contendo ácido orótico (NOVIKOFF & EDELSTEIN, 1977). O ácido orótico (AO) (Fig. 4), um intermediário da biosíntese das pirimidinas, está presente em baixas concentrações em células nucleadas e em muitos fluidos biológicos. A ingestão desse componente na dieta humana ocorre principalmente através do leite bovino (80mg/L) (MORIFUJI & AOYAMA, 2002). **Postula-se ainda que o ácido orótico seja a vitamina B13 que tem funções relacionadas ao metabolismo da vitamina B12 e efeitos anti-idade** (Reference:)

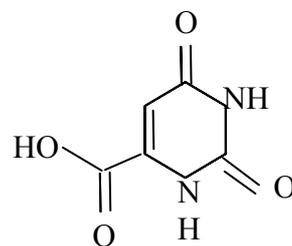


Figura 4. Estrutura química do ácido orótico.

Um dos mecanismos envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado induzido pela administração de dieta contendo ácido orótico é a redução na síntese ou transporte das VLDL do fígado para o sangue (MORIFUJI & AOYAMA, 2002; WINDMUELLER, 1964; LAWRENCE et al., 1971). A síntese das VLDL é um processo complexo que ocorre no aparelho secretor do hepatócito e envolve a transferência de TAG para a apolipoproteína B (ApoB), processo esse que requer uma proteína de transferência de triacilgliceróis microsomal (MTP). Tem sido sugerido que a inibição da síntese da VLDL pelo ácido orótico parece ser conseqüente à falha na conjugação das partículas de ApoB com as moléculas de triacilgliceróis e não à deficiência de precursores (HEBBACHI et al, 1997).

Trabalhos mais recentes também demonstram que a administração de ácido orótico causa aumento na síntese de TAG pelo fígado (CHA et al, 1998) além de alteração

mitocondrial, a qual se reflete na menor oxidação de ácidos graxos pelo hepatócito (PICARD et al., 2002).

Além de seus efeitos sobre o acúmulo hepático de triacilgliceróis, estudos recentes do nosso laboratório (BOTION, 2007 - manuscrito submetido) mostram que a administração de ácido orótico a 1 % na dieta determina atividade maior da enzima lípase lipoprotéica do tecido adiposo e menor concentração plasmática de TAG e colesterol total.

1.5 Receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos (PPARs) e o metabolismo intermediário

O controle do metabolismo lipídico e lipoprotéico, assim como a homeostase glicêmica, é um processo complexo que envolve a expressão coordenada de numerosos genes, cuja expressão pode ser regulada através de fatores de transcrição ativados por ligantes, denominados, receptores nucleares (CHINETTI et al., 2001).

Os receptores nucleares governam numerosos processos de importância biológica e sua atividade pode ser influenciada por moléculas lipofílicas sinalizadoras. Os receptores nucleares reconhecem e se ligam a sítios específicos do DNA, chamados elementos responsivos (RE), e uma vez ligados ao elemento responsivo, o complexo pode ativar ou inibir a expressão de genes alvos (STAELS et al., 1998). Estas características dos receptores nucleares os tornam alvos primários para o desenvolvimento de drogas (KERSTEN, 2002).

Os receptores nucleares ativados pelos proliferadores dos peroxissomos são membros da superfamília de receptores nucleares. Estes receptores foram inicialmente identificados em 1990 quando uma das isoformas (PPAR α) foi mostrada ser receptora de xenobióticos capazes de induzir a proliferação de peroxissomos em fígado de roedores. Subseqüentemente dois outros genes de PPARs, PPAR β e PPAR γ 1/ γ 2, foram descritos (CHINETTI, et al., 2001).

O PPAR α é expresso, principalmente, em tecidos que apresentam altas taxas de oxidação de ácidos graxos, como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marrom, coração e rim (KERSTEN, 2002). O PPAR β é expresso ubiquitariamente, ao passo que o PPAR γ é expresso principalmente nos tecidos adiposos branco e marrom (KLIEWER et al., 1994; BRAISSANT et al., 1996). O PPAR γ apresenta duas isoformas: PPAR γ 1 e PPAR γ 2 (KERSTEN, 2002), sendo que a expressão do PPAR γ 2 é limitada exclusivamente ao tecido adiposo onde tem papel essencial na adipogênese (KERSTEN, 2002). Por outro lado, o PPAR γ 1 é expresso em níveis relativamente baixos em muitos tecidos, incluindo fígado, entretanto a função desta isoforma em tecidos que não os adiposos não está bem estabelecida. Estudos sugerem que altos níveis de expressão do PPAR γ 1 em fígado de camundongos podem levar ao desenvolvimento de esteatose hepática adipogênica (YU et al., 2003).

Uma rede ampla de componentes tem sido identificada como ligantes dos PPARs. Os ácidos graxos e seus derivados são ligantes naturais desses receptores nucleares (DESVERGNE, 1997), sendo que o PPAR α é ativado por eicosanoides naturais derivados do ácido araquidônico, através da via bioquímica das lipoxigenases, bem como por fosfolipídios oxidados de lipoproteínas (WOLFRUM et al., 2001). Os fibratos, uma classe de drogas hipolipidêmicas, são ligantes sintéticos potentes para o PPAR α (STAEELS et al., 1998) entre os quais o bezafibrato, clofibrato e o gemfibrozil, são utilizados rotineiramente na clínica. Recentemente foi desenvolvido o fenofibrato (Fig.5) o qual apresentou uma ação hipolipidêmica bastante efetiva (ANONYMOUS, 2001).

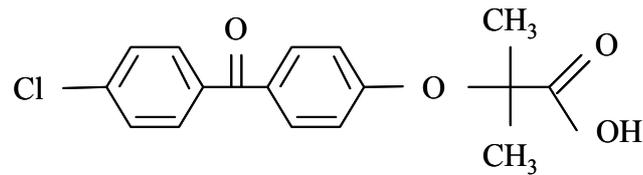


Figura 5. Estrutura química do fenofibrato.

Os agonistas do PPAR α exercem efeitos benéficos no tratamento de dislipidemias, os quais parecem ser conseqüentes ao aumento do catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (MALMENDIER et al., 1989; DESVERGNE & WAHLI, 1999), à redução da secreção de VLDL pelo fígado (LAMB et al., 1993) e ao aumento da produção das apolipoproteínas que compõem a HDL (VU-DAC et al., 1995; BERTHOU et al., 1996). Além disso, tem sido relatado que os ativadores do PPAR α também melhoram a sensibilidade à insulina em animais diabéticos (WANG et al., 2001), em animais alimentados com dieta rica em gorduras (YE et al., 2001), em pacientes com diabetes tipo II (TENENBAUM et al., 2005) e resistentes à insulina (IDZIOR-WALUS et al., 2000).

O PPAR α é expresso em concentrações relativamente altas no fígado e desempenha um papel central na expressão das enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos, e é essencial para a resposta pleiotrópica induzida no fígado por proliferadores dos peroxissomos (BRAISSANT et al., 1996). Vários estudos demonstram que no fígado, o PPAR α regula diretamente a expressão dos genes envolvidos na captação dos ácidos graxos, como os genes da proteína transportadora de ácidos graxos (FATP) e da acil-CoA oxidase, enzima envolvida na β -oxidação peroxissomal (LEE et al., 2003; REDDY, 2001).

Um número limitado de estudos tem examinado o efeito dos fibratos na esteatose, e os mecanismos envolvidos na sua ação ainda não estão bem estabelecidos. Uma vez que o PPAR α é um ativador potente da oxidação dos ácidos graxos no hepatócito, sua ativação

através de ligantes sintéticos pode ser uma possível opção para o tratamento da esteatose e complicações associadas (REDDY, 2001).

Estudo anterior do nosso laboratório (FERREIRA, 2007 - manuscrito submetido) demonstrou que a ativação do PPAR α pelo fenofibrato impediu o acúmulo de gordura no fígado dos animais tratados com ácido orótico. Sugere-se que o efeito inibitório do fenofibrato sobre o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pelo AO possa ser devido ao aumento da oxidação de AGL no fígado, e ainda, devido a uma diminuição da produção hepática de TAG.

Com base no exposto, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se o fenofibrato é capaz de reverter as alterações metabólicas induzidas no fígado e tecido adiposo pela administração de ácido orótico e investigar os possíveis mecanismos envolvidos com esses efeitos.

1.6 PPAR α e adiposidade

Um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento da obesidade é o desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético, o que resulta em um balanço energético positivo associado ao ganho de peso corporal.

Existem várias evidências a respeito de um possível papel do PPAR α sobre o metabolismo do tecido adiposo, dentre elas um efeito regulatório sobre o armazenamento de gordura nesse tecido. Alguns estudos mostram essa correlação:

- Guerre Millo e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação do PPAR α através de um ligante sintético causou redução da adiposidade em ratos e camundongos alimentados com dieta rica em lipídios.

- Koh, et al. (2003) e Lee et al. (2002) mostraram que o tratamento com fenofibrato causou redução da adiposidade em um modelo experimental que apresenta obesidade e diabetes (*OLETF rats*).
- Jeong e colaboradores (2004) e Srivastava e col. (2006) demonstraram que o fenofibrato é capaz de prevenir a obesidade e a hipertrigliceridemia em camundongos com deficiência do receptor da LDL.
- Fu, et al. (2005) mostraram que o ácido graxo oleoiletanolamida também é capaz de regular a ingestão alimentar e o ganho de peso de animais obesos (ratos Zucker) através da ativação do PPAR α .

O efeito do PPAR α sobre a adiposidade tem sido atribuído à sua capacidade em aumentar o catabolismo de lipídios no fígado e assim, de forma indireta, causar redução do depósito de gordura do tecido adiposo. Além disso, sugere-se a participação do PPAR α na modulação do conteúdo de TAG no tecido adiposo, entretanto, pouco se sabe sobre as ações dos fibratos no metabolismo de adipócitos.

Desta forma, outro objetivo do presente estudo foi avaliar as vias de mobilização e de armazenamento de gorduras no tecido adiposo de animais tratados com fenofibrato e, além disso, verificar se a participação do fenofibrato sobre a mobilização de lipídios no tecido adiposo ocorre via ativação direta do PPAR α nesse sítio.

2.0 OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto acima, os objetivos principais foram verificar se animais tratados com fenofibrato apresentam redução da adiposidade e se positivo, identificar as vias metabólicas envolvidas nesse processo. Outro objetivo principal foi investigar as conseqüências da esteatose hepática induzida pelo ácido orótico sobre o metabolismo de ratos alimentados, bem como os efeitos do tratamento com fenofibrato sobre esses parâmetros.

2.1 Objetivos específicos

Verificar se o tratamento com fenofibrato e/ou ácido orótico influenciam:

- 1) a deposição de lipídios no tecido adiposo dos animais.
- 2) a perfil metabólico plasmático dos animais
- 3) as vias metabólicas responsáveis pelo armazenamento de gordura nos adipócitos dos animais.
- 4) o conteúdo de gordura hepática dos animais.
- 5) a sensibilidade insulínica do sistema de transporte da glicose no tecido adiposo epididimal.
- 6) a oxidação de lipídios no fígado e tecido adiposo dos animais.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando cerca de 200g, provenientes do centro de bioterismo da UFMG (CEBIO) os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- (C) alimentados com dieta controle;
- (C+F) alimentado com dieta controle contendo fenofibrato ($100 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de PC.dia⁻¹) (Sigma);
- (AO) alimentados com dieta controle contendo ácido orótico (1%) (Aldrich);
- (AO+F) alimentados com dieta controle contendo ácido orótico (1 %) e fenofibrato ($100 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de PC.dia⁻¹).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e em ambiente com controle de luz (14 horas luz, das 6 às 20h) e temperatura ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e à dieta determinada.

A dieta controle possuía 66% de carboidrato, 20% de proteínas, 8% de lipídios e concentração de vitaminas e minerais adequadas. A composição básica da dieta controle (KETTELHUT, FOSS & MIGLIORINI, 1980) é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição básica da dieta controle (%).

	Dieta controle
Proteína	20
Lipídio	8
Carboidrato	66
Minerais	5
Vitaminas	1

Para melhorar a textura da dieta adicionou-se água na proporção de 12 mL de água para cada 100gr de ração.

À dieta controle foi adicionado 1% de ácido orótico (AO) (*Aldrich*) ou 100 mg⁻¹. Kg⁻¹ de PC.dia⁻¹ de fenofibrato (C+F) (*Sigma*) ou ambas as drogas (AO+F), as quais foram administradas por um período de 9 dias.

A ingestão alimentar foi cuidadosamente monitorada diariamente durante todo o período experimental através da mensuração da diferença entre a ração ofertada ao animal e o que sobrou da mesma.

No décimo dia, entre 8 e 10hs da manhã, procedeu-se o sacrifício dos animais (decapitação) e os tecidos adiposos e hepáticos foram removidos, pesados e utilizados imediatamente ou congelados em nitrogênio líquido e conservados em freezer -80°C até o momento do uso. O sangue foi coletado em tubos heparinizados ou contendo citrato (quando apropriado) para obtenção de plasma, e armazenado à -20°C para posterior dosagem de glicose, insulina, ácidos graxos livres, triacilglicerol, colesterol total, glicerol e leptina.

3.2 Metodologia

3.2.1 Determinação do conteúdo hepático de lipídios

A extração do conteúdo de gorduras do fígado foi realizada segundo o método de Folch & cols (1957). Porções de fígado foram removidas, pesadas, homogeneizadas em clorofórmio:metanol 2:1 e deixadas extrair por cerca de 16h. Após filtrar, adicionou-se solução fisiológica (0,9%) na proporção de 2 ml para 10 ml de filtrado. Após separação das fases, uma alíquota da fase clorofórmica foi transferida para tubos de cintilação previamente pesados. Os tubos foram expostos por cinco dias, aproximadamente, a temperatura ambiente para a evaporação do clorofórmio e separação dos lipídios das amostras. Os lipídios totais foram quantificados por gravimetria.

3.2.2 Análise morfologia dos hepatócitos

3.2.2.1 Processamento do material para a microscopia de luz (ML)

Fragmentos de fígado com aproximadamente 1mm de espessura foram removidos e processados conforme o padrão de técnicas histológicas. Assim, os fragmentos foram imersos em solução fixadora de glutaraldeído a 4,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se às etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95° e 100°) e a inclusão em glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments). Foram obtidas secções histológicas com 3µm de espessura e os mesmos foram corados pela técnica do azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan (Merck), e analisadas ao microscópio de luz Olympus BX-40.

3.2.3 Isolamento dos adipócitos

Após o sacrifício dos animais o tecido adiposo epididimal foi removido, picado e incubado com colagenase por 45 minutos a 37°C, sob agitação contínua, conforme descrito por Rodbell (1964). Ao término do período de incubação, as células foram filtradas através de uma tela de nylon, lavadas três vezes com tampão HEPES (pH 7,4) contendo 1% de albumina bovina livre de ácidos graxos. Os adipócitos isolados foram ressuspensos na proporção de 1g de tecido para 20 mL de tampão .

3.2.4 Captação de glicose

Após isolamento, as células adiposas foram lavadas com tampão HEPES e incubadas por 45 min em tubos contendo ou não insulina (50ng/mL). Um tubo contendo fluoretina foi adicionado ao teste, pois essa substância inibe a captação da 2-deoxi-[³H]glicose e permite a quantificação aproximada do *background*. A captação da 2-deoxi-[³H]glicose foi utilizada para determinar a sensibilidade insulínica sobre o processo de captação de glicose (BOTION & GREEN, 1999). Para isso foi adicionado aos tubos 50µL de 2-deoxi-[³H]glicose

(0,2 μ Ci) e as células incubadas por mais 3 min. A 2-deoxi-[3 H]glicose é transportada para dentro da célula através dos mesmos transportadores da glicose (HOM & GOODNER, 1984; KRAEGER et al., 1985). O transporte da glicose foi interrompido por transferência de 300 μ L da mistura de reação que foram acrescentados a um tubo de microcentrífuga contendo 70-80 μ L de silicone. Imediatamente, os tubos foram centrifugados por 60 segundos. Como o silicone tem densidade intermediária entre as células e o meio de incubação, formam-se três camadas após a centrifugação. O tubo foi cortado na fase intermediária (silicone), a camada de células removida e transferida para um frasco de cintilação contendo tolueno-PPO-POPOP-Triton para a contagem da radioatividade da 2-deoxi-[3 H]glicose-6-fosfato. O cálculo do índice de captação de glicose *in vitro* foi feito considerando-se a radioatividade da 2-deoxi-[3 H]glicose nas células e a concentração desse composto no meio de incubação.

3.2.5 Análise semi-quantitativa do transportador de glicose (GLUT-4) no tecido adiposo por Western Blots

Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em tampão de lise contendo inibidores de proteases e posteriormente centrifugados (2500 rpm, 20 min, 4°C) para remoção do infranadante. As proteínas contidas no infranadante foram quantificadas através do método de Bradford (1976).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). 30 μ g de proteína das amostras foram aquecidas a 98°C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. Na lateral do gel foi aplicado o padrão de peso molecular (20 – 200 kDa), sabendo-se que o GLUT-4 possui um peso molecular de, aproximadamente, 54kDa. A eletroforese foi realizada numa cuba de acrílico, contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, SDS 0,1%), sob a voltagem de 100 Volts, por 2 horas. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente (tampão: Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20%) para uma membrana de

nitrocelulose, sob voltagem de 100 Volts, por 1,5h. Em seguida as membranas foram bloqueadas para as ligações não específicas com tampão contendo leite desnatado a 5% em TBS-T 1x por 1 hora. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para GLUT-4 (Invitrogen) por 3h a 37°C sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário (anti-rabbit) por 1 hora seguido de lavagem das membranas. Por último, foi realizada a revelação quimioluminescente utilizando ECL *plus* (Amersham). Após a identificação das bandas referentes a proteína GLUT-4, foi feito, na mesma membrana, a identificação das bandas referentes a β -actina, que foi utilizada como controle endógeno. Para isso, foi feito o “stripping” da membrana que consiste na retirada dos anticorpos da superfície da mesma e a incubação por 1h com anticorpo primário para a proteína β -actina. As membranas foram então lavadas com TBS-T 1x e incubadas com anticorpo secundário (anti-mice) por 1h e após, lavadas novamente. Posteriormente, foi realizada a revelação quimioluminescente utilizando ECL *plus* (Amersham).

As bandas imuno-reativas foram quantificadas por densitometria no programa Image J quant, da National Institute of Health, USA. Os resultados foram expressos a partir da relação GLUT-4/ β -actina em unidades de densidade relativas.

3.2.6 Medida da atividade da lipase lipoprotéica

A lipase lipoprotéica (LPL) é uma glicoproteína, cujas características funcionais mais importantes são: possuir um pH ótimo de ação alcalino (8,0 – 8,5), ser inibida por NaCl 1M e requerer um cofator específico para manifestar sua atividade, a apolipoproteína C-II. O ensaio da atividade enzimática da LPL baseia-se no método de Nilsson-Ehle & Schotz (1976) e fundamenta-se na reação:



Os ácidos graxos liberados (^3H - oleato) foram separados pela utilização de um sistema de partição líquido-líquido e uma alíquota dos AGL situados na fase superior polar, é removida para a determinação da radioatividade correspondente. O índice de hidrólise é diretamente proporcional à atividade da enzima.

Para a medida da atividade da LPL, fragmentos do tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em tampão Tris-HCL (pH 8,3) contendo detergentes, centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos e a camada intermediária, abaixo da camada gordurosa, foi utilizada para a medida da atividade enzimática.

A emulsão-substrato foi preparada com trioleína fria e $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ trioleato e estabilizada com lecitina. Os lipídios foram sonicados com glicerol a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Esta emulsão é estável por cerca 2 meses no escuro.

