UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Ana Paula de Assis

Efeito dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato e
termogênese do tecido adiposo marrom de ratos

Ribeirão Preto

2019

ANA PAULA DE ASSIS

**Efeito dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato
e termogênese do tecido adiposo marrom de ratos**

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

Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Isis do Carmo
Kettelhut

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Assis, Ana Paula

Efeito dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato e termogênese do tecido adiposo marrom de ratos. Ribeirão Preto, 2019.

95f. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Kettelhut, Isis do Carmo.

1. Tecido adiposo marrom 2. Glicocorticoides 3. Glicerol-3-fosfato
4. Lipogênese 5. Lipólise 6. Termogênese

FOLHA DE APROVAÇÃO

ASSIS, ANA PAULA. **Efeito dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato e termogênese do tecido adiposo marrom de ratos.**

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus amados pais Roberto de Assis e Maria de Lourdes Garcia Assis, pelo amor e apoio incondicional dedicados na realização dos meus infinitos sonhos. Por serem exemplos de luta e fé e serem a prova de que um abraço muda nosso mundo!

Agradecimentos

*Primeiramente a **Ele**, Deus pai misericordioso. Por toda sua bondade e presença em minha vida. Por mostrar o melhor caminho e ser meu conforto nos momentos difíceis e de dúvidas.*

*À minha amada família. Aos meus pais **Roberto de Assis** e **Maria de Lourdes Garcia Assis**, pelo amor sem medidas e apoio sem explicação em todos os sentidos da minha vida. Sou grata por todos os ensinamentos e oportunidade de realizar meus sonhos. Agradeço por serem meu exemplo de que sempre vale a pena lutar pelo o que se ama e não permitirem minha desistência diante dos vários obstáculos que encontramos nesse caminho. Agradeço por todas as orações, conversas e abraços que tanto ajudaram a acalmar meu coração e enche-lo de esperança. Tenho muito orgulho de ser sua filha. À minha irmã **Fernanda** e meus “piolhinhos” **Hugo, João, Mateus** e **Otávio**, por serem motivo da minha felicidade e por me darem força e recarregar minhas energias quando vou pra casa. À minha madrinha **Maria**, por todas orações, pelo carinho especial e o bolo de cenoura que só ela sabe fazer. À minha amiga e irmã de coração **Ana Paula**, pelo apoio e compreensão em diversos momentos, por sua torcida e alegria com minhas conquistas e pela amizade verdadeira.*

*À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut**, pela excelente orientação na realização deste trabalho. Agradeço pela confiança e oportunidade em fazer parte de um grupo tão especial. Aqui pude encontrar uma segunda família que foi primordial para meu crescimento científico e pessoal. Por ser exemplo de força, dedicação e amor pelo trabalho. Pelas sábias palavras e amparo emocional em momentos difíceis e excelentes discussões científicas. Pela energia contagiante. Minha eterna admiração e respeito.*

*Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, pelo apoio e contribuição neste trabalho. Pelas excelentes discussões científicas e ser exemplo de competência e dedicação profissional. Por sempre estar disposto a trocar ideias e seu ânimo contagiante.*

*Ao **Prof. Dr. Renato Hélio Migliorini** (in memoriam) pela fundação do Laboratório do Controle do Metabolismo. Seu excepcional trabalho ficou como nossa maior herança.*

*Ao corpo técnico pelo excelente trabalho dedicado a todos nós. **Maria Antonieta Rissato Garófalo**, pela amizade e apoio durante esses anos. Por seus ensinamentos e paciência durante os experimentos. Pelas conversas animadas, entusiasmo e carinho. “Não importa o quão difícil seja o experimento, o importante é o resultado”. À **Elza Aparecida Filippin**, por todo apoio durante os experimentos, pela amizade, sinceridade e momentos de descontração. Pelo excelente cafezinho que faz toda diferença depois do almoço. À **Neusa Maria Zanon**, pela dedicação e disposição em ajudar, por ensinar várias técnicas cirúrgicas e fazer tudo parecer mais fácil. Pela amizade e conversas animadas. À **Lilian do Carmo Heck**, por ser exemplo de calma e gentileza. Pelo apoio durante os experimentos e compartilhar da emoção quando um resultado esperado é obtido e sempre estar disposta a fazer 1 milhão de géis. Pela amizade e boas risadas. Ao **Victor Diaz Galban** pela disposição em ajudar em questões computacionais e nos cálculos dos experimentos. Pela amizade e histórias engraçadas.*

*Aos amigos que pude ter o prazer de conviver nesses anos **Aline, Karine, Natany, Natalia, Henrique, Letícia, Heitor, Wilian e Dawit**. Pelo companheirismo, amizade sincera e acolhimento em diversos momentos de dúvidas. Pelas ótimas conversas e discussões sobre os experimentos. Por sempre me inspirarem a continuar mesmo quando um experimento dava errado e me acalmarem nos dias de ansiedade. Por serem pessoas íntegras e humildes. Por colaborarem com meu crescimento científico e pessoal e principalmente pelos ótimos momentos de descontração. Vocês são incríveis e sou muito grata por fazer parte desse grupo tão unido.*