No dia do experimento foi preparada a mistura de reação, contendo 2 partes de tampão LPL (Tris 0,2M, pH 8,3; contendo 6 % de albumina bovina livre de ácidos graxos e cloreto de sódio 0,15M), 2 partes de emulsão-substrato e 1 parte de soro de rato em jejum por 24 horas como fonte de Apo-CII. A mistura de reação foi agitada em vortex e 100 μL adicionados em todos os tubos. A reação iniciou-se pela adição de 10 μL do homogenato que foi então incubados sob agitação por 45 minutos a 37°C . Ao final do período de incubação adicionou-se inicialmente 3,25 mL da mistura de extração clorofórmio-heptana-metanol, 1,25:1,1:1,41 (BELFRAGE & VAUGHAN, 1969) e em seguida 1,05 ml de tampão carbonato-borato 0,1M pH 10,5, sob agitação em vortex. Os tubos de ensaio foram centrifugados à temperatura ambiente por 10 minutos e uma alíquota de 1,0 mL da fase aquosa superior foi colocada em 4 ml de coquetel de cintilação (tolueno-triton-PPO-POPOP) e a radioatividade quantificada por espectroscopia de cintilação líquida (Beckman LS 7600).

3.2.7 Lipogênese *in vitro*

A atividade lipogênica do tecido adiposo foi quantificada utilizando a água tritiada como marcador radioisótopo. A água tritiada é o marcador radioisótopo de preferência para o estudo da lipogênese. O trítio é incorporado durante o processo de síntese de ácidos graxos em ligações estáveis C-H por meio da troca do ^3H com nucleotídeos de pirimidina reduzidos (NADPH), formados na via das pentoses ou pela enzima málica.

Fragmentos de tecido adiposo epididimal (200mg) foram incubados por 2 horas em tampão contendo água tritiada $^3\text{H}_2\text{O}$ (150 μCi). A extração dos lipídios do tecido adiposo foi feita segundo o método de Folch e colaboradores (1957). Os tecidos foram homogeneizados em uma mistura de clorofórmio-metanol 2:1. Alíquotas da fase inferior clorofórmica contendo os lipídios totais foram utilizadas para a medida da radioatividade incorporada em ácidos graxos totais através de espectroscopia de cintilação líquida (Beckman LS 7600).

A velocidade de síntese de ácidos graxos *in vitro* no tecido adiposo epididimal foi calculada segundo Windmuller e Spaeth, 1966. A fórmula é a seguinte:

$$\mu\text{mol de AG}/2\text{h} = \frac{\text{dpm de } ^3\text{H incorporados em AG no TA} \times 10^9 \times 1}{\text{dpm de } ^3\text{H /átomo-g de H no meio} \times 13,3 \times t2-t1}$$

3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRTR) – quantificação absoluta

3.2.8.1 Extração do RNA Total

O isolamento do RNA total foi feito através do método de Chomczynski & Sacchi (1987) com algumas modificações. Os fragmentos de fígado e tecido adiposo foram homogeneizados em solução de desnaturação (solução D – Apêndice 1). A seguir, foram adicionados sequencialmente ao homogenato 50 μL de acetato de sódio 2M pH 5,2; 0,5 mL de fenol (água-saturado) e 0,5 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1, v/v). Misturou-se

totalmente por inversão após a adição de cada reagente e a suspensão final foi homogenizada vigorosamente por 10 segundos e resfriada em gelo por 15 minutos. O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm/4°C. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para um novo tubo e acrescentou-se 1 mL de isopropanol a 100%. A mistura foi armazenada a -20°C/1 hora. Nova precipitação foi realizada a 14.000 rpm/20 min/4°C. O sobrenadante foi vertido e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 300 µl de solução D e precipitado com adição de 300 µl de isopropanol a -20°C/1 hora. Após 10 minutos de centrifugação a 4°C (14.000 rpm), verteu-se o sobrenadante e o *botão* de RNA foi lavado em 1 mL de etanol a 75% e novamente centrifugado. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente, ressuspensionado em 80 µl de água DEPC e incubado a 55°C/10 minutos, para melhor dissolução do RNA. As concentrações do RNA total foram determinadas pela leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm (OD₂₆₀) em espectrofotômetro *GeneQuant*. Resumidamente, alíquotas do RNA total foram diluídas em água DEPC estéril filtrada a 0,22 µm (SF) para quantificação em cubeta de quartzo específica. As leituras nos comprimentos de ondas de 260 nm para ácido nucléico e 280 nm para contaminantes protéicos são apresentadas no apêndice 1 (tabela 1) bem como sua relação, demonstrando uma razão maior do que 1,8, isto é, a qualidade do RNA obtido foi segundo as exigências vigentes para a biologia molecular. Os resultados das concentrações do RNA total determinados e as composições das soluções citadas acima também são apresentados no apêndice 1.

3.2.8.2 Eletroforese em Gel de Agarose

Após a quantificação do RNA total, alíquotas de 2 µg de cada amostra foram aplicadas em gel de agarose a 1,2%, para eletroforese em tampão TBE (1x) por 1h a 100 volts. O ácido ribonucléico de amostras selecionadas foram corados em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), as bandas visualizadas em transiluminador UV e fotodocumentadas em aparelho *Núcleo Vision* (Núcleo Tech). As frações ribossomais 28S, 18S e 5S, apresentaram-se íntegras

e evidentes em todas as amostras de RNA total e o perfil eletroforético não apresentou qualquer sinal de degradação do RNA (Apêndice 1, figura1).

3.2.8.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para RT-PCR e PCR em tempo real

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes alvos para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRTR) foram selecionados através da análise das seqüências de mRNAs depositadas no genbank acessadas através do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information-(NCBI). Os amplicons alvos foram selecionados e analisados através da ferramenta *PrimerQuest*, disponível no IDT SciTools (*Integrated DNA technologies*)¹. Resumidamente, a partir da análise de homologia entre as seqüências dos mRNAs do PPAR α , Acil CoA oxidase (ACO), Carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) e β -actina, obteve-se as respectivas regiões-alvos para a confecção dos pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Dessa forma, foram escolhidos os seguintes iniciadores: **PPAR α** : FOR- 5'- taccactatggagtcacgcatgt-3', REV- 5'- ttgcagcttcgatcacacttgctg; **ACO**- FOR-5'- atctctgtggttgcgtggagtca 3', REV- 5'- tctggatgcttctctccaaggt-3'; **CPT1**- FOR- 5'- acgtgagtgactggtgggaagaat-3', REV-5'- tctccatggcgtagtagttgctgt-3'; **β -actina**- FOR-5'-catgaagatcaagatcattgctcct-3', REV- 5'- ctgcttgcgatccacatctg-3'. Os amplicons alvos para PCRTR foram de 98, 90, 84 e 109 pb para PPAR α , ACO, CPT-1 e β - actina, respectivamente (Apêndice 2).

3.2.8.4 Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada segundo protocolo previamente descrito por Martins e cols. (1995) com pequenas alterações. Resumidamente, 2 μ g de RNA total (30 μ l) foram utilizados para a síntese do DNA complementar (cDNA). Em cada reação

adicionaram-se ao RNA das amostras: 4 μ l (10 pmol/ μ l) de oligo dT₍₁₈₎; 4 μ l (40pmol cada) dos iniciadores reversos dos genes analisados; 10 μ l de tampão da reação; 4 μ l (10 mM/ μ l) de dNTP mix; 0,2 μ l (40U) de enzima transcriptase reversa (RT; M-MLV 200U/ μ l - INVITROGEN) e 18 μ l de H₂O mili-Q SF (q.s.p. 50 μ l). A transcrição reversa foi realizada a 40°C/60 min e o cDNA posteriormente armazenado à -20°C.

3.2.8.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

Como protocolo inicial para verificar a qualidade dos *primers* selecionados para PPAR α , ACO, CPT-1 e β -actina, utilizou-se o PCR convencional (SAIKI et al., 1985) com algumas modificações. Resumidamente, pools de 4 amostras de cDNAs provenientes da transcrição reversa dos diferentes tratamentos C, C+F, AO e AO+F, foram submetidos à PCR convencional para amplificação de cada fragmento alvo com os pares de primers específicos (PPAR α FOR/PPAR α REV; ACOFOR/ACOREV; CPT-1FOR/CPT-1REV e β -actFOR/ β -actREV). Sumariamente, cada reação de 25 μ l continha: 16,3 μ l de água mili-Q SF; 2,5 μ l de tampão PCR 10x; 2 μ l de dNTP mix (200 μ M cada dNTP); 1 μ l de MgCl₂ a 25 mM; 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (Laboratório Phoneutria) e 3 μ l da mistura: pool de cDNA (1 μ l) e primers (10 pmoles cada). A PCR foi realizada em termociclador *MJ Research Minicycler* com o seguinte programa: [1] 95°C/5 min.; 52°C/2 min. e 72°C/2 min.; [2] 05 ciclos de 94°C/1 min.; 56°C/1 min. e 72°C/1 min.; [3] 40 ciclos de 93°C/ 1 min.; 56°C/ 1 min. e 72°C/1 min.; [4] extensão final de 72°C/4 min. Os amplicons específicos foram confirmados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pelo nitrato de prata, segundo o método descrito no item 3.2.7.6 a seguir.

3.2.8.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata

Para a eletroforese dos amplicons obtidos pela PCR convencional utilizou-se o método descrito por Grimberg e cols., (1989) e aperfeiçoado por Carvalho e col., (2000). O gel de

¹ <http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>.

poliacrilamida foi preparado utilizando-se: 4 mL de solução estoque de acrilamida 30%; 3 mL de TBE 5x; 110 µl de persulfato de amônio 10%; 10 µl de TEMED e q.s.p. 15 mL de H₂O destilada. Para a eletroforese foram utilizados 4 µl de cada amostra dos produtos da PCR. Os tamanhos dos fragmentos da PCR foram determinados e confirmados pela comparação com o marcador *50 pb DNA ladder* (utilizados 100 ng). Após fixação por 10 minutos em etanol (10%), ácido acético (0,5%) e H₂O destilada (q.s.p.) o gel foi impregnado com AgNO₃ (0,1%) por 10 minutos e lavado em H₂O destilada por 3 a 5 minutos. A visualização dos fragmentos de PCR foi feita por revelação em solução contendo NaOH (3,6%), formol (0,3%) e q.s.p. 100 mL de H₂O destilada por 10 minutos (Apêndice 3).

3.2.8.7 Purificação dos fragmentos do PPAR α , ACO, CPT-1 e β -actina

Com o objetivo de se obter um fragmento de PCR puro e específico do PPAR α , ACO, CPT-1 e β -actina para quantificação e utilização como padrão no PCR em Tempo Real e construção das curvas de calibração, foi utilizado o seguinte protocolo: 40 µl do fragmento obtido no PCR convencional foram gel-purificados em agarose a 1,2%. A eletroforese foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 min de corrida em tampão TBE 1x, como descrito anteriormente (as bandas são apresentadas no apêndice 4). Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, as bandas dos fragmentos específicos de 98 pb do PPAR α , 90pb do ACO, 84pb da CPT-1 e 109 pb para a β - actina foram cortadas do gel, evitando-se excesso de agarose. As bandas foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml contendo um filtro de 0,45 µm, com 1 mL de tampão TBE 0,5x. Os fragmentos de agarose contendo os amplicons foram congelados a -20°C, fragmentados e submetidos à separação por centrifugação a 4°C/30min e posterior purificação por extração orgânica com fenol:clorofórmio; álcool isoamílico e precipitação com etanol. Os fragmentos de PCR dos diferentes genes foram ressuspensos em água SF e alíquotas analisadas em espectrofotômetro *GeneQuant* para quantificação dos fragmentos de DNA em OD₂₆₀. Após a

purificação foi feito um gel de poliacrilamida com 2 μ l (200 ng) de marcador 50 pb DNA *ladder* e 10 μ l do fragmento purificado para confirmação da integridade e pureza do fragmento. Essas amostras purificadas foram utilizadas na construção das curvas de calibração no PCRTR quantitativo.

3.2.8.8 PCR em tempo real e quantificação absoluta

Para a reação de PCR em Tempo Real e quantificação absoluta da expressão dos genes alvos estudados, foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Utilizou-se um protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de reação de 20 μ l. Resumidamente, a reação consistiu-se de: 6 μ l de água para PCR (SF); 10 μ l do mix *SYBR Green PCR*; 2 μ l de *primer* mix (1pmol de cada primer analisado – senso e anti-senso) e 2 μ l de cDNA da reação de transcrição reversa. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 60°C/1 min. Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, as curvas-padrões dos amplicons purificados de PPAR α , ACO, CPT-1 e β - actina (item 3.2.7.7), foram construídas a partir de diluições seriais de: 1ng, 10⁻¹ng, 10⁻³ ng, 10⁻⁵ ng e 10⁻⁷ng (Apêndice 5 – para melhor visualização das imagens acesse: www.dcc.ufla.br/~thiago/adaliene). Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em Tempo Real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* (Apêndice 5 – para melhor visualização das imagens acesse: www.dcc.ufla.br/~thiago/adaliene) e os fragmentos amplificados também foram posteriormente visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (Apêndice 6).

Para a análise da expressão do PPAR α no tecido adiposo não foi utilizado a curva padrão construída para esse gene alvo, portanto, a análise da expressão do gene foi semi-quantitativa (método delta delta CT) segundo o modelo matemático desenvolvido por Ptaffl, 2001. O valor de CT (*threshold cycle*) representa o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do PPAR α pelo CT da β -actina (Δ Ct);
- 2- média do Δ CT das amostras;
- 3- Δ CT de cada amostra – a média do Δ CT ($\Delta\Delta$ CT);
- 4- elevação negativa do $\Delta\Delta$ CT na base 2 = $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

3.2.9 Dosagens bioquímicas

As concentrações de glicose, triacilglicerol e colesterol total plasmáticos foram quantificadas através de “kit” enzimáticos (ANALISA, Lagoa Santa, MG). O glicerol plasmático foi quantificado através de um “kit” enzimático, gentilmente elaborado e cedido pelo Dr. Leonides (KATAL - Belo Horizonte, MG).

A concentração plasmática de insulina e leptina foram quantificadas pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial específico para insulina e leptina de rato, respectivamente (Linco Research, St Charles, MO - USA).

A concentração plasmática de ácidos graxos livres foi quantificada por método enzimático utilizando “kit” comercial da WAKO (Pure Chemical Industries, Japan).

3.2.10 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”. A análise dos resultados foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego – Califórnia, USA. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar, peso corporal e biometria dos tecidos

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que os animais tratados com fenofibrato, independentemente da presença de ácido orótico, apresentaram redução do ganho de peso corporal durante os 9 dias de tratamento em relação aos animais não tratados com a droga. Conforme pode ser observado, o efeito do fenofibrato sobre o ganho de peso corporal não é dependente da ingestão alimentar uma vez que, todos os animais apresentaram consumo diário equivalente de dieta, durante o período experimental (tabela 2). Além disso, pode ser observado nesses animais uma redução do peso dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e aumento do peso do fígado.

A dieta suplementada com ácido orótico não alterou o ganho de peso corporal dos animais e o peso dos depósitos adiposos entretanto, a suplementação de AO aumentou o peso do fígado em relação aos animais alimentados somente com dieta controle.

Tabela 2. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a ingestão alimentar por dia, peso corporal e de tecidos.

	C	C+F	AO	AO+F
Peso corporal final (g)	255 ± 8 (8)	221 ± 8* (8)	248 ± 5,74 (7)	212,1 ± 4,9 ⁺ (7)
Ganho de peso corporal (g/9 dias)	61 ± 7 (7)	38 ± 6 * (7)	56,5 ± 4,0 (7)	23,4 ± 5,2 ⁺ (7)
Ingestão Alimentar/dia/ 100g de PC(g)	9,1 ± 0,4 (6)	8,7 ± 0,5 (6)	8,9 ± 0,4 (6)	8,7 ± 0,1 (6)
Biometria (g/100g PC):				
- tecido adiposo epididimal	1,1 ± 0,05 (9)	0,74 ± 0,02* (8)	0,9 ± 0,03 (7)	0,6 ± 0,06 ⁺ (7)
- tecido adiposo retroperitoneal	0,67 ± 0,02 (9)	0,34 ± 0,06* (8)	0,54 ± 0,05 (7)	0,26 ± 0,04 ⁺ (7)
- fígado	5,02 ± 0,17 (9)	6,9 ± 0,3* (9)	6,2 ± 0,25* (7)	7,1 ± 0,2 ⁺ (7)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados.*p<0,05 vs C; ⁺ p<0,05 vs AO.

4.2 Parâmetros plasmáticos

Conforme pode ser observado na tabela 3, a concentração plasmática de glicose foi semelhante em todos os grupos estudados. Não houve alteração da concentração plasmática de insulina nos animais tratados com ácido orótico em relação ao grupo controle. O tratamento com fenofibrato reduziu em 35% (C+F) ($p=0,08$) e 53% (AO+F) ($p<0,05$) a concentração plasmática de insulina quando comparado aos respectivos grupos não tratados. Entretanto, a redução de 35% observada nos animais C+F não foi diferente estatisticamente.

A concentração plasmática de AGL apresentou-se elevada nos animais tratados com AO em relação aos controles ($p<0,05$), e o tratamento com fenofibrato não modificou esse parâmetro lipídico plasmático. Em relação ao glicerol plasmático, não foi observada variação na concentração desse metabólito nos diferentes tratamentos.

Nos animais do grupo AO a concentração plasmática de triacilgliceróis mostrou uma redução de 46% ($p<0,05$) quando comparada ao grupo C e o tratamento com fenofibrato reduziu em 60% (C+F) e 34% (AO+F) ($p<0,05$) a concentração plasmática desse lipídio quando comparado ao respectivo grupo não tratado. Da mesma forma, a adição de ácido orótico à dieta controle causou uma redução de 28% ($p<0,05$) na concentração plasmática de colesterol quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com fenofibrato reduziu em 32% ($p<0,05$) e 46% ($p<0,05$) a concentração deste lipídio em relação aos respectivos grupos não tratados, C e AO.

Em relação aos níveis plasmáticos de leptina observamos que os animais AO apresentaram redução da concentração desse hormônio quando comparado aos animais controles. Os animais tratados com fenofibrato apresentaram concentração menor de leptina plasmática quando comparada aos respectivos grupos não tratados, C e AO.

Tabela 3. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a glicemia, a concentração plasmática de insulina, ácidos graxos livres, glicerol, triacilglicerol, colesterol total e leptina.

Parâmetros Plasmáticos	C	C+F	AO	AO+F
Glicose (mmol/L)	7,5 ± 0,17 (6)	7,60 ± 0,21 (6)	7,80 ± 0,21 (6)	7,8 ± 0,32 (5)
Insulina (ng/mL)	2,2 ± 0,20 (5)	1,45 ± 0,33 (5)	2,00 ± 0,20 (4)	0,94 ± 0,20 ⁺ (6)
Ácidos Graxos Livres (mmol/L)	0,6 ± 0,10 (7)	0,54 ± 0,09 (8)	1,10 ± 0,14 *(7)	0,94 ± 0,15 (7)
Glicerol (mmol/L)	0,17 ± 0,01 (7)	0,11 ± 0,009 (8)	0,15 ± 0,01 (8)	0,13 ± 0,01 (6)
Triacilglicerol (mg/dL)	171 ± 19 (7)	70 ± 8,00* (5)	91 ± 5,00* (4)	60 ± 2,00 ⁺ (6)
Colesterol Total (mg/dL)	112 ± 8,10 (6)	76 ± 9,30 (5)*	80 ± 7,00* (8)	43 ± 2,9 ⁺ (4)
Leptina (ng/mL)	5,3 ± 0,67 (6)	2,65 ± 0,24* (6)	3,15 ± 0,32*(6)	1,26±0,12 ⁺ (7)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados. * p<0,05 vs C; ⁺ p<0,05 vs AO.

4.3 Correlação entre o peso do tecido adiposo epididimal e a leptina plasmática

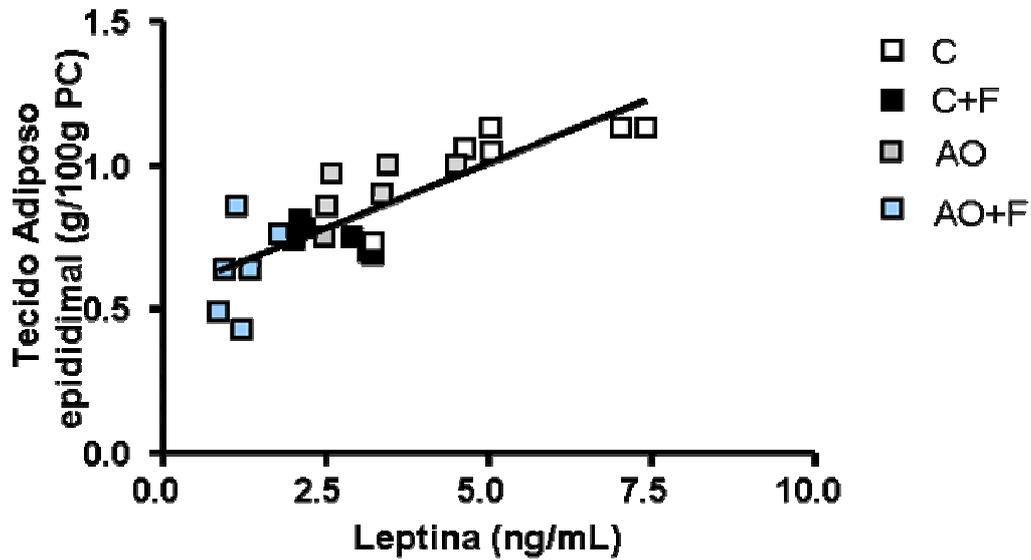


Figura 6. Correlação positiva entre a leptina plasmática e peso do tecido adiposo epididimal, $r=0,82$, $n=6$, $p<0,0001$, Intervalo de confiança= 0,62 a 0,92.

Conforme pode ser observado na figura 6, a concentração plasmática de leptina correlaciona-se positivamente com o peso do tecido adiposo epididimal, entretanto, essa correlação não é influenciada pelos tratamentos com fenofibrato ou ácido orótico.

4.4. Conteúdo hepático de lipídios totais

Na figura 7 pode ser observado que a adição de ácido orótico à dieta causou um aumento de 160% no conteúdo hepático de lipídios totais em relação aos animais controles ($49,0 \pm 4,8 \text{ mg/g C}$ vs $128,0 \pm 12,9 \text{ mg/g AO}$, $p < 0,05$). O tratamento com fenofibrato impediu o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pelo ácido orótico ($128,0 \pm 12,9 \text{ mg/g AO}$ vs $49 \pm 5,9 \text{ mg/g AO+F}$) e não alterou conteúdo hepático de lipídios dos animais que receberam a dieta controle ($49,0 \pm 4,8 \text{ mg/g C}$ vs $45,0 \pm 4,15 \text{ mg/g C+F}$) (figura 6).

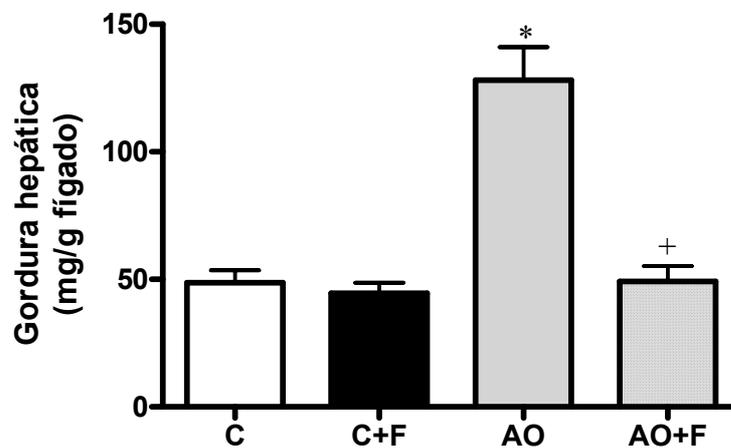


Figura 7. Efeito dos diferentes tratamentos sobre o conteúdo hepático de lipídios totais. As barras representam a média \pm erro padrão. $n=5-6$; * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs AO.

4.5. Análise histológica do fígado

As análises histológicas mostraram que os hepatócitos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos apresentavam características morfológicas diferentes daquelas observadas nos animais controles. Dentre essas, foram observadas diferenças quanto à disposição do núcleo e em especial ao conteúdo e o tipo de vesículas gordurosas. A figura 8 apresenta uma imagem panorâmica dos cortes histológicos (aumento de 200x).

A partir da análise dos fragmentos de fígados incluídos em metacrilato e corados com azul de toluidina observamos que os hepatócitos dos animais alimentados com dieta controle (figura 8A) apresentavam-se organizados em fileiras delimitadas por tecido conjuntivo contendo capilares sinusóides (S). Observamos também núcleos alongados típicos de células do conjuntivo (Cj). Os hepatócitos apresentaram-se com morfologia típica, citoplasma abundante, de aspecto vacuolar graças à presença de pequenas gotas lipídicas microvesiculares (Li) e núcleo em posição central no citoplasma (setas).

O citoplasma dos hepatócitos dos animais suplementados com ácido orótico (Fig. 8C) apresentou um aspecto vacuolar devido ao aumento no número e volume das gotas lipídicas que se apresentavam ora micro (Li) ora macrovesiculares (La). Os núcleos desses hepatócitos não raramente apresentavam-se deslocados para a periferia da célula (setas).

O tratamento com fenofibrato (figura 8B) causou pequenas alterações na morfologia dos hepatócitos quando comparado ao grupo controle. A análise morfológica mostra um número diminuído de gotas lipídicas (Li) e, conseqüentemente, o citosol com aspecto menos vacuolar e mais homogêneo e núcleos localizados centralmente nos hepatócitos (setas).

O citoplasma dos hepatócitos obtidos de animais suplementados com ácido orótico e fenofibrato (figura 8D) apresentou-se bastante homogêneo e com as gotas lipídicas (Li) menos numerosas e volumosas (microvesiculares) quando comparado ao grupo respectivo que não recebeu fenofibrato (AO). A imagem mostra que os núcleos não estavam deslocados para

a periferia da célula como ocorreu nos animais suplementados apenas com ácido orótico (setas).

PRANCHA 1

Figura 8A. Corte histológico de fígado do animal alimentado com dieta controle (C). Observam-se núcleos de hepatócitos (setas); capilares sinusóides (S); núcleos de células do tecido conjuntivo (Cj); gotas lipídicas microvesiculares (Li). Azul de toluidina, 200x.

Figura 8B. Corte histológico de fígado do animal alimentado com dieta controle adicionada de fenofibrato (C+F). Observam-se núcleos de hepatócitos (setas); capilares sinusóides (S); núcleos de células do tecido conjuntivo (Cj); gotas lipídicas microvesiculares (Li). Azul de toluidina, 200x.

Figura 8C. Corte histológico de fígado do animal alimentado com dieta contendo ácido orótico (AO). Observam-se núcleos de hepatócitos (setas); capilares sinusóides (S); gotas lipídicas microvesiculares (Li) e macrovesiculares (La). Azul de toluidina, 200x.

Figura 8D. Corte histológico de fígado do animal alimentado com dieta contendo ácido orótico e fenofibrato (AO+F). Observam-se núcleos de hepatócitos (setas); capilares sinusóides (S); núcleos de células do tecido conjuntivo (Cj); gotas lipídicas microvesiculares (Li). Azul de toluidina, 200x.

4.6 Captação de glicose por adipócitos do tecido adiposo epididimal

A captação basal (sem estímulo) de glicose por adipócitos isolados a partir do tecido adiposo epididimal pode ser observada na figura 9A. Os resultados mostram que a suplementação dietética com ácido orótico aumentou em 100% a captação basal de glicose por adipócitos quando comparado aos animais controles ($0,14 \pm 0,02 \text{ mmol/3min C}$ vs $0,28 \pm 0,02 \text{ mmol/3min AO}$, $p < 0,05$). Da mesma forma, o tratamento com fenofibrato aumentou em aproximadamente 100% a captação basal de glicose em relação aos animais controles ($0,14 \pm 0,02 \text{ mmol/3min C}$ vs $0,29 \pm 0,05 \text{ mmol/3min C+F}$, $p < 0,05$), entretanto, não alterou esse parâmetro nos animais AO+F ($0,28 \pm 0,02 \text{ mmol/3min AO}$ vs $0,24 \pm 0,03 \text{ mmol/3min AO+F}$, $p > 0,05$).

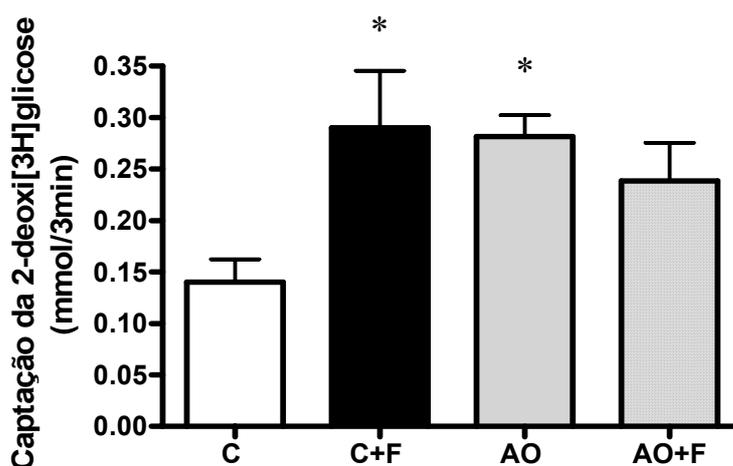


Figura 9A. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a captação basal (sem estímulo) de glicose por adipócitos. As barras representam a média \pm erro padrão, $n = 6-8$. * $p < 0,05$ vs C.

No que diz respeito à sensibilidade insulínica sobre o transporte de glicose por adipócitos, pode-se observar que esse hormônio, na concentração de 50 ng/mL , aumentou a captação de glicose em todos os grupos em relação ao estado basal (figura 9B).

A suplementação da dieta com ácido orótico produziu um aumento da captação de glicose em ambos os estados, basal e estimulado pela insulina, ($0,14 \pm 0,02 \text{ mmol/3min Cb}$ vs

0,28±0,02mmol/3min AOb, $p<0,05$; 0,69±0,11mmol/3min Ci vs 1,43±0,22mmol/3min AOi, $p<0,05$) em relação ao controle (figura 9B). O aumento promovido pela insulina na captação de glicose foi de 4,8 e 5,6 vezes em relação ao basal, nos animais controles e suplementados com ácido orótico, respectivamente. Observou-se ainda, que nos animais tratados com fenofibrato a captação de glicose tanto no estado basal (0,14±0,02mmol/3min Cb vs 0,29±0,05mmol/3min C+Fb, $p<0,05$) quanto no estimulado pela insulina foi maior em relação aos animais controles (0,69±0,11mmol/3min Ci vs 1,16±0,15mmol/3min C+Fi, $p<0,05$). É importante observar que a captação de glicose estimulada pela insulina foi de aproximadamente 4,5 vezes em relação ao basal tanto no grupo controle (C) quanto no tratado com fenofibrato (C+F).

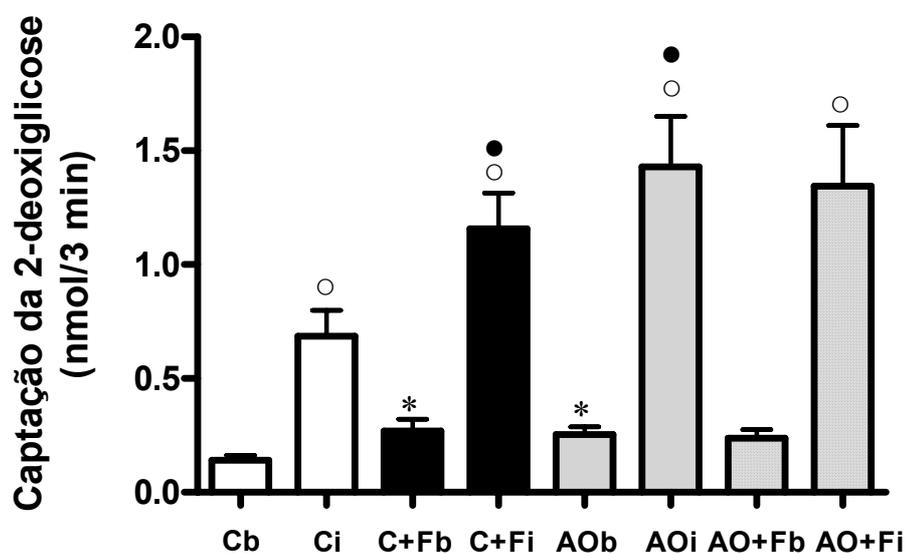


Figura 9B. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a captação de glicose basal e estimulada por insulina por adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal. As barras representam a média ± erro padrão, n = 6-8. **b**=basal, **i**= insulina; ^o $p<0,05$ b vs i; * $p<0,05$ vs Cb; [•] $p<0,05$ vs Ci.

O tratamento com fenofibrato em animais alimentados concomitantemente com ácido orótico não causou alterações na captação de glicose por adipócitos tanto no estado basal como no estimulado com insulina quando comparado aos animais tratados apenas com AO ($0,28 \pm 0,02 \text{ mmol/3min AOb}$ vs $0,24 \pm 0,03 \text{ mmol/3min AO+Fb}$, $p > 0,05$; $1,43 \pm 0,22 \text{ mmol/3min AOi}$ vs $1,35 \pm 0,26 \text{ mmol/3min AO+Fi}$, $p > 0,05$) (Fig. 9B).

4.7 Conteúdo da proteína GLUT-4 do tecido adiposo epididimal

A proteína GLUT-4 foi analisada através da técnica western blot em um tecido sensível à insulina, o tecido adiposo epididimal. A figura 10A mostra um autoradiograma de uma banda de 54KDa da proteína GLUT-4 e de 43KDa da proteína β -actina no controle e nos diferentes tratamentos. A figura 10B apresenta a análise semi-quantitativa do transportador de glicose. A dieta contendo ácido orótico aumentou em 32% a quantidade da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimal em relação ao grupo controle. O tratamento com fenofibrato não alterou a quantidade da proteína no tecido adiposo em nenhum dos grupos avaliados, C+F e AO+F, em relação aos seus respectivos controles.

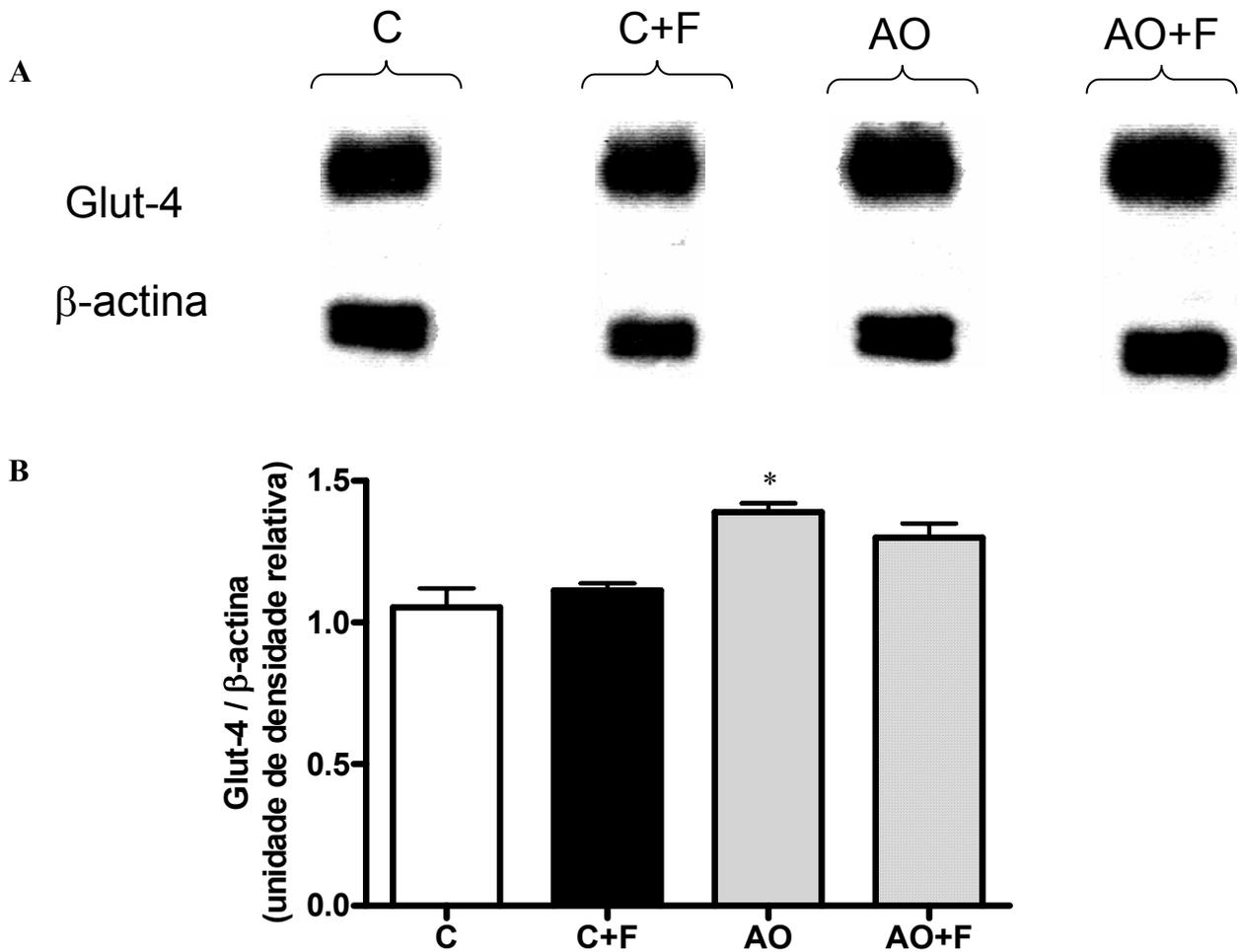


Figura 10. **A-** Autorradiograma representativo de western blot para a proteína GLUT-4 e a β -actina no tecido adiposo epididimal. **B-** Análise semi-quantitativa da proteína GLUT-4. Os resultados foram expressos, a partir da relação GLUT-4/ β -actina, em unidades de densidade relativa. As barras representam a média \pm erro padrão, $n = 4$, * $p < 0,05$ vs C.

4.8 Atividade da enzima lipase lipoprotéica

A hidrólise dos triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas circulantes é catalisada pela enzima lipase lipoprotéica do tecido adiposo e os ácidos graxos liberados são captados e armazenados nesse tecido. Os dados obtidos (figura 11) mostram que atividade da LPL do tecido adiposo epididimal no grupo AO aumentou em relação ao grupo controle ($1,64 \pm 0,11$ mU C vs $2,91 \pm 0,6$ mU AO, $p < 0,05$). O tratamento com fenofibrato reduziu a atividade da enzima em 50% (C+F) e 30% (AO+F) quando comparado aos respectivos grupos não tratados ($1,64 \pm 0,11$ mU C vs $0,67 \pm 0,12$ mU C+F, $p < 0,05$; $2,91 \pm 0,6$ mU AO vs $1,08 \pm 0,2$ mU AO+F, $p < 0,05$).

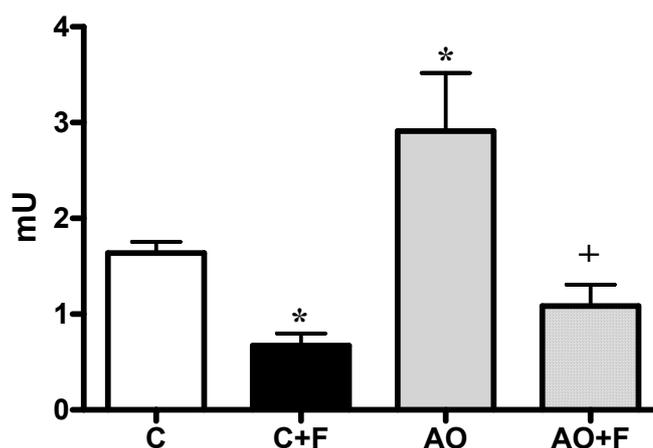


Figura 11. Atividade da enzima LPL (mU) no tecido adiposo epididimal de ratos submetidos aos diferentes tratamentos. As barras representam a média \pm erro padrão. $n = 4-6$. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs AO.