*Aos meus queridos professores que tanto me serviram de inspiração para escolher esse caminho. Em especial, à **Profa. Dra. Valéria Ernestânia Chaves**, por todo seu apoio durante a minha iniciação científica e não permitir que eu desistisse durante os momentos de dúvidas. Pela oportunidade de crescer cientificamente e pelas discussões e dicas sobre os experimentos. Pela amizade e por ser uma pessoa verdadeira.*

*A todos os amigos que conquistei em Ribeirão Preto, bioquímicos e fisiologistas. Em especial, à **Mariana Rocha**, que durante esses anos não só dividiu o apartamento comigo mas todos os momentos de alegria e de incertezas. À minha amiga **Thais Marques**, por ser meu exemplo de força e determinação, por ser um poço de simpatia e demonstrar tanto carinho e preocupação. Pelos ótimos momentos de alegria, pelos almoços deliciosos e ótima companhia.*

Aos estimáveis amigos de Divinópolis e Guaxupé, por todo apoio e palavras de incentivo. Por compreenderem minha ausência e serem tão especiais.

*Aos técnicos do departamento de Bioquímica e Fisiologia que tanto me ajudaram na realização deste trabalho ensinando técnicas, manipulando aparelhos ou cuidando do bem-estar dos nossos estimáveis animais. Pelos adoráveis “bom dia” ditos nos corredores e pelo ótimo trabalho. Aos secretários do departamento **Ivone, Ronaldo e Rose**, pelo carinho, respeito e bom humor. Por sempre estarem dispostos a nos ajudar e tirar nossas inúmeras dúvidas administrativas.*

Ao apoio financeiro do CNPq, Capes e Fapesp.

RESUMO

ASSIS, A. P. **Efeito dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato e termogênese do tecido adiposo marrom de ratos.** 2019. 95f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroides capazes de influenciar o metabolismo lipídico no tecido adiposo, podendo tanto levar ao aumento da adiposidade quanto da lipólise, dependendo da localização dos diferentes depósitos de gordura no organismo. Estes hormônios podem aumentar o conteúdo de gordura do tecido adiposo marrom (TAM) e levar à supressão da termogênese por mecanismos ainda pouco esclarecidos. Sabendo que a manutenção das reservas de triacilglicerol (TAG) é de extrema importância para garantir o funcionamento adequado do tecido, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do tratamento com dexametasona, um glicocorticoide sintético, na regulação do metabolismo lipídico, com ênfase nas vias de geração de glicerol-3-fosfato (G3P), bem como avaliar o efeito deste hormônio na capacidade termogênica do TAM. As três vias de geração de G3P foram investigadas: 1) via glicolítica, estimada pela captação de 2-desoxi-1- $[^{14}\text{C}]$ -glicose; 2) via gliceroneogênica, avaliada pela incorporação de 1- $[^{14}\text{C}]$ -piruvato em glicerol-TAG e pela atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK); 3) fosforilação direta do glicerol, avaliada pela atividade e conteúdo da enzima gliceroquinase (GK) e pela velocidade de incorporação de 1- $[^{14}\text{C}]$ -glicerol em lipídios totais. Além disso, foi avaliado o conteúdo proteico de importantes marcadores de atividade e função mitocondrial, tais como proteína desacopladora-1 (UCP-1), *voltage-dependent anion channel* (VDAC), citrato sintase e os complexos da cadeia transportadora de elétrons. Adicionalmente, foram avaliadas a capacidade termogênica e a resposta simpática do TAM, por meio da medida da temperatura e do conteúdo de noradrenalina. Os animais tratados com dexametasona apresentaram perda de peso corporal, acompanhada da perda de massa muscular, hiperglicemia, hiperinsulinemia e atrofia das glândulas adrenais. O TAM apresentou um aumento no conteúdo de gordura total com consequente aumento no peso e mudança fenotípica, adquirindo uma aparência característica de tecido adiposo branco. Esse aumento do conteúdo de gordura foi devido ao desbalanço entre os processos de lipólise e lipogênese. O tratamento induziu uma provável redução na lipólise, acompanhada da redução do conteúdo proteico da lipase hormônio sensível (LHS) fosforilada

e aumentou a atividade de enzimas envolvidas no processo de lipogênese, tais como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e ATP-citrato liase (ACL). O tratamento não alterou a captação de glicose pelo tecido, embora tenha reduzido o conteúdo proteico do transportador de glicose, GLUT4. Adicionalmente, o tratamento não alterou a via gliceroneogênica, uma vez que não houve diferença entre os grupos na incorporação de 1- ^{14}C -piruvato em glicerol-TAG, bem como na atividade e conteúdo proteico da enzima PEPCK, enzima chave desta via. Por outro lado, o tratamento hormonal aumentou a atividade e o conteúdo proteico da enzima GK, enzima que promove a fosforilação direta do glicerol, embora não tenha sido verificado aumento na incorporação de 1- ^{14}C -glicerol em lipídios totais do TAM. Entretanto, foi observado que o tratamento com dexametasona reduziu o conteúdo proteico da AQP7, um transportador específico de glicerol existente na membrana plasmática dos adipócitos. Esses resultados sugerem ser a via de fosforilação direta do glicerol a responsável por manter o suprimento adequado de G3P necessário para a esterificação de AGs e armazenamento de TAG. Este trabalho também demonstrou que o tratamento com dexametasona reduziu o conteúdo proteico de importantes marcadores mitocondriais, como UCP-1, VDAC, citrato sintase e os complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons, sugerindo uma redução na capacidade termogênica do tecido. Essa hipótese foi comprovada pela redução da capacidade do tecido em aumentar a temperatura após estímulo com noradrenalina quando comparados com os animais controles. Além disso, o conteúdo de noradrenalina foi reduzido no tecido dos animais tratados com o GC. Esses resultados sugerem que o tratamento com dexametasona é capaz de reduzir a capacidade termogênica do TAM, tanto por interferir na resposta deste tecido ao estímulo simpático, como por reduzir o estímulo do sistema nervoso simpático (SNS) para o TAM.