4.9 Lipogênese “*in vitro*” do tecido adiposo epididimal

A atividade lipogênica do tecido adiposo epididimal pode ser observada na figura 12. A dieta suplementada com ácido orótico não alterou a atividade lipogênica quando comparada aos animais controle ($17,09 \pm 1,6 \mu\text{molAG/gTA C}$ vs $16,6 \pm 1,6 \mu\text{molAG/gTA AO}$, $p > 0,05$). O tratamento com fenofibrato causou redução da lipogênese tanto em relação aos animais controles ($17,09 \pm 1,6 \mu\text{molAG/gTA C}$ vs $10,65 \pm 1,1 \mu\text{molAG/gTA C+F}$, $p < 0,05$) como em relação aos animais alimentados com ácido orótico ($16,6 \pm 1,6 \mu\text{molAG/gTA AO}$ vs $9,73 \pm 1,6 \mu\text{molAG/gTA AO+F}$, $p < 0,05$).

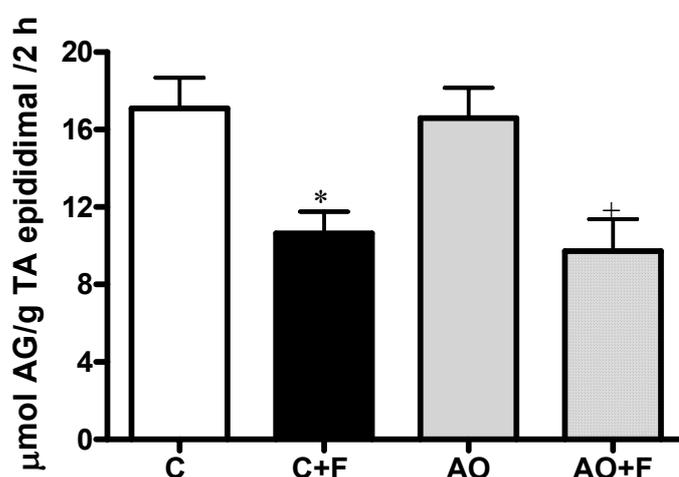


Figura 12. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a lipogênese basal do tecido adiposo (TA) epididimal “*in vitro*”. As barras representam a média \pm erro padrão, $n = 8-9$. * $p < 0,05$ vs C;

⁺ $p < 0,05$ vs AO.

4.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRTR)

Neste estudo, avaliou-se também a expressão do receptor nuclear ativado pelos proliferadores de peroxissomos alfa (PPAR α) no fígado e no tecido adiposo bem como a expressão de duas enzimas importantes envolvidas na β -oxidação peroxissomal e mitocondrial de ácidos graxos, a acil-Coa oxidase (ACO) e a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), respectivamente. Para a quantificação absoluta da expressão desses genes, os ensaios de PCRTR foram realizados utilizando-se *primers* de oligonucleotídeos específicos para os cDNAs que expressam o PPAR α , a ACO e a CPT-1 (ver Materiais e Métodos). Para normalização do PCRTR foi utilizada a β -actina como controle endógeno. Os dados quantitativos referentes à análise da expressão dos genes em estudo são apresentados em anexo (anexo 5) bem como as curvas de calibração para todos os amplicons quantificados (exceto para o PPAR α no tecido adiposo). Conforme mencionado no MATERIAIS E MÉTODOS, para a análise da expressão do PPAR α no tecido adiposo foi utilizado o método delta delta CT, portanto, a análise foi semi-quantitativa e os resultados são apresentados como unidades arbitrárias.

A figura 13 mostra a expressão hepática do mRNA para o PPAR α que apresentou uma redução de 80% nos animais tratados com AO em relação ao grupo controle. O tratamento com fenofibrato aumentou a expressão do PPAR α em 200% no grupo C+F e em 1000% no grupo AO+F em relação aos respectivos grupos não tratados.

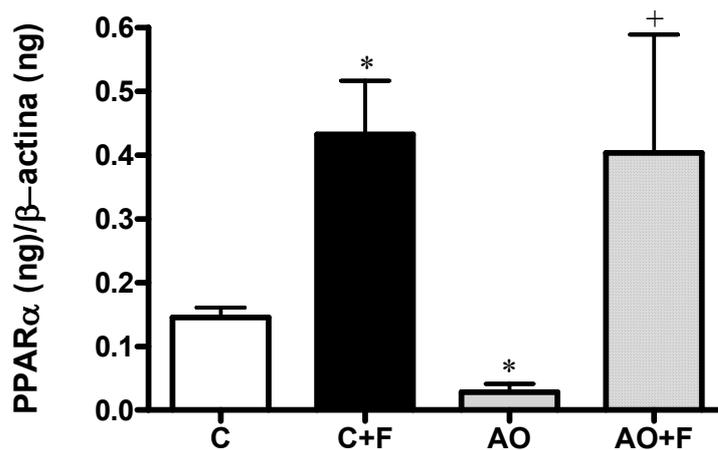


Figura 13. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática do PPAR α . As barras representam a média \pm erro padrão, n =3. *p<0,05 vs C; + p<0,05 vs AO.

A análise semi-quantitativa ou relativa da expressão do PPAR α no tecido adiposo é apresentada na figura 14. Observa-se que a expressão desse fator de transcrição não foi diferente entre os tratamentos estudados.

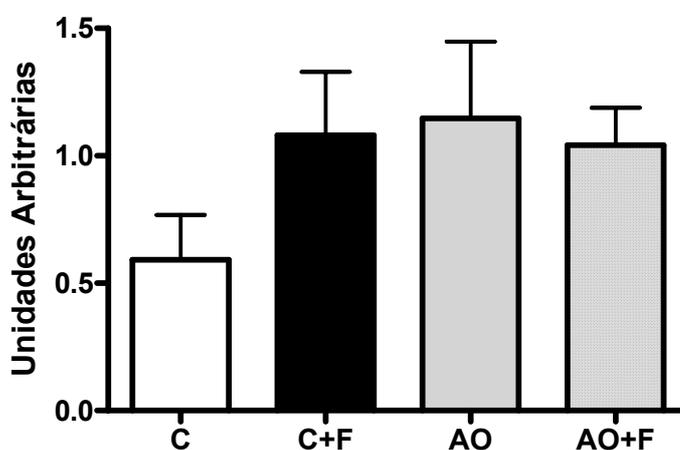


Figura 14. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão do PPAR α no tecido adiposo. As barras representam a média \pm erro padrão, n =3.

Uma vez que a transcrição da ACO é regulada pelo PPAR α , a expressão desse gene foi também avaliada. Conforme pode ser observado na figura 15, a dieta contendo AO causou redução de 68% na expressão hepática da ACO em relação ao grupo controle. O tratamento com fenofibrato aumentou em 170% e 300% a expressão da enzima ACO no grupo C+F e no grupo AO+F, respectivamente, quando comparada aos respectivos grupos não tratados. Da mesma forma, a expressão da ACO no tecido adiposo apresentou-se aumentada nos animais tratados com fenofibrato, tanto no grupo C+F quanto no grupo AO+F, em relação aos respectivos grupos não tratados, figura 16. A esteatose hepática induzida pelo ácido orótico não alterou a expressão da enzima ACO no tecido adiposo.

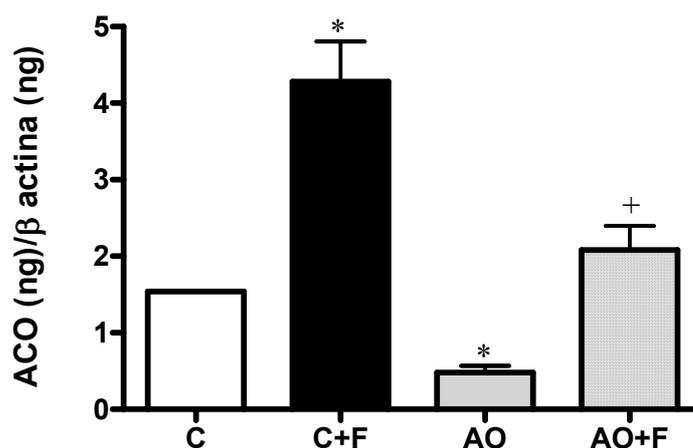


Figura 15. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática da ACO. As barras representam a média \pm erro padrão, n =3. *p<0,05 vs C; + p<0,05 vs AO.

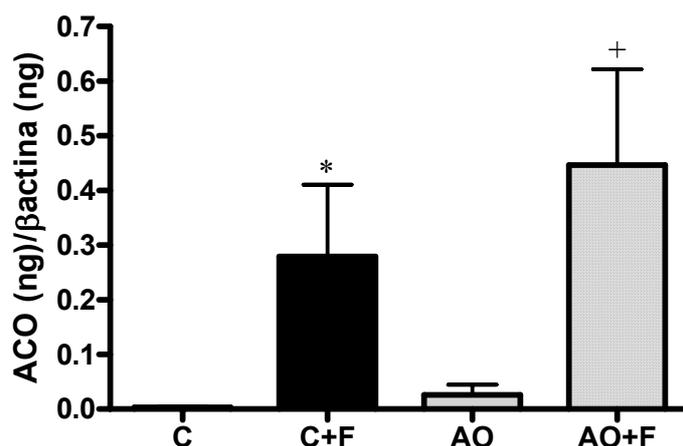


Figura 16. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão da ACO no tecido adiposo. As barras representam a média \pm erro padrão, $n=3$. * $p<0,05$ vs C; + $p<0,05$ vs AO.

Nesses resultados também pode ser observado que a expressão hepática da enzima ACO é maior no fígado quando comparada à expressão dessa no tecido adiposo.

A enzima mitocondrial CPT-1, envolvida na β -oxidação mitocondrial, também foi avaliada, entretanto, nenhuma diferença entre os tratamentos estudados foi encontrada no que se refere à expressão dessa enzima no fígado (Fig.17).

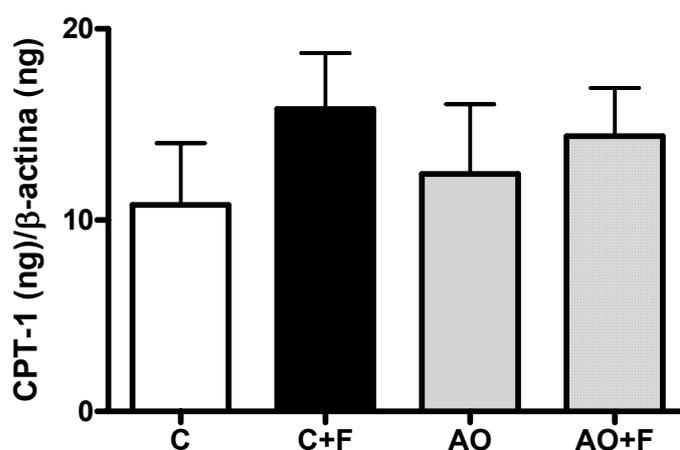


Figura 17. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão hepática da CPT-1. As barras representam a média \pm erro padrão, $n=3$.

Diferentemente do resultado obtido para a expressão da CPT-1 no fígado, no tecido adiposo a expressão dessa enzima variou de acordo com os tratamentos. Conforme pode ser observado na figura 18, a expressão da enzima CPT-1 apresentou-se aumentada nos animais tratados com fenofibrato em relação ao controle. A esteatose hepática induzida pelo AO, assim como o tratamento desses animais com fenofibrato (AO+F), não causaram variações na expressão da enzima CPT-1 no tecido adiposo.

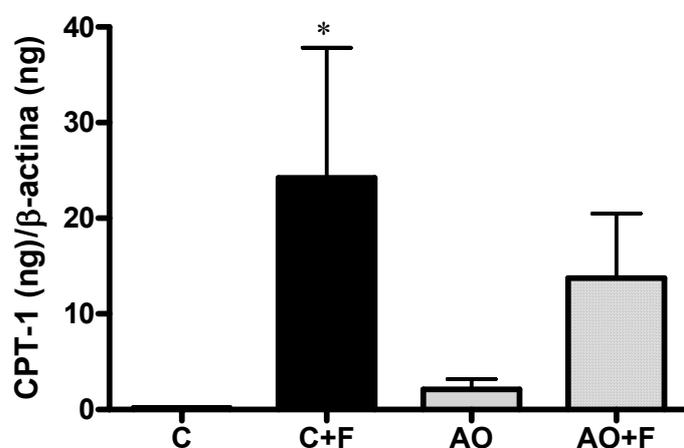


Figura 18. Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão da CPT-1 no tecido adiposo. As barras representam a média \pm erro padrão, n =3.

É importante observar que em relação aos animais controles, a expressão hepática da enzima CPT-1 apresentou-se maior que a expressão dessa enzima no tecido adiposo.

A tabela 4 mostra, resumidamente, os resultados referentes à expressão dos genes analisados nos diferentes tratamentos.

Tabela 4. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a expressão dos genes para PPAR α , ACO e CPT-1 no fígado e tecido adiposo.

		C+F	AO	AO+F
PPARα	Fígado	↑	↓	↑
	Tec. adiposo	=	=	=
ACO	Fígado	↑	↓	↑
	Tec. adiposo	↑	=	↑
CPT-1	Fígado	=	=	=
	Tec. adiposo	↑	=	↑

Os dados são apresentados como aumento (↑), redução (↓) ou não alteração (=) da expressão dos genes estudados em relação aos respectivos animais controles: C+F em relação ao controle; AO em relação ao controle; AO+F em relação ao AO.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Efeito do fenofibrato sobre o metabolismo de animais alimentados

O controle do acúmulo lipídico nos adipócitos é determinado primariamente pela atividade de três vias metabólicas: a lipogênese, que consiste na síntese *de novo* de ácidos graxos e sua posterior re-esterificação à triacilgliceróis, a captação dos ácidos graxos derivados dos triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas circulantes através da atividade da enzima LPL e a hidrólise dos lipídios armazenados no tecido adiposo pela enzima HSL. A lipogênese e a atividade da LPL são estimuladas pela insulina, ao passo que a lipólise é inibida por esse hormônio e estimulada pelas catecolaminas.

Nosso estudo avaliou as alterações metabólicas no tecido adiposo induzidas pela administração de fenofibrato. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com fenofibrato reduziu acentuadamente o ganho de peso corporal assim como o peso dos depósitos dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal de animais alimentados com dieta balanceada, rica em carboidratos de fácil digestão. Este efeito, não foi devido à alteração na ingestão alimentar nem relacionado às variações na concentração plasmática de leptina. A adipocinina leptina apresenta várias funções, dentre elas o controle da homeostase energética corporal e sua síntese e secreção estão relacionadas primariamente ao tamanho do depósito do tecido adiposo, embora variações circadianas também influenciem a secreção dessa adipocinina (LICINIO et al., 1998). A concentração plasmática de leptina apresentou-se menor no grupo tratado com fenofibrato, e foi observada uma correlação positiva entre a concentração plasmática de leptina e o peso do tecido adiposo. Ou seja, quanto maior o depósito de TAG no tecido adiposo maior a leptinemia indicando que este hormônio não influenciou a redução da massa adiposa induzida pelo tratamento com fenofibrato. Essas observações indicam que o fenofibrato não exerce um efeito regulatório específico sobre a

produção de leptina. Guerre-Millo e colaboradores (2000) também demonstraram que a redução da adiposidade induzida pela ativação do PPAR α não é devida aos fatores supracitados.

Conforme já referido na **INTRODUÇÃO**, os fibratos constituem uma classe de drogas usadas no tratamento das hiperlipidemias. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o fenofibrato reduziu as concentrações de TAG e de colesterol plasmáticas de ratos no estado alimentado. Embora o fenofibrato não tenha alterado a concentração plasmática de AGL, a droga aumentou a expressão de genes relacionados à oxidação destes lipídios, tanto ao nível peroxissomal hepático quanto mitocondrial e peroxissomal do tecido adiposo, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a ação hipolipidêmica dessa droga. Dentre os vários efeitos da ativação do PPAR α , verifica-se um aumento da captação e oxidação dos ácidos graxos, limitando conseqüentemente, a oferta para a produção de triacilgliceróis e VLDL pelo fígado (STAELS et al., 1998). A concentração intracelular de ácidos graxos é parcialmente controlada pela captação celular, a qual é mediada por diferentes transportadores, como as proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) e as translocases de ácidos graxos (FAT/CD36). O tratamento com os fibratos induz a expressão de RNA mensageiro da FATP e FAT em fígado de roedores, favorecendo assim, a captação hepática dos AGL (MOTOJIMA et al., 1998; MARTIN et al., 1997). O fluxo intracelular de ácidos graxos é regulado por uma enzima chave, a acil coenzima A sintetase (ACS), que catalisa a esterificação dos ácidos graxos, favorecendo sua retenção celular. Por modular a expressão da ACS, o PPAR α polariza o fluxo de ácidos graxos (SCHOONJANS et al., 1995). Além disso, o PPAR α induz a captação e o catabolismo dos ácidos graxos na mitocôndria através da ativação da enzima carnitina palmitoil trasferase I e II muscular e hepática (LOUET et al., 2001), e de outras enzimas mitocondriais que oxidam os ácidos graxos (AOYAMA et al., 1998). Em roedores, mas não em humanos, os ativadores do PPAR α induzem a expressão de

várias enzimas da β oxidação peroxissomal (STAEELS et al., 1998; LAWRENCE et al., 2001) uma delas também identificada no nosso estudo, a Acil-CoA oxidase.

Além do efeito hipolipidêmico clássico, tem sido reportado que o tratamento com fenofibrato reduz o ganho de peso em modelos de animais, com diabetes (KOH et al., 2003), com obesidade e resistência insulínica como os ratos *fa/fa Zucker* (MANCINI et al., 2001; FU et al., 2005) bem como em camundongos tratados com dietas ricas em gordura (GUERRE-MILLO et al., 2000). Este efeito é atribuído ao aumento do catabolismo de lipídios no fígado, principalmente através da indução de enzimas chaves envolvidas na oxidação hepática de lipídios (MANCINI et al., 2001; GUERRE-MILLO, et al., 2000), conforme já referido. Trabalhos recentes indicam que em determinadas circunstâncias, o PPAR α é expresso no tecido adiposo onde o mesmo é capaz de aumentar a expressão de genes envolvidos na oxidação local de ácidos graxos (LI, 2005; WANG et al., 1999). No nosso trabalho a expressão do PPAR α no tecido adiposo de animais tratados com fenofibrato apresentou-se igual à dos animais controles entretanto, a expressão das enzimas ACO e CPT-1 apresentaram-se elevadas nesses animais. O aumento da oxidação de lipídios no tecido adiposo pode ser um dos mecanismos responsáveis pela redução da adiposidade induzida pelo tratamento com os ativadores do PPAR α .

Sabe-se que além da oxidação de lipídios, outras vias metabólicas são igualmente importantes para determinar o acúmulo de lipídios no tecido adiposo. No presente estudo, o tratamento com fenofibrato reduziu a lipogênese do tecido adiposo epididimal, um dos mecanismos que disponibiliza acil-graxo-CoA para a síntese de triacilglicerol e conseqüente acúmulo lipídico no tecido adiposo. Embora esses dados não forneçam informações a respeito dos mecanismos celulares envolvidos na ação do fenofibrato, eles mostram que a redução do acúmulo lipídico no tecido adiposo pode estar parcialmente relacionada à inibição da lipogênese nesse tecido (FERREIRA et al., 2006).

O resultado apresentado referente à atividade da enzima LPL mostra que o tratamento com fenofibrato também reduziu a atividade desta no tecido adiposo epididimal (FERREIRA et al, 2006). A hidrólise intravascular dos TAG contidos nas lipoproteínas circulantes é controlada pela atividade da LPL, e tem sido relatado que a ativação do PPAR α controla a atividade da enzima por induzir sua expressão no fígado e inibir a expressão hepática da ApoC-III, um inibidor da atividade catalítica da enzima (BOCHER et al, 2002). Esses efeitos sobre a hidrólise e o catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis contribuem assim, para a redução dos níveis plasmáticos desses lipídios. Estudos recentes têm demonstrado que o tratamento com fenofibrato induz a expressão da LPL em tecidos com altas taxas de oxidação de ácidos graxos como fígado, músculo e coração (BOCHER et al, 2002). Existem poucos e controversos estudos reportando a influência do fenofibrato sobre a atividade da LPL do tecido adiposo. SCHOONJANS et al (1996) relataram que o tratamento com fenofibrato induz a expressão da LPL exclusivamente no fígado, ao passo que STAELS & AUWERX (1992) relataram que a expressão do gene da enzima no tecido adiposo permanece inalterada após tratamento com fenofibrato, e os trabalhos de RIZVI et al. (1997) mostraram que a ativação do PPAR α através do fenofibrato causou aumento da atividade da LPL no fígado, tecido adiposo e intestino. Nossos resultados mostram que, inversamente ao que é relatado sobre a atividade da LPL no fígado, a atividade dessa enzima encontra-se diminuída no tecido adiposo dos animais tratados com fenofibrato. Sugere-se que a redução da atividade da LPL no tecido adiposo possa ser devida a um efeito secundário relacionado à redução da concentração dos TAG plasmáticos induzida por esse tratamento ou ainda devida a uma influência direta do aumento na atividade do PPAR α no tecido adiposo. Cabe ressaltar que o aumento na atividade do PPAR α no tecido adiposo foi evidenciada através da maior expressão das enzimas oxidativas ACO e CPT-1.

Os resultados nos permitem propor que o efeito redutor do fenofibrato sobre a massa adiposa é, pelo menos em parte, conseqüente à diminuição da captação dos TAG circulantes devido à redução da atividade da enzima LPL no tecido adiposo (FERREIRA et al, 2006).

Os resultados anteriores do nosso laboratório (FERREIRA et al, 2006) mostram que o tratamento com fenofibrato aumenta a resposta lipolítica (aumento da liberação de glicerol) dos adipócitos isolados dos animais tratados com essa droga quando comparado aos animais controles. O trabalho de GUZMÁN et al (2004) relaciona a atividade lipolítica aumentada de adipócitos obtidos do tecido adiposo epididimal de ratos tratados com oleoiletanolamida (um ácido graxo mono-insaturado) ao aumento da expressão do PPAR α no tecido adiposo uma vez que camundongos *knockout* para o gene PPAR α não apresentam este aumento da lipólise estimulada por esse AG. Também foi demonstrado que uma maior atividade lipolítica no tecido adiposo pode, em determinadas circunstâncias, estar relacionada ao aumento na expressão do PPAR α nesse tecido. Por exemplo, os trabalhos do grupo de Wang (1999) mostram que o aumento na lipólise induzida pela hiperleptinemia é acompanhado pelo aumento da expressão do PPAR α no tecido adiposo. A atividade lipolítica aumentada dos animais tratados com fenofibrato, evidenciada por nosso grupo, não foi acompanhada pelo aumento da expressão do PPAR α , entretanto, é possível que a ativação deste fator de transcrição tenha sido suficiente para estimular a lipólise. O mecanismo pelo qual a lipólise é estimulada pelos agonistas do PPAR α ainda necessita ser esclarecido.

Além dos efeitos no metabolismo induzidos pelo fenofibrato responsáveis pela redução da adiposidade descritos anteriormente pode-se incluir o aumento do consumo de oxigênio e uma maior atividade da UCP-2 hepática como fatores que contribuem para a diminuição da massa adiposa observada nesse tratamento (SRIVASTAVA et al., 2006).

plasmáticos, a glicemia, a insulinemia e o glicerol dos animais tratados com fenofibrato apresentaram-se semelhantes ao dos animais controles.

O trabalho de Patsouris e colaboradores 2004, demonstrou que o PPAR α diminui a concentração de glicerol plasmático em camundongos e em humanos devido a um aumento da expressão de genes envolvidos na gliconeogênese hepática a partir do glicerol, incluindo a gliceroquinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, e aquaporinas 3 e 9. Esses resultados foram obtidos em animais em jejum de 24 horas, período esse onde a síntese de glicose no fígado é um processo importante para a manutenção da glicemia. No nosso estudo, os animais estavam alimentados e a ativação do PPAR α para a manutenção da glicemia não é um processo importante nesta condição alimentar, ao contrário do observado por Patsouris e col. (2004) no estado de jejum, onde essa ativação é crucial para evitar a hipoglicemia.

Conforme já referido na **INTRODUÇÃO**, é relatado na literatura que os ativadores do PPAR α melhoram a sensibilidade à insulina em animais diabéticos (WANG et al., 2001), obesos (TSUCHIDA et al., 2005), em animais alimentados com dieta rica em gorduras (YE et al., 2001), em pacientes com diabetes tipo II (YE et al., 2001, WYSOCKI et al., 2004), bem como em animais resistentes à insulina (IDZIOR-WALUS et al., 2000; WYSOCKI et al., 2004).

Alguns mecanismos são sugeridos para explicar os efeitos anti-resistência à insulina dos ativadores dos PPAR α :

- os ativadores do PPAR α aumentam o catabolismo dos ácidos graxos no fígado, o que resulta em diminuição sistêmica e local da concentração de lipídios (LEE et al., 2002).

- os ativadores do PPAR α diminuem o conteúdo de triacilglicerol no músculo esquelético, cujo acúmulo nesse tecido está relacionado com a resistência à insulina (CHALKLEEY, 1998).

- os ativadores do PPAR α regulam a produção de adipocitocinas, como a interleucina 6 (IL-6) e o TNF α , as quais estão associadas à resistência à ação da insulina (STAELS et al., 1998; MADEJ et al., 1998; SRIVASTAVA et al., 2006). Além disso, aumentam a expressão de receptores de adiponectina (AdipoR1 e R2) (TSUCHIDA et al., 2005) e da visfatina (adipocina com capacidade de modular a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos) no tecido adiposo (CHOI et al., 2005).

Conforme pode ser observado nos resultados, apesar do tratamento com fenofibrato não alterar as concentrações de insulina e de glicose plasmáticas em relação aos animais controles, a captação de glicose por adipócitos isolados dos animais tratados apresentou-se maior tanto no estado basal quanto no estimulado com insulina (50ng/mL). É importante relatar que a captação de glicose estimulada pela insulina foi de 4,5 vezes, aproximadamente, em relação ao basal, tanto nos animais controles como nos tratados com fenofibrato. O aumento na captação de glicose por adipócitos induzido pelo tratamento com fenofibrato não foi devido ao aumento no conteúdo da proteína GLUT-4 (transportador de glicose sensível à insulina) no tecido adiposo conforme evidenciado no presente trabalho.

O trabalho de Knauf e colaboradores (2006) demonstrou que camundongos *knockout* para o PPAR α apresentam aumento na expressão do GLUT-4 no tecido adiposo, com conseqüente aumento da utilização de glicose, o que contribui para o desequilíbrio na concentração de glicose durante o jejum e também para o aumento da massa adiposa nesses animais. Desta forma, sugere-se que o aumento na captação de glicose por adipócitos de animais tratados com fenofibrato possa ser devido ao aumento da concentração de GLUT-1, proteína de transporte constitutiva capaz de captar a glicose independente do estímulo com insulina. Além disso, o efeito hipolipidêmico do fenofibrato pode ter contribuído indiretamente para a melhora na captação de glicose por adipócitos.

Com base no exposto pode-se acrescentar aos diversos efeitos da ativação do PPAR α sobre a melhora da resistência à insulina, o aumento da captação basal de glicose por adipócitos, não associado ao conteúdo da proteína GLUT-4 no tecido adiposo.

É bem estabelecido que o aumento na captação de glicose por adipócitos pode contribuir para o acúmulo de gordura no tecido adiposo. Neste trabalho, o aumento na captação de glicose não foi acompanhado pelo aumento na adiposidade provavelmente devido a outras vias metabólicas ativadas pelo tratamento com fenofibrato já relatadas anteriormente como o aumento local na oxidação de AG, o aumento na lipólise e a redução na lipogênese e na captação de AGL pelo tecido adiposo.

5.2 Efeito da esteatose hepática e do tratamento com fenofibrato sobre o metabolismo.

O acúmulo excessivo de lipídios no fígado ou esteatose é uma desordem metabólica comum, encontrada tanto em humanos quanto em animais. Nosso estudo avaliou as alterações do metabolismo no tecido adiposo associadas à redução da secreção hepática de TAG, induzida pela administração de ácido orótico, e o efeito da ativação do PPAR α nessas alterações.

No presente estudo, demonstrou-se que a suplementação dietética com ácido orótico por um curto período de tempo (9 dias) causa um acúmulo acentuado de gordura no fígado como reportado previamente por outros autores (STANDERFER & HANDLER, 1955; WINDMUELLER & SPAETH, 1966). A esteatose microvesicular apresentou-se evidente nos animais tratados com AO, e conforme já mencionado na INTRODUÇÃO, essa forma de injúria hepática está intimamente associada à hepatotoxicidade.

Embora a esteatose hepática induzida pela administração dietética de AO seja atribuída à inibição da síntese e secreção de partículas de VLDL (WINDMUELLER & SPAETH, 1966; HEBBACHI et al., 1997; HAMILTON et al., 1986; HAY et al., 1988) a ocorrência de alterações na oxidação de ácidos graxos hepáticos através da β -oxidação não pode ser excluída. Conforme mostrado nos resultados, a expressão hepática do mRNA do PPAR α (fator de transcrição importante na regulação da oxidação de lipídios) e da acil-CoA oxidase (enzima chave da β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos) foram reduzidas ao passo que a expressão da enzima CPT-1 não foi alterada. Esses resultados indicam que além da possível redução da secreção de VLDL associada a uma menor oxidação peroxissomal hepática de AGL poderia estar contribuindo para o desenvolvimento da esteatose induzida pelo AO (FERREIRA, 2007). Vários estudos atribuem a esteatose hepática não alcoólica a alterações na função dos peroxissomos e do metabolismo de AGL no fígado (EVERETT et

al., 2000; AOYAMA et al., 1998; FAN et al., 1996; LEONE et al., 1999; COSTET et al., 1998). Em condições normais a oxidação peroxissomal contribui apenas com uma pequena fração da oxidação de AG em relação à oxidação mitocondrial (KUNAU et al., 1995). Entretanto, os trabalhos de Yeon e colaboradores (2004) e Fane et. al (1996) demonstraram que a redução da oxidação peroxissomal pode ser um fator relevante no desenvolvimento da esteatose hepática, o que é consistente com os resultados obtidos no presente trabalho.

A redução da expressão do mRNA da enzima ACO observada no grupo AO, pode ser decorrente da menor expressão do mRNA para o PPAR α . Tem sido reportado que a redução na expressão do receptor nuclear PPAR α está associada ao desenvolvimento de esteatose hepática uma vez que o mesmo é importante na modulação da expressão de genes relacionados à oxidação lipídica (COSTET et al, 1998). Da mesma forma, uma menor expressão do gene ACO também tem sido descrito como um fator importante no desenvolvimento de esteatose hepática microvesicular em camundongos (FAN et al, 1996).

Foi observado que o tratamento com o fenofibrato impediu o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pelo AO, e esse efeito pode ser atribuído à indução dos genes hepáticos envolvidos na oxidação de AGL. Esse efeito é provavelmente mediado pelo PPAR α , principalmente através da indução da expressão da enzima alvo ACO envolvida no metabolismo de lipídios. Embora os compartimentos mitocondriais e peroxissomais contribuam para a oxidação dos AG, nossos dados não apontam a mitocôndria como um sítio importante para a oxidação de lipídios induzida pelo tratamento com fenofibrato. Estas ações anti-esteatóticas do fenofibrato foram observadas por outros autores, em camundongos Shionogi mice (HARANO, 2006), camundongos alimentados com dieta deficiente em colina (IP et al., 2003) e com dieta rica em gorduras (MANCINI et al., 2001).

Nossos resultados também mostram que existe relação entre o acúmulo de TAG no fígado e alterações no metabolismo periférico. Além disto, é possível sugerir que além do

efeito anti-esteatótico, a ativação do PPAR α pelo fenofibrato desempenha um papel regulatório sobre as vias metabólicas que minimizam o estoque de gordura no tecido adiposo (FERREIRA et al., 2006).

Os resultados mostram que a administração de ácido orótico a 1% na dieta não tem influência sobre o peso corporal, o peso dos depósitos de tecidos adiposos (epididimal e retroperitoneal) e a ingestão alimentar, entretanto, esse tratamento determina um aumento no peso do fígado quando comparado aos controles. O aumento da massa hepática nos animais tratados apenas com AO é devido ao acúmulo de gordura no fígado, resultante, pelo menos em parte, da incapacidade desse órgão em secretar as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (WINDMUELLER, 1964; LAWRENCE et al., 1971) e de apresentar uma menor oxidação de AG. Nossos dados corroboram o trabalho de Su e colaboradores (1999) que também mostrou que apesar do ácido orótico não alterar o ganho de peso corporal, a sua administração por 21 dias determinou aumento da massa hepática.

O tratamento concomitante com AO e fenofibrato (AO+F) reduziu o ganho de peso corporal e o peso dos tecidos adiposos, porém foi observado um aumento do peso do fígado nos animais AO+F em relação aos animais que foram tratados apenas com AO. O aumento no peso do fígado dos animais tratados com fenofibrato parece ser conseqüente à proliferação de peroxissomos, efeito característico do tratamento com ativadores do PPAR α , já observado também por outros autores (YE et al., 2003; NAGAI et al., 2002).

Conforme mostrado nos resultados, a suplementação dietética com AO reduziu a concentração plasmática de TAG e colesterol total ao passo que a concentração de AGL apresentou-se elevada em relação aos animais controles. A redução da secreção de VLDL induzida pelo AO pode ter contribuído para a redução da concentração plasmática de TAG e colesterol nos animais AO. Entretanto, o aumento da concentração plasmática de AGL pode ser conseqüente a uma menor oxidação peroxissomal hepática desse lipídio evidenciado

através da menor expressão da enzima ACO nesse tecido e adicionalmente devido a menor oxidação muscular de AGL. Além disso, resultado anterior do nosso laboratório mostrou que a atividade lipolítica do tecido adiposo é semelhante entre os animais tratados com AO e os controles (FERREIRA, 2007). Portanto, o aumento dos AGL plasmáticos nos animais AO pode ser consequente a uma menor oxidação hepática e, possivelmente, muscular desses lipídios e não devido à alterações na liberação de AGL pelo tecido adiposo (lipólise).

Na análise dos parâmetros plasmáticos (animais alimentados), observamos que a dieta contendo AO não alterou a glicemia, a insulinemia e o glicerol. No que se refere aos animais tratados com fenofibrato, foram observadas reduções da insulinemia e da leptinemia quando comparado aos animais AO. Entretanto, observou-se uma correlação positiva entre a concentração de leptina e a massa de tecido adiposo, de forma semelhante ao evidenciado em animais controles tratados com fenofibrato. Essas observações indicam que o fenofibrato parece não exercer efeito regulatório específico sobre a produção de leptina nos animais com esteatose hepática induzida pelo AO.

Estudos recentes têm demonstrado uma estreita associação entre a concentração de triacilgliceróis hepático e muscular e a resistência à insulina nesses tecidos (BODEN, 2001; BODEN et al., 2001; KIM et al., 2001; MOLLER, 2001). No músculo, o acúmulo de lipídios prejudica a oxidação de glicose ao passo que no fígado este acúmulo induz a gliconeogênese com o conseqüente aumento da produção hepática de glicose. Estes efeitos em conjunto favorecem o aumento da glicemia característica dos estados de resistência à insulina (MORRAL, 2003). Estudos realizados em pacientes com lipodistrofia, os quais apresentam esteatose hepática e severa resistência insulínica, mostram um aumento na taxa de renovação de glicerol, refletindo desta forma, um aumento na taxa lipolítica. Considerando que esses pacientes possuem redução da gordura subcutânea e visceral, esses dados sugerem a ocorrência de uma hidrólise intra-hepática significativa dos triacilgliceróis nesses indivíduos

(MIYASAKI et al., 2002). Desta forma, o acúmulo intracelular de metabólitos derivados dos ácidos graxos tais como acil graxo CoA, leva a ativação da proteína quinase θ , resultando em ativação da cascata de serina/treonina, aumento da fosforilação de serina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), que interfere com a fosforilação da tirosina, resultando em redução da ativação da fosfatidilinositol-3-quinase e conseqüentemente uma interferência negativa sobre a sinalização da insulina (MIYASAKI et al., 2002). Além disso, os ácidos graxos aumentam a gliconeogênese hepática (MALMENDIER et al., 1989). Outros estudos sugerem que aumento intracelular de ácidos graxos induz resistência insulínica pelo aumento das relações NADH/NAD e acil graxo CoA/CoA, levando a redução da atividade da piruvato desidrogenase e aumento da concentração de citrato, com conseqüente inibição da utilização de glicose (DESVERGNE & WAHLI, 1999).

Existem evidências de que a função do tecido adiposo é alterada em estados de resistência à insulina. O tecido adiposo tem um papel crucial no tamponamento do fluxo diário de ácidos graxos na circulação em períodos pós-prandiais, análogos às funções do fígado e músculo esquelético no tamponamento dos fluxos pós-prandiais de glicose (MASCARO et al., 1998). A resistência insulínica determina uma liberação maior de ácidos graxos pelo tecido adiposo, acompanhado do aumento da captação dos ácidos graxos pelos hepatócitos o que leva a uma sobrecarga da β oxidação mitocondrial com conseqüente acúmulo de lipídios na célula hepática (ARNER, 2003).

Como relatado anteriormente, nossos resultados corroboram dados de outros autores (WINDMUELLER, 1964; LAWRENCE et al., 1971) e mostram que a administração de dieta contendo AO durante 9 dias é suficiente para causar esteatose hepática severa, avaliada através de cortes histológicos e da análise do conteúdo hepático de gordura total. Todavia, trabalho anterior do nosso laboratório demonstrou que animais suplementados com AO não desenvolvem resistência à insulina, observada através de teste intravenoso de tolerância à

glicose (BOTION, 2007). Uma possibilidade é que o tempo entre o desenvolvimento da esteatose e a realização dos experimentos não tenha sido suficiente para causar resistência à insulina e /ou intolerância à glicose nesses animais.

Além disso, conforme demonstrado nos resultados, a captação de glicose por adipócitos nos animais AO apresentou-se maior quando comparado ao controle tanto em relação ao estado basal como no estimulado com insulina (50ng/mL). Nota-se que a captação de glicose estimulada pela insulina foi de aproximadamente 4-5 vezes tanto para os animais AO como para os controles, o que mostra que a resposta à insulina sobre o transporte da glicose é semelhante nos dois grupos, C e AO. O aumento na captação de glicose evidenciado nos adipócitos dos animais suplementados com AO pode ser conseqüente ao aumento no conteúdo da proteína GLUT-4 nessas células, conforme o resultado apresentado utilizando a técnica western blot.

Trabalhos recentes (BICKEL, 2004) têm demonstrado que existe uma inter-relação fisiológica entre os tecidos e que esses são capazes de adaptarem-se às alterações na disponibilidade e tipo de substratos. Quando ocorrem desequilíbrios nessa relação as doenças metabólicas como a obesidade, a resistência à insulina e diabetes se estabelecem. Esse fenômeno tem sido chamado de flexibilidade metabólica.

O aumento do conteúdo hepático de TAG observado nos animais alimentados com AO é acompanhado por redução do conteúdo plasmático desse lipídio (manuscrito em fase final de redação). O aumento da captação de glicose observado nesses animais pode ser conseqüente à alteração na utilização de substratos pelos tecidos periféricos, ou seja, diminuição na utilização dos TAG provenientes da secreção hepática de VLDL e aumento na utilização da glicose circulante.

O tratamento com fenofibrato nos animais AO não alterou a captação de glicose por adipócitos quando comparado aos animais que receberam apenas dieta contendo AO.

Provavelmente, devido ao fato da captação de glicose já estar aumentada nos animais AO, o tratamento com fenofibrato não modificou esse parâmetro.

Os resultados obtidos neste trabalho, em relação à atividade da LPL do tecido adiposo epididimal, mostram que o tratamento com dieta contendo ácido orótico aumentou a atividade desta enzima em relação aos animais alimentados com dieta controle. Sugere-se que o aumento da sua atividade pode estar relacionado à otimização da captação dos TAG pelo tecido adiposo epididimal em resposta à redução dos níveis circulantes desses lipídios nos animais AO. O aumento da atividade da enzima LPL no tecido adiposo pode contribuir paralelamente para a redução nas concentrações plasmáticas de lipídios induzidas pela ingestão de AO. Além disso, o aumento na atividade da LPL nos animais suplementados com ácido orótico pode ser importante para a manutenção do estoque de TAG no tecido adiposo desses animais.