Palavras-chave: Tecido adiposo marrom; Glicocorticoides; Glicerol-3-fosfato; Lipogênese; Lipólise; Termogênese.

ABSTRACT

ASSIS, A. P. **Effect of glucocorticoids on the regulation of glycerol-3-phosphate generation pathways and thermogenesis in brown adipose tissue of rats.** 2019. 95f. Dissertation (Masters). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones well known involved in the regulation of lipid metabolism of adipose tissue, leading to an increase or decrease in lipid content, depending on the fat depot location in the body. These hormones increase the fat content of brown adipose tissue (BAT) and suppress thermogenesis by mechanisms still unclear. Considering that the maintenance of the triacylglycerol (TAG) reserves is extremely important to ensure the appropriate function of this tissue, the aim of this study was evaluate the effect of dexamethasone treatment, a synthetic GC, on lipid metabolism regulation, emphasizing the glycerol-3-phosphate (G3P) generation pathways for triacylglycerol (TAG) synthesis, as also its role on BAT thermogenesis of rats. The three pathways of G3P formation were evaluated: 1) glycolytic pathway, estimated by 2-Deoxy-1- ^{14}C -glucose uptake; 2) glyceroneogenic pathway, estimated by 1- ^{14}C -pyruvate incorporation in glycerol-TAG and by phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity; 3) direct phosphorylation of glycerol, estimated by the content and activity of glycerokinase (GK), and by glycerol-U- ^{14}C incorporation in TAG. Moreover, the mitochondrial activity and function were estimated by the protein content of uncoupling protein 1 (UCP-1), voltage-dependent anion channel (VDAC), citrate synthase and electron transport chain complexes. In addition, the thermogenic capacity and the sympathetic response of BAT were evaluated by temperature measurement and noradrenaline content. Dexamethasone treated animals showed body weight loss accompanied by muscle mass loss, hyperglycemia, hyperinsulinemia and adrenal glands atrophy. The BAT showed elevated lipid content with an increase in weight and phenotypic changes. The increase in lipid content was due to an unbalance between lipolysis and lipogenesis. Dexamethasone treatment induced a reduction of lipolysis, accompanied by a decrease in hormone sensitive lipase (HSL) phosphorylation and induced an increase in the lipogenic enzymes activity such as: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and ATP citrate lyase (ACL). The hormonal treatment did not change the glucose uptake rates in BAT, although it reduced the protein content of the glucose transporter – GLUT4. In addition, the treatment did not change the

incorporation of 1-[¹⁴C]-pyruvate in glycerol-TAG as well as the activity and protein content of PEPCK. On the other hand, the treatment increased the activity and the protein content of GK, enzyme which promotes the phosphorylation of glycerol, although there was no increase in glycerol-U-[¹⁴C] incorporation in TAG. Dexamethasone treatment reduced the protein content of AQP7, a specific glycerol transporter expressed in adipocytes membrane. These results suggest that the direct phosphorylation of glycerol by GK could be responsible for the maintenance of adequate supply of G3P required for fatty acid esterification and storage of TAG. This study also demonstrated that dexamethasone treatment reduced the protein content of mitochondrial markers such as UCP-1, VDAC, citrate synthase and electron transport chain complexes I, II e IV, suggesting a reduction in the thermogenic capacity of this tissue. This hypothesis was corroborated with the reduction of tissue capacity to increase the temperature after noradrenaline stimulation, compared with control group. Furthermore, noradrenaline content in BAT of dexamethasone-treated animals was reduced. These results suggest that dexamethasone treatment is able to reduce the thermogenic capacity by interfering in BAT response to the sympathetic stimuli, or also reducing the sympathetic stimuli to the BAT.

Keywords: Brown adipose tissue; Glucocorticoids; Glycerol-3-phosphate; Lipogenesis; Lipolysis; Thermogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC - Acetil-CoA carboxilase
ACL - ATP-citrato liase
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico
AGs - Ácidos graxos
AGS - Ácido graxo sintase
Akt – Proteína quinase B
AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
AQP7 - Aquagliceroporina 7
11 β -HSDs - 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase
CBG - Globulina transportadora de corticosteroides
CRE - *Cyclic AMP responsive element*
CREB - *cAMP response element-binding*
CRH - Hormônio liberador de corticotrofina
EDL - *Extensor Digitorum Longus*
EPI - Tecido adiposo epididimal
Foxo - *forkhead box class o*
G3P - Glicerol-3-fosfato
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase
GK - Gliceroquinase
GRs - Receptor de glicocorticoide
HCHL- Dieta hipercalórica e hiperlipídica
HP - Dieta hiperproteica livre de carboidratos
HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC - Cromatógrafo líquido de alta eficiência
HSP - Proteínas de choque térmico
IGF-1 - *Insulin-like growth factor-I*
LHS - Lipase hormônio sensível