O tratamento com fenofibrato causou redução da atividade da LPL no tecido adiposo epididimal dos animais AO+F em relação aos animais AO. Esse resultado corrobora com o efeito redutor da massa adiposa induzida por esse tratamento também verificado nos animais controles (tópico 5.1).

Não ocorreu alteração no que se refere a lipogênese do tecido adiposo epididimal dos animais tratados com AO em relação aos controles. Entretanto, como no relatado no tópico 5.1, o fenofibrato reduziu a síntese de ácidos graxos dos animais tratados com essa droga, AO+F.

A figura 20 resume os efeitos da administração dietética com AO à 1% no fígado e tecido adiposo.

animais tratados com AO. Portanto, esse efeito parecer ser intrínseco a β -oxidação peroxissomal conforme também demonstrado no trabalho de MANCINI e colaboradores (2001).

O aumento na expressão do PPAR α e o conseqüente *upregulation* do mRNA para a enzima ACO induzido pelo tratamento com fenofibrato, pode apresentar um papel importante na redução do conteúdo hepático de lipídios induzido pela suplementação dietética de AO. Por sua vez, esse efeito também pode influenciar na redução da adiposidade.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarsland, A., Chinkes, D., Wolfe, R.R. Contributions of de novo synthesis of fatty acids to total VLDL-triglyceride secretion during prolonged hyperglycemia/hyperinsulinemia in normal man. *J Clin Invest* 1996; 98: 2008-2017.

Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221

Anonymous, G. Effect of fenofibrate on progression of coronary- artery disease in type 2 diabetes: The diabetes atherosclerosis intervention study, a randomised study. *Lancet* 2001; 357:905-910.

Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J. Altered constitutive expression of fatty acid metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem* 1998;273:5678–5684

Arner, P. Free fatty acids- do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001; 3: 11-19.

Arner, P. Regulation of lipolysis in fat cells. *Diabetes* 1996; 4: 450-463.

Arner, P. The adipocyte in insulin resistance: Key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14 (3): 137-145.

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

Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouet, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J.C., Rubin, E., Deneffe, P., Staels, B., Branellec, D. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 97:2408-16.

Bickel, P.E. Metabolic fuel selection: the importance of being flexible. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1547-1549.

Bocher, V., Torra, P.I., Fruchart, C.J., Staels, B. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2002; 967:7-18.

Boden, G. Obesity, free fatty acids, and insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol* 2001; 8: (20) 235-239.

Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., Lemiex, S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 2001; 50: 1612-1617.

Botham, K.M., Avella, M., Cantafora, A., Bravo, E. The lipolysis of chylomicrons derived from different dietary fats by lipoprotein lipase in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1997; 1349:257-263.

Botion, L.M, Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm Metab Res* 1995; 27:310-313.

Botion, L.M. The influence of fasting/ refeeding on the lipoprotein lipase activity of adipose tissue and muscle. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34 (11): 1411-1414.

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

Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR α , β , and

γ in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.

Breen, K.J., Schenker, S., Heimberg, M. Fatty liver induced by tetracycline in the rat: Dose-response relationships and effect of sex. *Gastroenterology* 1975; 69:714-723.

Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, J., Kahn, C.R. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998;.2: 559-569.

Carvalho, R., Passos, L. M. F., Martins, A. S. Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. *Journal Of Veterinary Medicine B* 2000; 47:351-359.

Cha, J.Y., Maeda, Y., Yamamoto, Y., Oogami, K., Yanagita, T. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62:508-513.

Chalkley, S.M., Hettiarachchi, N., Chisholm, D.J., Kraegen, E.W. Five hours fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat. *Metabolism* 1998; 47: 1121-1126.

Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 2001;7:53-58.

Choi, K.C., Ryu, O.H., Lee, K.W., Kim, H.Y., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Choi, D.S., Baik, S.H., Choi, K.M. Effect of PPAR- α and - γ agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF- α in visceral fat of OLETF rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 336(3) 747-753.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium

thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987; 162 :156-159.

Costet, P., Legendre, C., Moré, J, Edgar, A., Galtier, P., Pineau, T. Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -Isoform Deficiency Leads to Progressive Dyslipidemia with Sexually Dimorphic Obesity and Steatosis. *Biol Chem* 1998; 273 (45): 29577-29585.

Cryer, A. Riley, S.E., Williams, E.R. Robinson, D.S. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and postheparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat -cells and to plasma insulin concentrations. *Clinical Science and Molecular Medicine* 1996; 50: 213-221.

Degerman, E., Belfrage, P., Manganiello, V.C. Structure, localization and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 1997; 272:6823-6826.

Deshaies, Y., Arnold, J., Lalonde, J., Richard, D. Lipoprotein lipase in white and brown adipose tissues of exercised rats fed a high-fat diet. *American Physiological Society*, 1988;255: 226-31.

Desvergne, B., Wahli, W. Peroxisome proliferator activated- receptor: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* 1999; 20(5): 649-688.

Everett, L., Galli, A., Crabb, D. The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Liver* 2000; 20: 191–9.

Fan, C.Y., Pan, J., Chu, R. Lee, D. Kluckman, K.D., Usuda, N., Singh, I., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Maeda, N., Reddy, J.K. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 24698–710.

Ferreira, A.V.M., Parreira, G.G.,Green, A.,Botion, L.M. Effects of fenofibrate on lipid metabolism in adipose tissue of rats. *Metabolism* 2006 Jun;55(6):731-5.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.A. a simple method for the isolation and purification of

total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509.

Fromenty, B., Fisch, C., Berson, A., Letteron, P., Larrey, D., Pessayre, D. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the level of complex I and complex II. *J. Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 1377-1384.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J., Burrell, M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.

Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, Edward, Piomelli, D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 2005; 48: 1147-1153.

Grimberg, J., Nawoschik, S., Belluscio, L., Mckee, R., Turck, A., Eisenberg, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of the genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17:8390.

Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspé, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., Herbert, J., Vinegar, D., Willson, T., Fruchart, J., Berge, R., Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptor α activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 16638-16642.

Guzmán, M., Verme, J.L., Fu, J., Oveisl, F., Blazquez, C., Piomelli, D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor PPAR α . *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(27): 27849-27854.

Hamilton, R.L, Guo, L.S, Felker, T.E, Chao, Y.S, Havel, R.J. Nascent high density lipoproteins from liver perfusates of orotic acid-fed rats. *J Lipid Res*. 1986;27(9):967-78.

Hay, R., Fleming, R., O'Connell, W., Kirschner, J., Oppliger, W. Apolipoproteins of the

orotic acid fatty liver: implications for the biogenesis of plasma lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 1988;29: 981-995

Hebbachi, A.M, Marilia, C. L. Seelaender, P. W., Baker and Gibbons, G F. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n³ fatty acids. *Biochem. J.* 1997; 325: 711-719.

Hom; F.G., Goodner, C.J. Insulin-dose response characteristic among individual muscle and adipose tissue measured in rat in vivo using 2-deoxy-glucose *Diabetes*. 1984 (33): 153-159.

Idzior-Walus, B., Sieradzki, J., Rostworowski, W. Effects of comiconised fenofibrato on lipid and insulin sensitivity in patients with polymetabolic syndrome X. *Eur. J. Clin. Invest* 2000; 30: 871–878.

Ip, E., Farrell, G.C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38: 123–132.

Jeong, S., Mina, K., Miyoung, H., Hyunghye, L., Jiwon, A., Moonza, K., Yang-Heon, S., Chuog, S., Ki-Hoan, N., Tae, W. K., Goo, T., Michung, Y. Fenofibrate Prevents Obesity and Hypertriglyceridemia in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. *Metabolism*, 2004; 53: 607-613.

Kahn, B.B., Flier, J.S., Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 2000;106(4): 473-481.

Karpe, F., Olivercrona, T., Olivercrona, G., Samra, J.S., Summers L.K.M., Humphreys, S.M., Frayn, K.N. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissue in regulation of plasma lipoprotein lipase concentration. *Journal of Lipid Research* 1998; 39:2387-2393.

Katz, J., Wals, P.A. Lipogenesis from lactate in rat adipose tissue. *Biochem Biophys. Acta*

1974; 348:344-356.

Kersten, S, Seydoux, J, Peters, J. M., Gonzalez, F. J. Desvergne, B., Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 1999; 103(11): 1489-1498.

Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports* 2001; 21 (41): 282-286.

Kersten, S. Peroxisome Proliferator activated Receptor and obesity. *European Journal of Pharmacology* 2002; 440: 223-234.

Kettelhut, I.C., Foss, M.C., Migliorini, R.H. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (rat) and in rats fed a high-protein diet. *Am. J. Physiol.* 1980; 239: 437-444.

Kim, J.K, Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., Breslow, J.L., Shulman, G.I. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2001; 98: 7522-7527.

Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B, Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Evans, R.M. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7355-7359.

Klip, A. & Paquet, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990;13: 228-243.

Knauf, C., Rieusset, J., Foretz, M., Cani P.D., Uldry, M., Hosokawa, M., Martinez, E., Bringart, M., Waget, A., Kersten, S., Desvergne, B., Gremlich, S., Wahli, W., Seydoux, J., Delzenne, N.M., Thorens, B., Burcelin, R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Null Mice Have Increased White Adipose Tissue Glucose Utilization, GLUT4, and Fat Mass: Role in Liver and Brain. *Endocrinology* 2006;147:(9) 4067-4078.

Koh, E.H., Kim, M.S., Park, J.Y., Kim, H.S., Youn, J.Y., Park, H.S., Youn, J.H., Lee, K.U. Peroxisome proliferator- activated receptor (PPAR)- α activation prevents diabetes in OLETF rats. *Diabetes* , 2003;52: 2331-2337.

Kotani, K., Peroni, O.D., Minokoshi, Y., Boss, O., Kahn, B.B. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1666–1675.

Kraegen, E.W., James, D.E., Jenkins, A.B., Chisolm, D.J. Dose-response curves for in vivo sensitivity in individual tissues in rats. *Am. J. Physiol.* 1985; 248:353-362.

Kunau, W.H., Dommes, V., Schulz, H. Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* 1995; 34: 267–342.

Kusunoki, M., Tsutsumi, K., Hara, T., Ogawa, H., Nakamura, T., Miyata, T., Sakakibara, F., Fukuzawa, Y., Suga, T., Kakumu, S., Nakaya, Y. Correlation between lipid and glycogen contents in liver and insulin resistance in high-fat fed rats treated with the lipoprotein lipase activator Na 1886. *Metabolism*, 2002; 51: 792-795.

Ladu, M.J., Hapsas, H, Palmer, W. K. Regulation of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle tissue during fasting. *Am J of Physiology* 1991; 260: 953-959.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680-685.

Lamb, R.G, Koch, J.C, Bush, S.R. An enzymatic explanation of the differential effects of

oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1993;1165:299-305.

Large, V., Arner, P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.* 1998; 24:409-419.

Lawrence, A., Pottenger, Godfrey, S., and Getz. Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid-fed rats. *Journal Of Lipid Research* 1971; 12: 450-459.

Lawrence, J.W., Li, Y., Chen, S., DeLuca, J.G., Berger, J.P., Umbenhauer, D.R., Moller, D.E., Zhou G. Differential gene regulation in human vs rodent hepatocytes by peroxisome proliferator – activated receptors alpha: PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation- associated genes in humans cells independently of the level of receptor expression. *J Biol Chem.* 2001; 276:31521-31527.

Lee, C., Olson, P., Evans, R.M. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology* 2003; 144(6): 2201-2207.

Lee, H.J, Choi, S.S., Park, M.K., An, Y.J., Seo, S.Y., Kim, M.C., Hong, S.H., Hwang, T.H., Kang, D.Y., Garber, A.J., Kim, D.K. Fenofibrate lowers abdominal and skeletal adiposity and improves insulin sensitivity in OLETF rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296: 293-299.

Leone, T.C., Weinheimer, C.J., Kelly, D.P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96: 7473–8.

Li, P., Zhengxian, Z., Lu, Y., Granneman, J.G. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferators-activated receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:617-626.

Licinio, J.; Negro, A. B.; Mantzoros, C.; Kaklamani, V.; Wong, M.; Bongiorno, P. B.; Negro, P. P.; Mulla, A.; Veldhuis, J. D.; Cernal, L.; Flier, J. S.; Gold, P. W.; Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude : Clinical implications, *J. clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83(11):4140-4147.

Louet, J.F., Chatelain, F., Decaux, J.F., Park, E.A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J., Pegorier, J.P. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyl- transferase I gene (L-CPT1) expression through a peroxisome proliferator – activated receptors alpha – independent pathway. *Biochem J.* 2001;354:189-197.

Madej, A., Okopien, B., Kowalski, J., Zielinski, M., Wysocki, J., Szygula, B., Kalina, Z., Herman, Z.S. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998;36 (6):345-9.

Malmendier, C.L, Lontie, J.F, Delcroix, C., Dubois, D.Y, Magot, T., De Roy, L. Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis* 1989; 77:139-149.

Mancini, F.P., Lanni, A., Sabatino, L., Moreno, M., Giannino, A., Contaldo, F., Colantuoni, V., Goglia, F. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *FEBS Lett* 2001;491: 154-158.

Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., Rizzetto, M. Non-alcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917–23

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Staels, B. & Auwerx, J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 1997; 272: 28210-7.

Martins, A. S.; Greene, L. J.; Yoho, L. L.; Milsted, A. The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. *Gene* 1995;161:, 253-257.

Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G., Haro, D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998;273:8560-3.

Miyasaki, Y et al. Dose-response effect of pioglitazone on insulin sensitivity and insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes care* 2002; 25:517-523.

Mohamed- Ali, V., Pinkney, J.H, Coppack, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *J Nutritional Biochemistry* 2001; 13: 701-714. Conferir a revista

Moller, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* , 2001;414: 821–827.

Morifuji, M., Aoyama, Y. Dietary orotic acid affects antioxidant enzyme mRNA levels and oxidative damage to lipids and proteins in rat liver. *J Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 403-410.

Morral, N. Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14 (4): 169-175.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. Latruffe, N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by PPAR α and γ activators in a tissue- and inducer- specific manner. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:16710-16714.

Nagai, Y., Nishio, Y., Nakamura, T. Maegawa, H., Kikkawa, R., Kashiwagi, A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: 1180-1190

Nigro, J., Osman, N., Dart, A.M., Peter, J. Little Insulin Resistance and Atherosclerosis Endocrine Reviews, 2006; 27 (3): 242-259.

Nilsson-Ehle, P.E; Schotz, M.C. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. J. Lipid Res 1976; 17: 536-41.

Novikoff, P.M., Edelstein, D. Reversal of orotic acid- induced fatty liver in rats by clofibrate. Laboratory Investigation 1977; 36: 215-231.

Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, J., Escher, P., Tan, N., Havekes, L.M., Koenig, W., März, W., Tafuri, S. PPAR α governs glycerol metabolism. The Journal of Clinical Investigation, 2004;114 (1):94-103.

Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., Kahn, B.B. Abel, E.D. Adipose selective targeting of the GLUT-4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature 2001; 409:729-733.

Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Van den Berge, V., Horsmans, Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. J Hepatology 2002; 32:645-652.

Picard, F., Naimi, N., Richard, D., Deshaies, Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. Diabetes. 1999;48(3):452-9.

Pittas, A.G., Joseph, N.A., Greenberg, A.S. Adipocytokines and insulin resistance. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2004; 89(2): 447-452.

Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hammerle, G., Zechner, R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. Curr. Opin. Lipidol 2002; 13:471-481.

Ptaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001;29(9):e45.

Reddy, J.K. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis – peroxisomal β oxidação, PPAR α , and steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 1333- 1339.

Rizvi, F., Puri, A., Bhatia, G., Khanna, A.K., Wulff, EM., Rastogi, A.K., Chander, R. Antidyslipidemic action of fenofibrate in dyslipidemic- diabetic hamster model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1756-1764.

Robinson, S., Henderson, A.D., Gelding, S.V., Kiddy, D., Niththyananthan, R., Bush, A., Richmond, W., Johnston, D.G., Franks, S. Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 277-284.

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

Rogers, A.E, Newberg, P.M. Animal model: Fatty liver and cirrhosis in lipotrope-deficient male rats. *Am J Pathol* 1973; 73: 817-820.

Rudin, E., Barzilai, N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. *Immunity and Ageing*. 2005, 2:1.

Saiki, R. K., Sharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, 1985;230:1350-1354.

Saltiel, A.R., Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.

Savage, D. B. Expert Reviews in Molecular Medicine: <http://www.expertreviews.org/> 2005; Vol. 7: Issue 1.

Srivastava, R.A, Jahagirdar, R, Azhar S., Sharma, S., Bisgaier, C.L. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2006 ;14:1-16.

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

Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I. P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J. C., Najib, J., Maclouf, J., Tedgui, A. Activation of human aortic smooth-muscles is inhibited by PPAR α but not PPAR γ activators. *Nature* 1998;393:790-793.

Standerfer, S.B., Handler, P. Fatty liver induced by orotic acid feeding. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955;90(1):270–271.

Su, G.M., Sefton, R.M., Murray, M. Down- regulation of rat hepatic microsomal Cytochromes P-450 in microvesicular steatosis induced by orotic acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999;291:953-959.

Tenenbaum, A., Motro, M., Fisman, E.Z., Adler, Y., Shemesh, J., Tanne², D., Leor, J., Boyko, V., Schwammenthal, E., Behar, S. Effect of bezafibrate on incidence of type 2 diabetes mellitus in obese patients. *European Heart Journal*, 2005; 26: 2032–2038.

Tsuchida, A., Yamauchi, T., Takekawa, S., Hada, Y., Ito, Y., Maki, T., Kadowaki, T. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR α) Activation Increases Adiponectin Receptors and Reduces Obesity-Related Inflammation in Adipose Tissue: Comparison of Activation of PPAR α , PPAR γ , and Their Combination. *Diabetes* 2005;54(12):3358-70.

Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.C., Staels, B., Auwerx, J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995; 96:741-750.

Wang, M.Y, Lee, Y., Unger, R.H. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem*, 1999;274: 17541-17544.

Wang, P.R., Guo, Q., Ippolito, M. High fat fed hamster, a unique animal model for treatment of diabetic dyslipidemia with peroxisome proliferator activated receptor alpha selective agonists. *Eur. J. Pharmacol* 2001; 427: 285–293.

Windmueller, H.G, Spaeth, A.E. Perfusion in situ with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion. Normal and orotic acid-fed rats. *J Biol Chem*. 1966;241(12):2891–2899.

Windmueller, H.G. An Orotic Acid-induced, adenine-reversed inhibition of hepatic lipoprotein secretion in rat. *The Journal of Biological Chemistry* 1964; 239: 530-537.

Wolfrum, C., Borrmann, C.M, Börchers, T., Speners, F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: A signaling path to the nucleus. *PNAS* 2001; 27: 2323-2328.

Wu. G., Olivecrona, G., Olivecrona, T. The distribution of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *J Biol Chem*. 2003; 278:11925-11930.

Wysocki, J., Belowski, D., Kalina, M., Kochanski, L., Okopien, B., Kalina, Z. Effects of micronized fenofibrate on insulin resistance in patients with metabolic syndrome. *J Clin Pharmacol Ther*. 2004;42(4):212-7.

Ye, J., Iglesias, M., Watson, D., Ellis, B., Wood, L., Jensen, P., Sorensen, R., Larsen, P., Cooney, G., Wassermann, K., Kraegen, E. PPAR β/γ ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284: E531-E540.

Ye, M.J., Doyle, P.J., Iglesias, M.A., Watson, D.G., Cooney, G.J., kraegen, E.W.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat fed rats: comparison with PPAR γ activation. *Diabetes* 2001;50: 411–417.

Yeon, J. E., Choi, K. M., Baik, S.H., Kim, K.O., Lim, H.J., Park, K.H., Kim, J.Y., Jong-Jae, P., Kim, J.S., Young-Tae, B., Byun, K.S., Lee, C.H. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004;19 (7): 799–804.

Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W.Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., Reddy, J.K. Adipocyte- specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to Peroxisome proliferators activated receptor- activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) overexpression. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 3: 498-505.

Zisman, A, Peroni, O.D., Abel, E.D., Michael, M.D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B.B., Wojtaszewski, J.F., Hirshman, M.F., Virkamaki, A., Goodyear, L.J., Kahn, C.R., Kahn, B.B. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, 2000;6:924-928.

Apêndice 1

- **Soluções utilizadas para a realização da extração de RNA no fígado e tecido adiposo e eletroforese em gel de poliacrilamida**

Solução de Desnaturação (Solução D):

4 M isotiocianato de guanidina

25 mM citrato de sódio pH 7,0

0,5% sarcosil

0,1M 2-mercaptoetanol.

Água DEPC:

Água mili-Q (1 L) contendo 0,5 mL de dietilpirocarbonato.

Autoclavado após 24 horas.

Tampão TBE 5x:

Tris-base – 54 g

Ácido bórico – 27,5 g

EDTA 0,5 M pH 8 – 20 mL

H₂O destilada (q.s.p.) – 1000 mL.

Solução de acrilamida 30%:

Acrilamida – 72,5 g

Bis-acrilamida – 2,5 g

H₂O mili-Q (q.s.p.) – 250 mL.

- **Quantificação do RNA total de fragmentos do fígado e tecido adiposo**

Tabela-1. Quantificação do RNA total de fragmentos do fígado e tecido adiposo epididimal.

Amostra	$\lambda = 260$ (Ac.nucléicos)	$\lambda = 280$ (Proteína)	$^{260}/_{280}$	Concentração ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)
Fígado				
C1	1,494	0,745	2,005	1,19
C2	0,327	0,172	1,9	0,26
C3	0,298	0,168	1,774	0,506
C+F1	0,735	0,401	1,833	0,588
C+F2	0,43	0,217	1,98	0,34
C+F3	0,238	0,129	1,845	0,476
AO1	0,259	0,133	1,94	0,207
AO2	1,712	0,94	1,821	1,3696
AO3	0,170	0,09	1,889	0,34
AO+F1	2,546	1,312	1,94	2,0368
AO+F2	0,49	0,24	1,97	0,392
AO+F3	0,193	0,104	1,856	0,386
Tec. adiposo				
C1	0,102	0,049	2,08	0,0816
C2	0,223	0,099	2,25	0,178
C3	0,007	0,004	1,75	0,014
C+F1	0,097	0,043	2,25	0,0776
C+F2	0,144	0,08	1,8	0,1152
C+F3	0,173	0,091	1,901	0,346
AO1	0,086	0,038	2,26	0,0688
AO2	0,205	0,124	1,65	0,16
AO3	0,616	0,338	1,822	1,232
AO+F1	0,074	0,024	3,083	0,059
AO+F2	0,464	0,275	1,687	0,3712
AO+F3	0,288	0,154	1,87	0,576

Determinação das concentrações das amostras de RNA do fígado e tecido adiposo através da leitura da densidade óptica (**OD**) em dois comprimentos de onda (λ) no espectrofotômetro *GeneQuant*. Aliquotas do RNA total em diluição de 1:50 e de 1:20, foram lidas em cubeta de quartzo específica. As concentrações foram calculadas considerando-se a diluição e o fator de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por densidade óptica de RNA.

- **Eletroforese do RNA total**

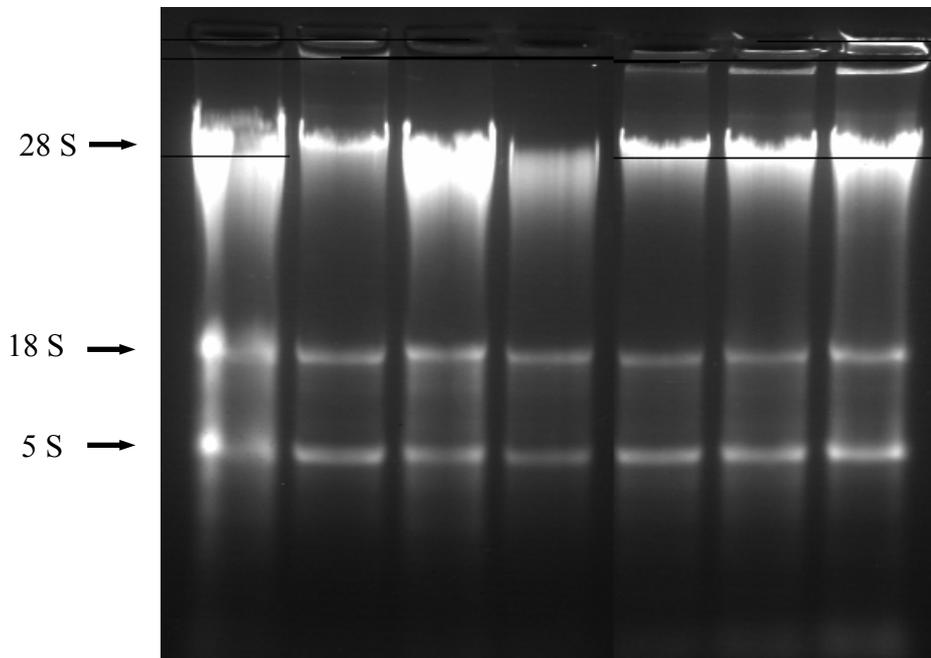


Figura-1. Eletroforese de RNA total de amostras de fígado e tecido adiposo em gel de agarose a 1,2%, com tampão TBE (1x) por 1h a 100 volts. O ácido ribonucléico foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), as bandas visualizadas em transiluminador UV e fotodocumentadas em *Núcleo Vision* (Núcleo Tech). As setas mostram as frações ribossomais 28 S, 18 S e 5 S.

Apêndice 2

- Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores para obtenção da sequência alvo do PCR em tempo real

1- PPAR α

A figura 2A mostra os resultados da busca por uma região contendo um intron para seleção dos iniciadores para o PPAR α . Os iniciadores de 24 nucleotídeos (*Primer Set 5*) foram criteriosamente selecionados contendo 50% de GC, permitindo um *T_m* de 59,4 e 59,5°C. Na figura 2B observa-se o fragmento de 98pb escolhido para o PCR em Tempo Real.



2- ACO

A *figura 3A* mostra os resultados da busca por uma região contendo um intron para seleção dos iniciadores para a ACO. Os iniciadores de 24 nucleotídeos (Primer Set 5) foram criteriosamente selecionados contendo 50% de GC, permitindo um *Tm* de 59,8 e 59,6°C. Na *figura 3B* observa-se o fragmento de 90pb escolhido para PCR em Tempo Real.

A

Primer Sequence:	5'-ATCTCTGTGGTTGCTGTGGAGTCA -3'		
Primer Start Position:	---	Primer Length:	24
Primer Tm:	59.8 °C	Primer Self Any:	3.0
Primer GC %:	50 %	Primer Self End:	1.0
Primer End Stability:	3.41	Primer Penalty:	0.18

Primer Sequence:	5'-TCTGGATGCTTCCTTCTCCAAGGT-3'		
Primer Start Position:	---	Primer Length:	24
Primer Tm:	59.6 °C	Primer Self Any:	6.0
Primer GC %:	50 %	Primer Self End:	2.0
Primer End Stability:	3.5	Primer Penalty:	0.41

B

```

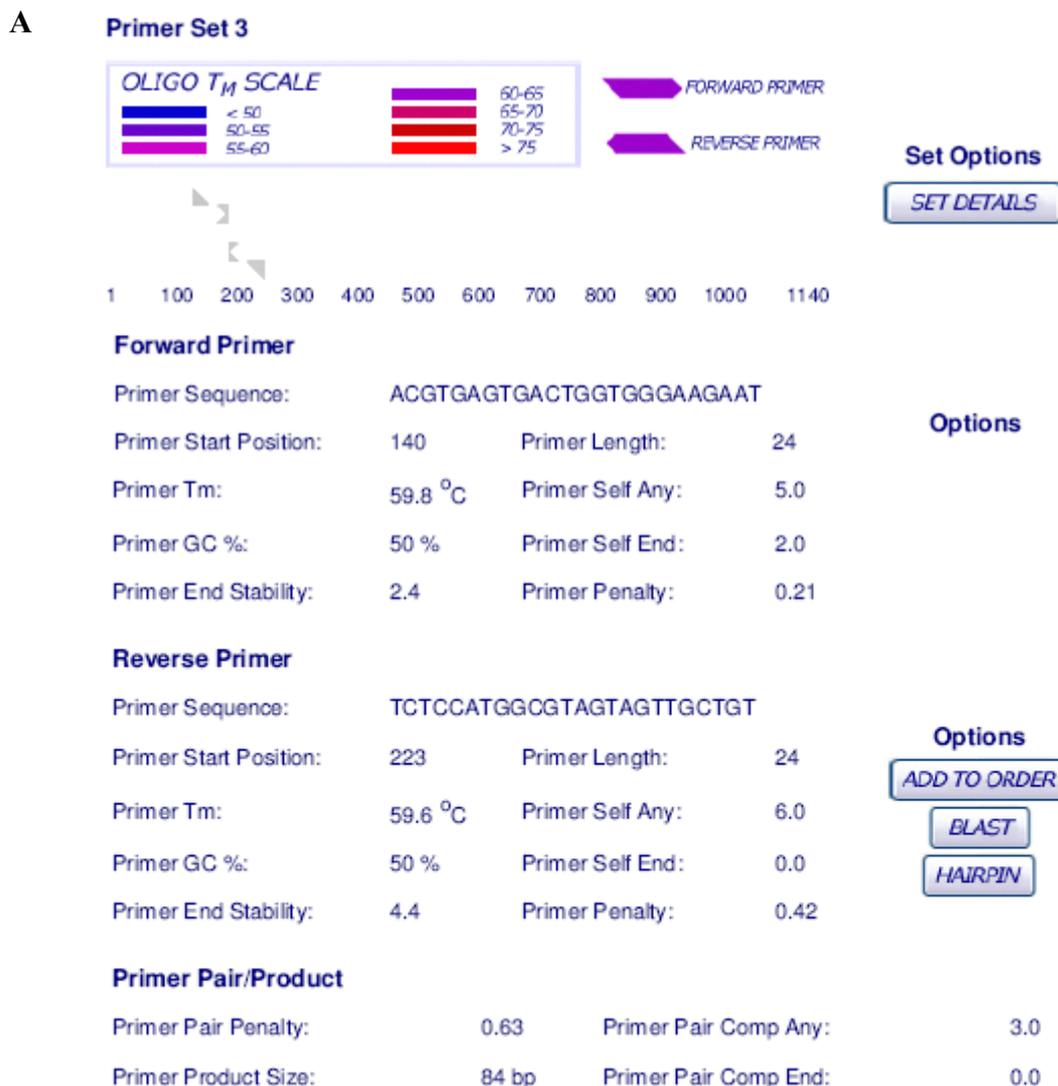
atctttaacaagccagttccaagcttgcccaacatggacagtggttttgcagaagccatcgc
caaggtacgaaaacagtaccctgggtgtcctggctccggagacgtgtgtcgcctcaatccagg
cctctgtgaagcatccctacgaagtaggcatcaaggaagaggaaaagctgtttatgtacctc
cgggcatccgggcaggctaaagccctacagtatgccttctttgctgaaaagtctgcaaataa
gtgggtcaactccctcaggagcgtcttggaacacagcctctgctcaaccctctcctcagttg
gcgttcttggcttgggaacgatgggcccaggcatcgccatttcttttgcgagagtggggatc
tctgtggttgctgtggagtcagaccccaaagcagctagatgctgcaaagaagataatcacttt
caccttggagaaggaagcatccagaggcgcatcagaacggccaagcttcggcaaaacaaaac
tcaggttctcctcatccacaaaggaactttcaactgtggatttggt

```

Figura-2. A- Seqüências utilizadas na estratégia de escolha dos iniciadores. B- amplicon-alvo para PCR em Tempo Real da ACO. Fragmento alvo de 90 nucleotídeos.

3- CPT-1

A figura 4A mostra os resultados da busca por uma região contendo um intron para seleção dos iniciadores para a CPT-1. Os iniciadores de 24 nucleotídeos (*Primer Set 3*) foram criteriosamente selecionados contendo 50% de GC, permitindo um *T_m* de 59,8 e 59,6°C. Na figura 3B observa-se o fragmento de 84pb escolhido para PCR em Tempo Real.



Apêndice 3

- Resultado do PCR convencional com os iniciadores para a ACO, PPAR α , PPAR γ , CPT-1 e β -actina em amostras de cDNA do tecido adiposo e fígado.

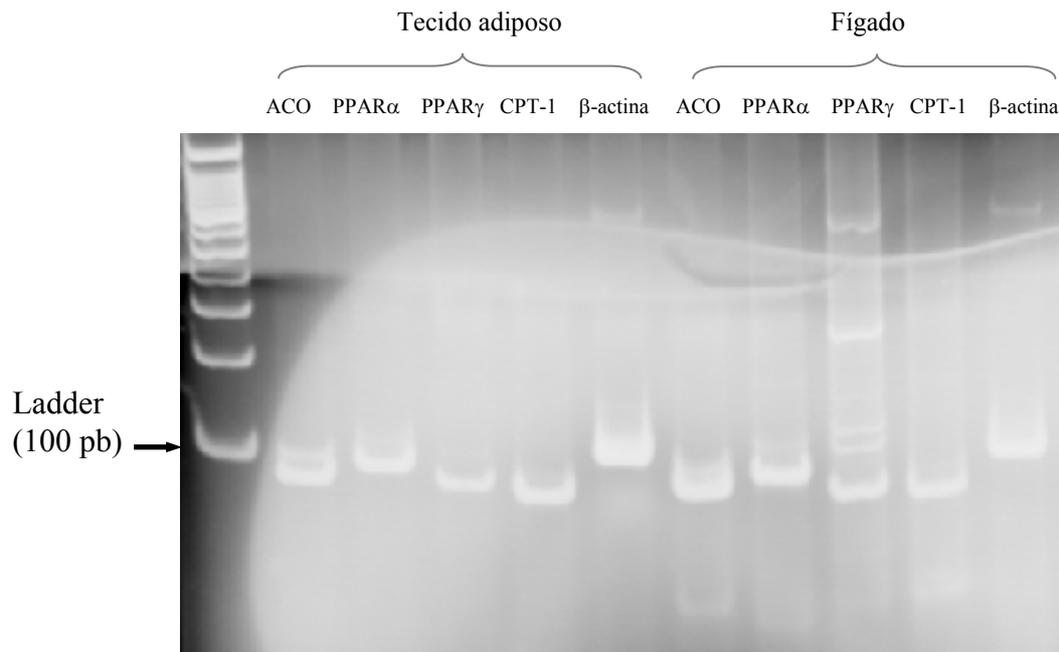


Figura-5. Resultado do PCR convencional com os iniciadores para a ACO, PPAR α , PPAR γ , CPT-1 e β -actina em amostras de cDNA do tecido adiposo e fígado. A verificação dos fragmentos foi feita utilizando-se alíquotas de 4 μ l da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida a 100 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 84 a 109pb são indicados pela seta inferior. Canaleta 1, marcador 50 pb DNA *ladder*.

Apêndice 4

- **Fragmentos do PPAR α , PPAR γ , ACO e CPT-1 obtidos no PCR convencional**

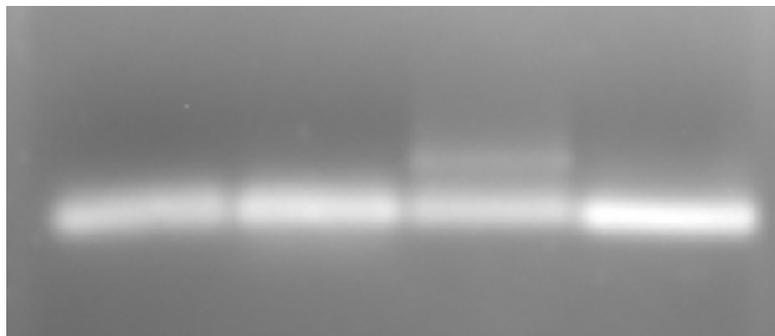
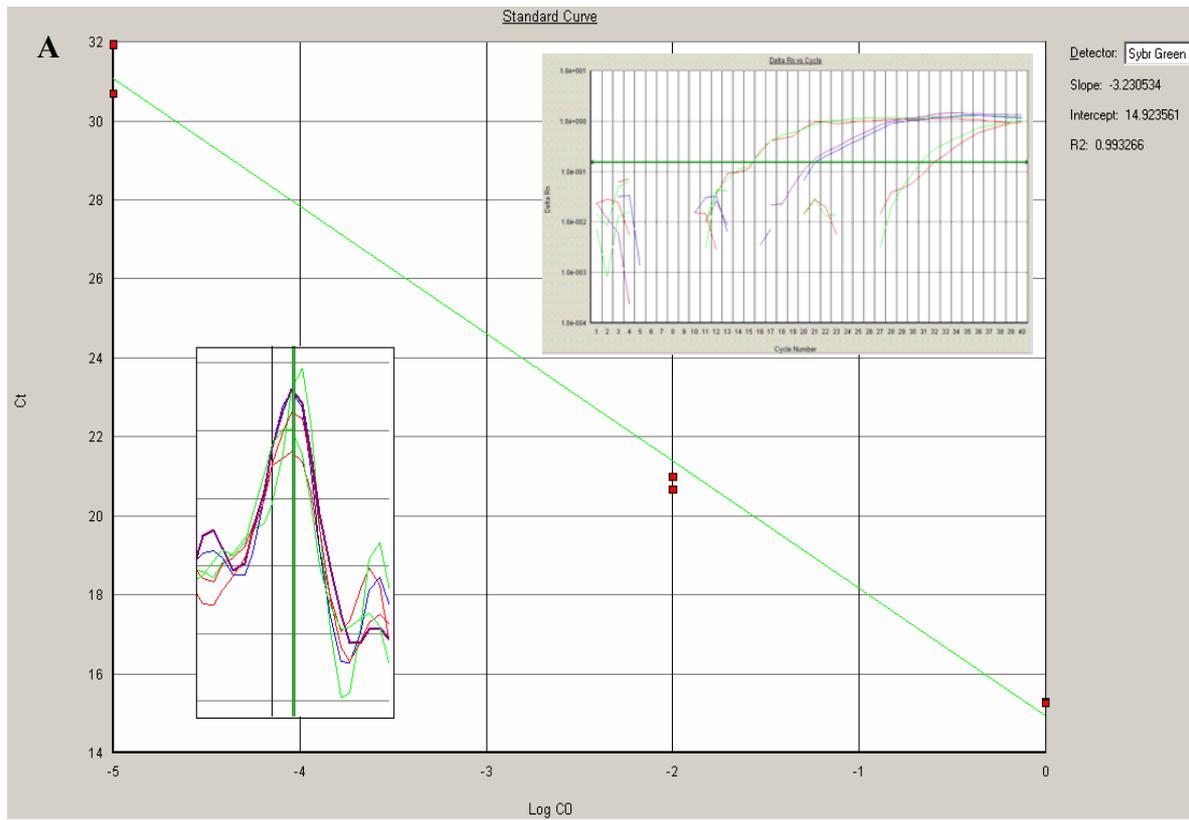


Figura-6. Purificações por eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos fragmentos do PPAR α , PPAR γ , ACO e CPT-1 obtidos no PCR convencional para quantificação e utilização como padrões no PCR em Tempo Real. Foram utilizados 20 μ l do amplicon para cada canaleta. A eletroforese foi realizada a 100 volts por, aproximadamente, 60 min. de corrida em tampão TBE 1x. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, os fragmentos foram cortados do gel e submetidos ao processo de purificação.

Apêndice 5

- Curvas de calibração obtidas para cada fragmento alvo do PCR em tempo real com as respectivas curvas de dissociação.