LPL - Lipase lipoproteica

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 α - Coativador-1 do receptor- γ ativado pelo proliferador de peroxissomo

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PKA - Proteína quinase dependente de AMPc

PPAR γ - Proliferador de peroxissomo gama

PPRE - Proliferador de peroxissomo

RETRO - Tecido adiposo retroperitoneal

RXR α - Receptores X retinóides alfa

SNS - Sistema nervoso simpático

TAB - Tecido adiposo branco

TAG - Triacilglicerol

TAM - Tecido adiposo marrom

UCP-1 - Proteína desacopladora 1

VDAC - *Voltage-dependent anion channel*

VLDL - Lipoproteínas de muito baixo densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Tecido adiposo marrom.....	17
1.2 Glicocorticoides	23
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais e tratamento	31
3.2 Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina, ácidos graxos livres e glicerol.....	32
3.3 Determinação do conteúdo de lipídios e proteínas totais	32
3.4 Análise histológica.....	33
3.5 Determinação do conteúdo de noradrenalina	33
3.6 Determinação da temperatura.....	34
3.7 Lipólise em fragmentos de TAM	34
3.8 Captação de glicose em fragmentos de TAM	34
3.9 Incorporação de 1-[¹⁴C]-piruvato e glicerol-U-[¹⁴C] em fração glicerol de TAG em fragmentos de TAM	35
3.10 Medida da atividade das enzimas	36
3.10.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.....	36
3.10.2 Gliceroquinase	37
3.10.3 Enzimas associadas à lipogênese	38
☐ Glicose-6P-desidrogenase	38
☐ ATP-citrato-liase	39
3.11 Análise das proteínas por <i>Western blot</i>	40
3.12 Análise estatística	41
4. RESULTADOS	43
4.1 Caracterização do modelo experimental	43
4.2 Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina, ácidos graxos livres e glicerol.....	46
4.3 Peso, conteúdo de gordura e proteína total do TAM.....	49
4.4 Peso dos músculos Tibial anterior, EDL e Soleus	51
4.5 Atividade lipogênica.....	52
4.6 Avaliação da via glicolítica em fragmentos de TAM	54
4.6.1 Índice de captação de glicose.....	54

4.7 Avaliação da via gliceroneogênica em fragmentos de TAM	55
4.7.1 Incorporação de 1-[¹⁴C]-piruvato na fração glicerol de TAG.....	55
4.7.2 Atividade da PEPCK	56
4.8 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol em fragmentos de TAM..	58
4.8.1 Atividade da Gliceroquinase	58
4.8.2 Incorporação de glicerol-U-[¹⁴C] em lipídios totais em fragmentos de TAM...	59
4.9 Lipólise	61
4.10 Avaliação do conteúdo de proteínas mitocondriais	63
4.11 Temperatura do TAM após estímulo com noradrenalina	69
4.12 Determinação do conteúdo de noradrenalina no TAM.....	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo marrom (TAM) está presente e ativo em humanos adultos com todas as características morfológicas e fisiológicas descritas em pequenos roedores (CYPESS et al., 2009), contrariando a ideia inicial de que estaria presente apenas em humanos recém-nascidos, sendo então rapidamente perdido nos primeiros anos de vida. Essa descoberta despertou novamente o interesse das investigações científicas para este tecido.

Os maiores depósitos de TAM em humanos adultos estão localizados no pescoço e na região supraclavicular e, em menores quantidades ao longo da coluna espinal, na área periaórtica e perirenal (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007). Em roedores, modelo amplamente utilizado em estudos envolvendo o TAM, os depósitos se encontram distribuídos nas regiões cervical, axilar, periaórtica, perirenal e interescapular, sendo este último o maior deles e o mais estudado (HIMMS-HAGEN, 1984).

O TAM é constituído por células multiloculares caracterizadas pela presença de várias pequenas gotículas lipídicas contendo triacilglicerol (TAG) e um grande número de mitocôndrias (CANNON; NEDERGAARD, 2004b). A produção de calor pelas células adiposas marrons deve-se à intensa atividade metabólica das mitocôndrias que expressam na membrana interna uma proteína chamada termogenina ou proteína desacopladora 1 (UCP-1). A UCP-1 é específica deste tecido e quando ativada promove o desacoplamento do gradiente de prótons entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, reduzindo a eficiência da síntese de ATP e aumentando a produção de calor (JÉQUIER; TAPPY, 1999). Essa função confere ao TAM o importante papel de ser o principal sítio de termogênese facultativa induzida pela dieta (*diet-induced thermogenesis*) e de termogênese adaptativa independente de tremores (*non-shivering thermogenesis*).

O TAM é um tecido ricamente vascularizado e essa característica permite uma oferta adequada de oxigênio e substratos ao tecido e o rápido transporte do calor produzido aos outros órgãos em situações de alta atividade termogênica (CANNON; NEDERGAARD, 2004b). Além disso, os adipócitos marrons recebem uma rica inervação simpática direta. Os impulsos aferentes relacionados ao controle da temperatura, do estado alimentar e do estado energético corpóreo são integrados no hipotálamo e os impulsos eferentes são emitidos via fibras simpáticas que diretamente inervam o TAM (CANNON; HOUSTEK; NEDERGAARD, 1998). As células neurais responsáveis pela inervação do TAM podem ser encontradas, por exemplo, em várias áreas hipotalâmicas, tais como núcleo paraventricular, núcleo arqueado, núcleo

dorsomedial, área preóptica e hipotálamo lateral (MORRISON, 2004).

A biogênese mitocondrial e o aumento da síntese de UCP-1 são marcadores de termogênese no TAM e estes processos podem diminuir ou aumentar em resposta à redução ou aumento da atividade simpática, respectivamente (HIMMS-HAGEN, 1989a).

A diminuição da atividade simpática para o TAM, como ocorre durante a restrição calórica ou jejum (HAYASHI; NAGASAKA, 1983), dieta hiperproteica livre de carboidratos (BRITO et al., 1999) e desnervação simpática (CHAVES et al., 2008) induz a atrofia e diminuição da produção de calor pelo tecido. A função do TAM também decresce com a obesidade e o envelhecimento, ganhando uma aparência de tecido adiposo branco (TAB) e, este declínio está associado com diversas disfunções metabólicas e ganho de peso (SHIMIZU; WALSH, 2015). Nessas circunstâncias, há uma redução do número de adipócitos marrons e mitocôndrias, do conteúdo proteico total e mitocondrial e do conteúdo de UCP-1, que, em conjunto, resultam na redução da massa tecidual e da capacidade termogênica do TAM. Por outro lado, a resistência à obesidade está relacionada à maior ativação funcional do TAM, visto que, a superexpressão de UCP-1 em camundongos é capaz de promover a redução de peso corporal, mesmo em animais com alimentação *ad libitum* (KOZAK; HARPER, 2000).

Já o aumento do estímulo simpático para o TAM induz hipertrofia no tecido em diferentes situações fisiológicas, tais como exposição ao frio (MORENO et al., 1994; PRZYGODDA, 2016), dieta cafeteria (CHAVES et al., 2008) e dieta hipoproteica com alta concentração de carboidratos (DE FRANÇA et al., 2016). Em situações de alta atividade termogênica, a liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos desempenha um papel primário no controle da termogênese no TAM. Tal evento culmina na interação da noradrenalina com os receptores β -adrenérgicos (sub-tipo β_3) acoplados à proteína Gs, levando à ativação da enzima adenilato ciclase, ao aumento do conteúdo intracelular do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) que, por sua vez, é capaz de fosforilar proteínas citosólicas envolvidas com a ativação da lipólise, tais como a lipase hormônio sensível (LHS) e a perilipina. Uma vez ativada, a LHS promove aumento da hidrólise do TAG das gotículas de gordura dos adipócitos, fornecendo suprimento de ácidos graxos (AGs), os quais são conduzidos para a mitocôndria e atuam como substrato para a produção de calor e ativadores da UCP-1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004b).

O mecanismo pelo qual os AGs estimulam a termogênese ainda não está completamente esclarecido. Existem duas hipóteses, a primeira é a de que os AGs funcionam como ativadores alostéricos da UCP-1 e a segunda, é que a UCP-1 age como transportadora de AGs para o

espaço intermembrana mitocondrial, permitindo que estes se tornem protonados e retornem livremente à matriz mitocondrial. Assim, os prótons retornam à matriz sem serem utilizados para a síntese de ATP e a energia é liberada como calor (CANNON; HOUSTEK; NEDERGAARD, 1998). Dessa forma, durante o processo de ativação da termogênese no TAM, a hidrólise dos TAGs armazenados no tecido para a produção de AGs é considerada uma etapa importante, tornando fundamental a manutenção de reservas adequadas de TAG para garantir o funcionamento normal do tecido, já que os AGs são os substratos metabólicos oxidados para a produção de calor.

Em paralelo, a estimulação da via β 3-adrenérgica/AMPC ativa fatores e cofatores de transcrição que estimulam a transcrição de genes envolvidos na termogênese e biogênese mitocondrial resultando no aumento da capacidade termogênica do TAM. O fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding*), quando fosforilado em resíduo de serina¹³³ pela PKA, estimula a transcrição gênica da UCP-1 que contem em sua região promotora o elemento de resposta ao AMPC (CRE – *cyclic AMP responsive element*) (BARTNESS; VAUGHAN; SONG, 2010). Adicionalmente, ocorre o aumento da expressão do coativador-1 do receptor- γ ativado pelo proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) que coordena a transcrição de genes envolvidos na termogênese e na biogênese mitocondrial, tais como os genes que codificam enzimas mitocondriais da oxidação de ácidos graxos, subunidades da citocromo c oxidase, ATP sintase da cadeia respiratória e a UCP-1 (CROWLEY; YEO; O'RAHILLY, 2002).

O estudo do metabolismo lipídico do TAM em nosso laboratório teve início a partir da interessante observação de que ratos Wistar alimentados com a dieta hiperproteica (HP) livre de carboidratos, durante 20 dias, apresentaram redução do peso do TAM e redução na concentração de lipídios totais do tecido, embora não tenham apresentado diferença no consumo alimentar e no ganho de peso corporal (KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1985; BRITO et al., 1999). Esses achados foram associados à redução da capacidade funcional do tecido, demonstrada pela menor atividade da citocromo oxidase, menor resposta termogênica à infusão de noradrenalina e velocidade de renovação de noradrenalina (BRITO, 1992). Além disso, o TAM desses animais também apresentou redução na lipogênese *in vivo*, vista pela redução na incorporação de $^3\text{H}_2\text{O}$ e [^{14}C]-glicose em ácidos graxos de TAG, bem como redução na atividade de várias enzimas lipogênicas, tais como glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima málica, ATP-citrato liase (ACL) e acetil-CoA carboxilase (ACC) (BRITO et al., 1999).