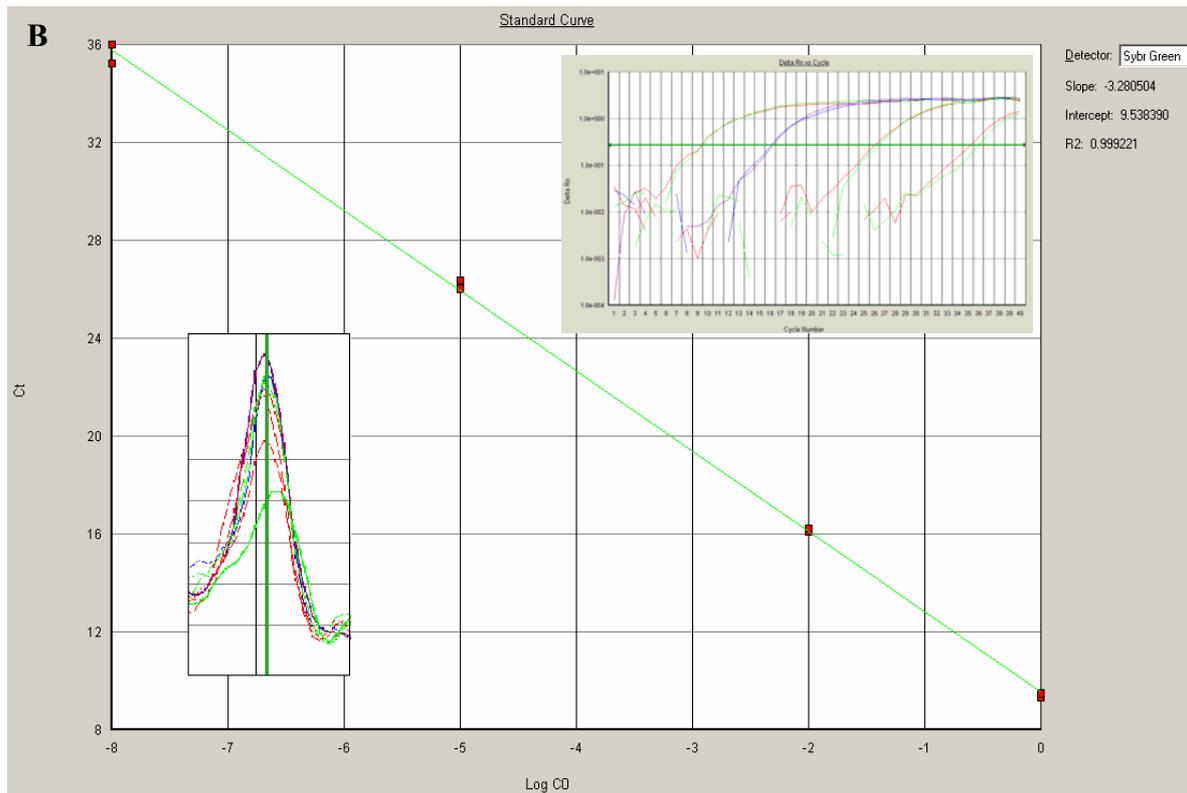
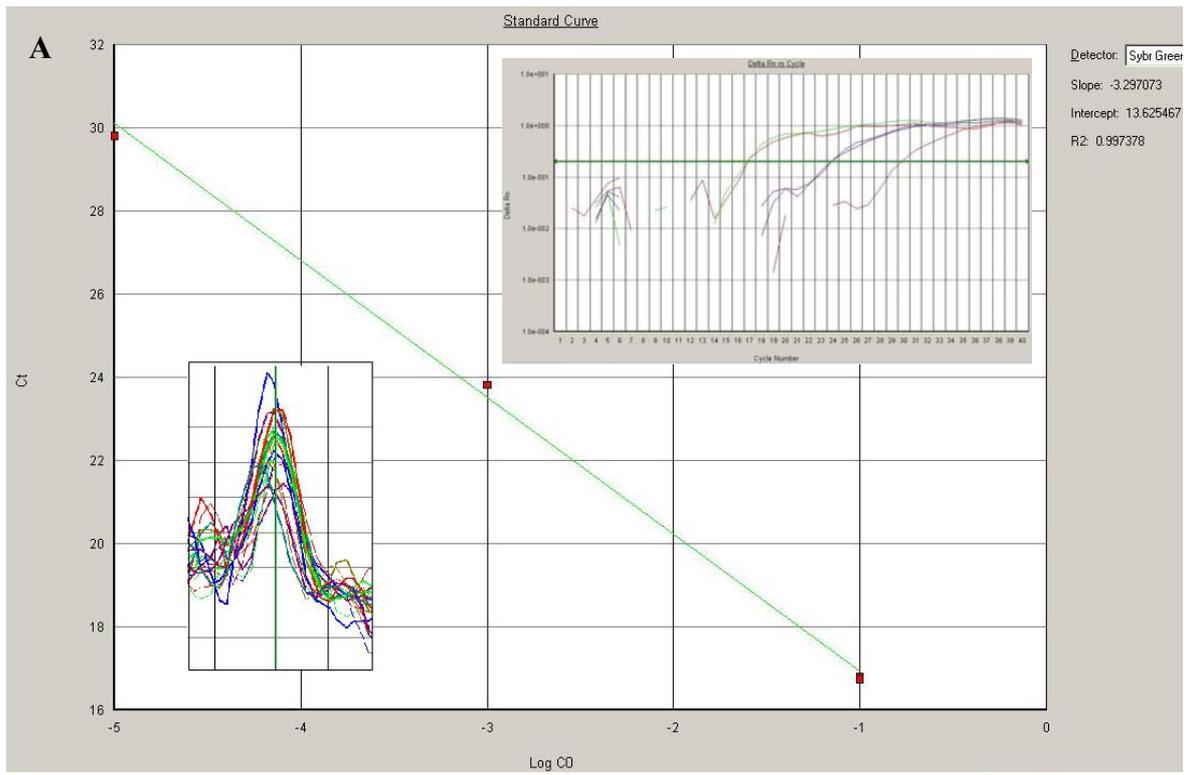


Figura-7 Resultado da curva-padrão do PCR em Tempo Real para o amplicon de 98 pb do PPAR α (A) e 109 pb da β -actina (B) no fígado. Curvas construídas a partir de diluições seriais de: 1ng, 10^{-1} ng, 10^{-3} ng, 10^{-5} ng e 10^{-7} ng dos amplicons purificados. As curvas de dissociação dos amplicons são apresentadas abaixo à esquerda. Para melhor visualização das imagens acesse: www.dcc.ufla.br/~thiago/adaliene.



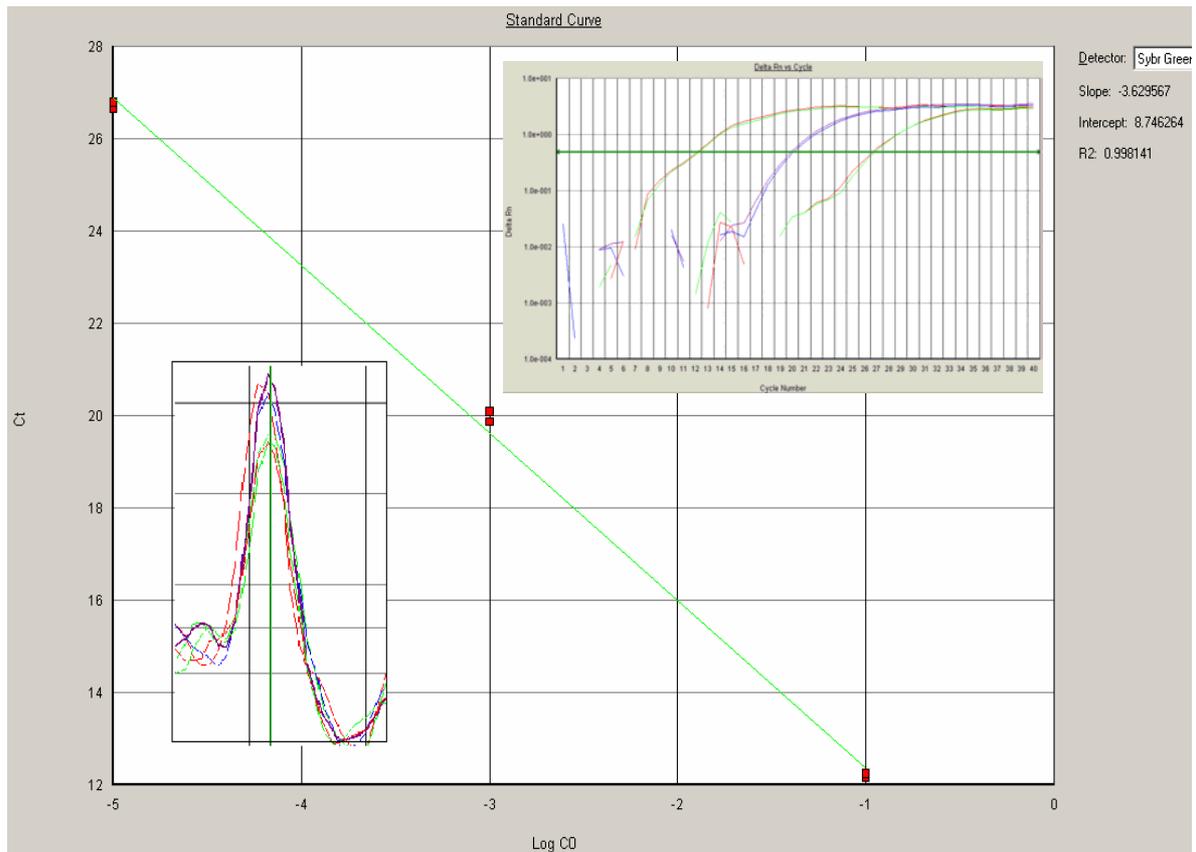
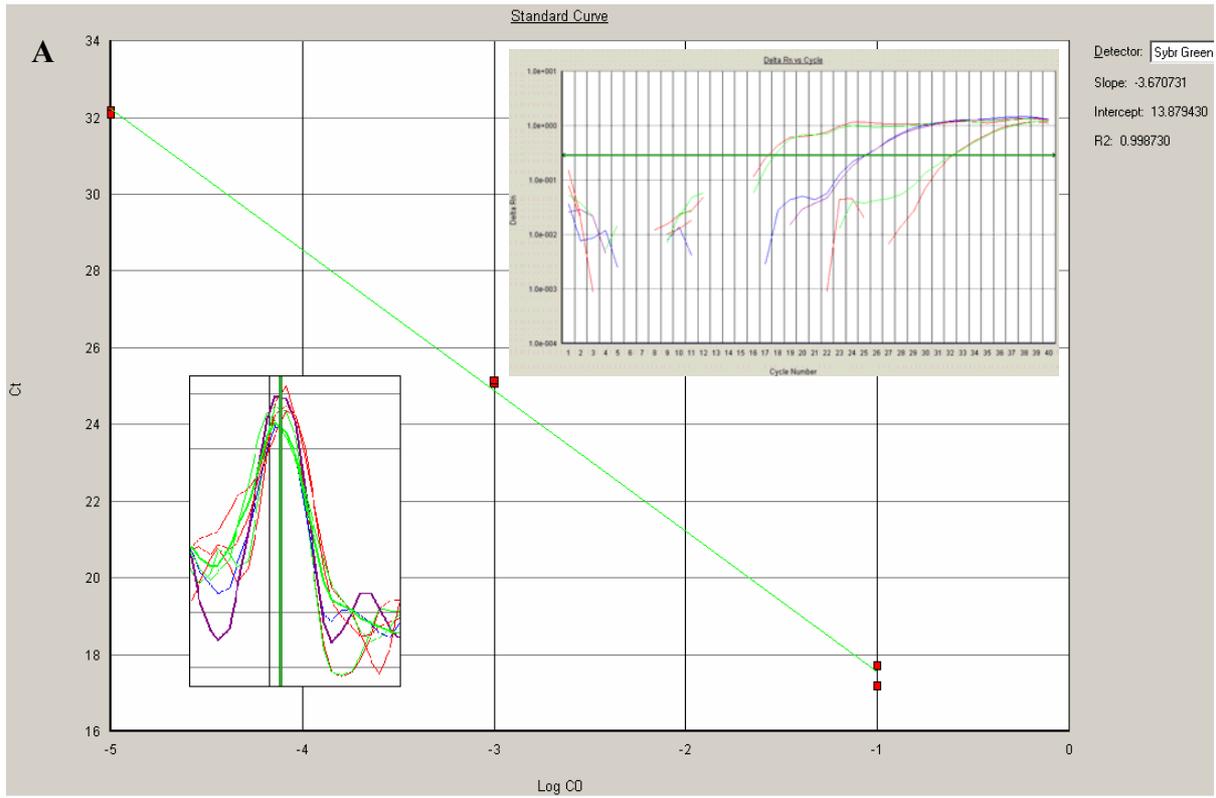


Figura-8 Resultado da curva-padrão do PCR em Tempo Real para o amplicon de 90 pb do ACO (A) e 109 pb da β -actina (B). Curvas construídas a partir de diluições seriais de: 1ng, 10^{-1} ng, 10^{-3} ng, 10^{-5} ng e 10^{-7} ng dos amplicons purificados. As curvas de dissociação dos amplicons são apresentadas abaixo à esquerda. Para melhor visualização das imagens acesse: www.dcc.ufla.br/~thiago/adaliene.



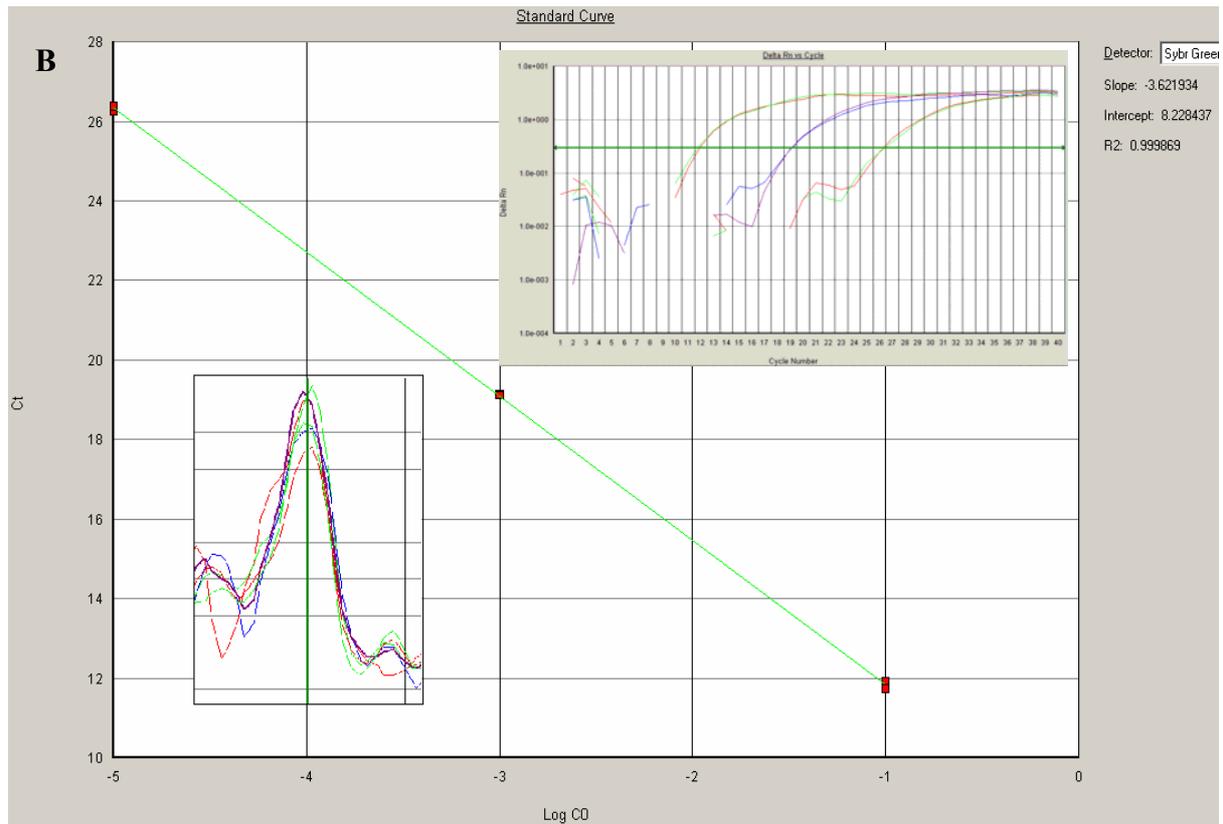
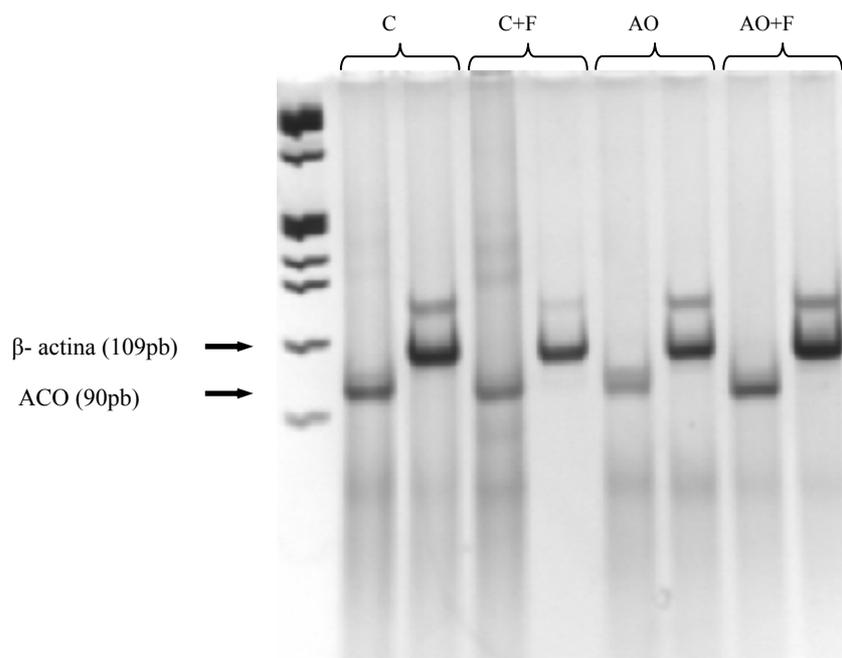


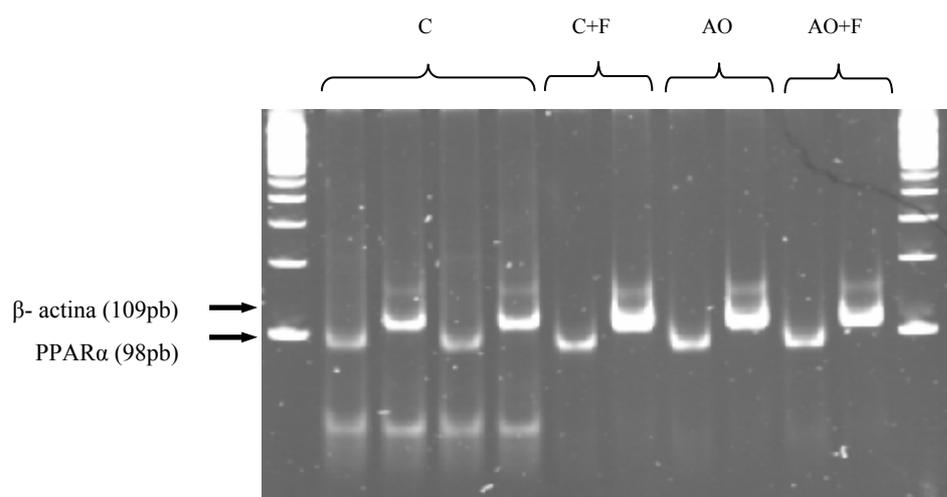
Figura-9 Resultado da curva-padrão do PCR em Tempo Real para o amplicon de 84 pb do CPT-1 (A) e 109 pb da β -actina (B). Curvas construídas a partir de diluições seriadas de: 1ng, 10^{-1} ng, 10^{-3} ng, 10^{-5} ng e 10^{-7} ng dos amplicons purificados. As curvas de dissociação dos amplicons são apresentadas abaixo à esquerda. Para melhor visualização das imagens acesse: www.dcc.ufla.br/~thiago/adaliene.

Apêndice 6

- Fragmentos amplificados no PCR em tempo real visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e corado com nitrato de prata



ACO- Fígado

PPAR α - fígado