Ao submeter esses animais ao frio (4 °C) por 10 dias foi possível observar um aumento no peso do TAM, na síntese *de novo* de AG *in vivo* e na atividade das enzimas ACC e do

complexo piruvato desidrogenase. Dessa forma, o maior fluxo simpático para o TAM induz hiperplasia no tecido e estimula a lipogênese mesmo em um tecido com capacidade termogênica reduzida (MOURA et al., 2001).

A substituição da dieta HP pela dieta balanceada, elevando os níveis plasmáticos de insulina para valores normais, reestabelece completamente a síntese de AG e parcialmente a atividade de enzimas relacionadas à lipogênese no TAM. Entretanto, a desnervação simpática unilateral do TAM prejudica esta restauração. Além disso, ao tratar esses animais com soro anti-insulina foi possível notar um bloqueio total da restauração da lipogênese do TAM em ambos os lobos, innervado e desnervado (KAWASHITA et al., 2002b), sugerindo que o TAM é capaz de manter significativa taxa de lipogênese na ausência do estímulo simpático, mas não na ausência de insulina.

Notavelmente, o aumento da oxidação dos AGs e da atividade termogênica do TAM é acompanhado pelo aumento da lipogênese. Como citado anteriormente, a manutenção das reservas de TAG é de extrema importância para garantir o funcionamento adequado do TAM. A síntese e o armazenamento de TAG dependem de um fornecimento adequado de glicerol-3-fosfato (G3P), necessários para a esterificação de AGs sintetizados *de novo* pelo tecido ou pré-formados {reciclados após hidrólise dos TAG endógenos ou captados da circulação através da hidrólise dos TAGs presentes nos quilomicrons e nas lipoproteínas de muito baixo densidade (VLDL) pela atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL)}.

Assim como no TAB, o TAM também apresenta três vias conhecidas para geração de G3P (Figura 1), sendo elas: 1) via glicolítica, estimada pela captação de glicose; 2) via gliceroneogênica, via que gera G3P a partir de compostos não glicídicos como piruvato, lactato e aminoácidos glicogênicos. Esta via envolve a carboxilação do piruvato a oxaloacetato, a descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e a subsequente formação de G3P por uma reversão parcial da via glicolítica, sendo a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) a enzima chave desta via; 3) via da fosforilação direta do glicerol pela enzima gliceroquinase (GK), em que o glicerol pode ser reciclado após a hidrólise do TAG endógeno ou captado da circulação, gerando G3P.

Figura 1: Representação esquemática das vias de geração de glicerol-3-fosfato no TAM.

Estudos demonstraram que a utilização de glicose pelo TAM é controlada diretamente pela insulina e pelo sistema nervoso simpático (SNS) (HIMMS-HAGEN, 1989b; SHIMIZU; NIKAMI; SAITO2, 1991). Em animais adaptados à dieta HP, a captação de glicose e o conteúdo do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4) encontram-se diminuídos. A substituição dessa dieta por uma dieta balanceada, durante 24 horas, foi capaz de restaurar a captação de glicose no TAM (KAWASHITA et al., 2002b). Por outro lado, em animais submetidos à dieta cafeteria durante 24 dias, um modelo em que os animais apresentam altos níveis de insulina e um aumento na ativação simpática do TAM, é possível observar maior captação de glicose pelo tecido (CHAVES et al., 2008).

Estudos do nosso laboratório demonstraram pela primeira vez a importância *in vivo* da gliceroneogênese para a síntese de G3P no TAM, verificando que esta via se encontra muito ativa no TAM de animais alimentados com dieta balanceada e aumenta, juntamente com a atividade da PEPCK, em animais adaptados à dieta HP (BRITO et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a gliceroneogênese também se encontra ativa no TAM de animais submetidos ao jejum e no diabetes (FESTUCCIA et al., 2003a). Esses resultados sugerem que a gliceroneogênese no TAM é sensível à disponibilidade de glicose, ou seja, essa via parece ser

estimulada para compensar a reduzida síntese de G3P a partir da hexose.

Os primeiros estudos envolvendo o controle do processo de fosforilação direta do glicerol no TAM demonstraram que a administração de glicose, insulina e glicerol, foi capaz de aumentar a atividade da GK no TAM de ratos (PERSICO; CERCHIO; JEFFAY, 1975). Estudos do nosso laboratório demonstraram que tanto a atividade como a expressão gênica da GK no TAM estão sob controle do SNS (KAWASHITA et al., 2002b; FESTUCCIA et al., 2003b). Além disso, a atividade da GK diminui drasticamente após a desnervação do tecido (KAWASHITA et al., 2002b) e aumenta em situações como a exposição ao frio (BRITO et al., 1998) e dieta cafeteria (CHAVES et al., 2008), em que ocorre aumento do fluxo simpático para o tecido. Efeitos semelhantes, relacionados ao aumento da atividade e expressão da GK no TAM, também foram observados após infusão de noradrenalina ou de agonistas β -adrenérgicos, sendo estes efeitos inibidos por antagonistas β -adrenérgicos (FESTUCCIA et al., 2003b).

Além da regulação central, fatores nutricionais e hormonais, tais como insulina, hormônios tireoidianos e **os glicocorticoides**, podem regular a atividade termogênica do TAM. Há evidências de que o excesso de glicocorticoides é capaz de reduzir a expressão e o conteúdo proteico da UCP-1 e, reduzir a expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial. Além disso, foi demonstrado também que este hormônio promove o aumento do peso do tecido e, este aumento é devido ao maior acúmulo de lipídios (DOIG et al., 2017). Apesar das vias de geração de G3P terem sido investigadas em diferentes situações experimentais como desnervação simpática (KAWASHITA et al., 2002b), jejum e diabetes (FESTUCCIA et al., 2003a) e a adaptação à dieta HP (BRITO et al., 1999), modelos capazes de promover a diminuição da atividade termogênica do TAM e, em situações como exposição ao frio (MOURA et al., 2001) e dieta cafeteria (CHAVES et al., 2012), em que ocorre o aumento do estímulo simpático para tecido, **ainda é desconhecido o papel dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de G3P para a formação de TAG e ainda pouco esclarecido seu papel na termogênese do TAM.**

1.2 Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroides derivados do colesterol, sintetizados e secretados por células da zona fasciculada do córtex da glândula adrenal. Quando presentes em níveis normais, exercem diversas ações fisiológicas participando na regulação do metabolismo energético, na função imunológica, metabolismo hídrico e eletrolítico e no controle da pressão arterial sistêmica. Sob situações de estresse, atuam sobre o metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, disponibilizando substratos para o metabolismo oxidativo (ANDREWS; WALKER, 1999).

A concentração de GCs circulantes é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e influenciada por diferentes fatores como o ritmo circadiano, estresse como exposição ao frio, condições nutricionais como jejum, e patologias como tumores adrenocorticais. Os GCs podem controlar suas ações fisiológicas pela retroalimentação negativa. Quando presentes em altas concentrações estes hormônios reduzem a síntese e secreção de hormônios liberadores hipotalâmicos (Hormônio Liberador de Corticotrofina – CRH) e hipofisários (Hormônio Adrenocorticotrófico – ACTH) (Figura 2) (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Alterações nas concentrações dos hormônios esteroides podem resultar em condições patológicas no homem, tais como Síndrome de Cushing (hipercortisolemia) e doença de Addison (hipocortisolemia). Os GCs sintéticos, como dexametasona, são fármacos bastante utilizados, possuindo um amplo espectro de indicações terapêuticas principalmente para o tratamento de condições inflamatórias, como artrite reumatoide, asma, alergias e doenças autoimunes (VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007).

Em humanos, a forma biologicamente ativa do GC é o cortisol livre que circula no plasma em três estados: 1) 5 a 10% circulam livres; 2) 6 a 10% ligado à albumina; 3) 80% ligados reversivelmente à globulina transportadora de corticosteroides (CBG) (YANG; ZHANG, 2004). O cortisol livre pode se difundir pela membrana celular e interagir com seus receptores intracelulares. Dessa forma, as proteínas plasmáticas, CBG e albumina, constituem um sistema tampão para as concentrações de cortisol livre e permite variações fisiológicas nas concentrações de cortisol plasmático livre ao longo do ciclo circadiano (ANDREWS; WALKER, 1999). Os GCs sintéticos circulam livremente, sem interação com proteínas plasmáticas, permitindo menor variabilidade e maior disponibilidade nas concentrações plasmáticas (HABER; WEINSTEIN, 1992).

Figura 2: Regulação da secreção dos glicocorticoides pelo eixo HPA. Fonte: (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

A ação local dos GCs é dependente de seu metabolismo intracelular mediado pelas enzimas 11β -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 1 e 2 (11β -HSDs). Em condições fisiológicas, a 11β -HSD do tipo 1 promove a conversão da cortisona (estado inativo) em cortisol (estado ativo), aumentando as concentrações no tecido (YANG; ZHANG, 2004), enquanto que a do tipo 2 promove a inativação do cortisol. A dexametasona não é susceptível à inativação pela enzima 11β -HSD2 e, portanto, tem maior biodisponibilidade.

A ação dos GCs também é mediada pelo receptor de glicocorticoide (GRs). Na ausência do GC, os GRs estão localizados primariamente no citosol, onde permanecem inativos, associados à proteínas de choque térmico (HSP), como HSP90 e HSP70, permitindo ao receptor adquirir uma conformação tridimensional adequada para a sua ligação ao hormônio. O GR possui alta afinidade ao cortisol e o acoplamento do GC ao receptor induz uma sequência de

eventos intracelulares que resulta na dissociação das HSPs com a posterior translocação do GR ao núcleo (GUPTA; LALCHHANDAMA, 2002). Portanto, a ação dos GC nos tecidos alvos é dependente da concentração de GC circulante, do metabolismo intracelular tecido-específico dos GCs pelas 11 β -HSD e da expressão celular dos GRs.

Diversos estudos em modelos animais tem demonstrado que a administração de GC está associada com alterações metabólicas, tais como obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão (ROSE; HERZIG, 2013). Além disso, perda de massa muscular (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008; SCHAKMAN et al., 2013), redução do peso corporal (CHIMIN et al., 2014; FERREIRA et al., 2017) acompanhada pela redução no consumo alimentar (WON JAHNG et al., 2008) e alteração do conteúdo lipídico (DOIG et al., 2017; FERREIRA et al., 2017) também são observados após o tratamento com dexametasona.

Os GCs influenciam o metabolismo lipídico no tecido adiposo, podendo tanto levar ao aumento da lipólise quanto aumentar a adiposidade, dependendo da localização dos diferentes depósitos de gordura no organismo. A administração de doses excessivas de GCs promovem aumento dos depósitos de gordura, principalmente, no tecido adiposo visceral, como TAB retroperitoneal (RETRO) e no TAB epididimal (EPI) (FERREIRA et al., 2017), podendo ser potencializado pela ação da insulina. Tal efeito não é observado em tecidos adiposos localizados em outras regiões, como no subcutâneo (CHIMIN et al., 2014).

Por influenciarem o metabolismo lipídico, os GCs exercem efeito determinante sobre o armazenamento de TAG, que é dependente de um fornecimento adequado de G3P. Estudos demonstraram que os GCs podem regular as vias de geração de G3P. A atividade transcricional da PEPCK, enzima chave da via gliceroneogênica, bem como a regulação da expressão gênica desta enzima pelos GCs é tecido específica. No fígado, os GCs estimulam a transcrição gênica da PEPCK (XU et al., 2009), enquanto que em adipócitos do tecido omental incubados com dexametasona por 4 horas, houve uma redução de aproximadamente 80% no conteúdo da mesma (SELTZER et al., 1985). Outro estudo demonstrou em adipócitos brancos de ratos, após tratamento crônico com dexametasona, um aumento na expressão da PEPCK (SELTZER et al., 1985).

Um estudo recente do nosso laboratório demonstrou que os GCs influenciam de forma distinta as vias de geração de G3P nos depósitos de TAB RETRO e EPI, embora ambos tenham localização visceral. Animais tratados com dexametasona apresentaram maior atividade da via gliceroneogênica no TAB RETRO, quantificada pela maior incorporação de piruvato na fração glicerol de TAG e maior atividade da PEPCK. Interessante, que no TAB EPI, a via responsável pela geração de G3P e a manutenção dos estoques de TAG foi a fosforilação direta do glicerol,

sugerida pelas medidas da maior atividade da enzima GK e maior incorporação de glicerol na fração glicerol de TAG. Além disso, foi observada maior síntese *de novo* de ácidos graxos em ambos os tecidos após o tratamento (FERREIRA et al., 2017)

Os GCs também diminuem a utilização periférica de glicose por inibirem o transporte de glicose para o interior das células. Quando o cortisol está em excesso, este exerce papel contrário ao da insulina, inibindo o efeito estimulador deste hormônio na captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo (HABER; WEINSTEIN, 1992; SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008; PASIEKA; RAFACHO, 2016).

No TAM tem sido demonstrado que os glicocorticoides promovem aumento do peso do tecido e, este aumento é devido ao maior acúmulo de lipídios (DOIG et al., 2017). No entanto, ainda é **desconhecido** o papel dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de G3P para a formação de TAG, bem como seu papel na síntese AGs no TAM. Dessa forma, sabendo da importância da manutenção dos estoques de TAG no TAM para sua adequada função, nossa **hipótese** é que os GCs regulam o metabolismo de lipídios do TAM, aumentando a lipogênese e reduzindo a lipólise, levando ao aumento de TAG neste tecido. Além disso, os GCs apresentam um papel na regulação das vias de geração de G3P para formação de TAG.

Além de alterar o metabolismo lipídico no TAM, alguns estudos demonstraram que o excesso de GCs pode suprimir a atividade termogênica do tecido (SOUMANO et al., 2000; STRACK; BRADBURY; DALLMAN, 2017). Tal efeito pode estar relacionado com a diminuição da atividade e função mitocondrial do tecido, visto que a expressão gênica e o conteúdo proteico de diversos marcadores mitocondriais como UCP-1, PGC-1 α e proteínas do complexo da cadeia transportadora de elétrons, tais como ATP sintase, NADH desidrogenase e succinato desidrogenase, se encontram reduzidos após o tratamento com o glicocorticoide, observados tanto *in vivo* como em cultura primária de adipócitos marrons. Além disso, o tratamento reduziu o consumo de oxigênio e a produção de ATP nestes adipócitos, bem como reduziu o número de cópias de DNA mitocondrial (POGGIOLI et al., 2013; DOIG et al., 2017; STRACK; BRADBURY; DALLMAN, 2017).

Os GCs apresentam efeitos complexos na termogênese do TAM. O excesso de GCs parece inibir o estímulo simpático por meio da inibição da expressão e função dos receptores β -adrenérgicos (FÈVE et al., 1992). No entanto, outro estudo sugeriu que os GCs não afetam diretamente os receptores β -adrenérgicos no TAM e que os efeitos deste hormônio seriam mediados pela redução da produção do CRH no hipotálamo, culminando assim na perda do estímulo para a atividade do SNS ao TAM (HIMMS-HAGEN, 1989a). Além disso, foi demonstrado que uma microinjeção de CRH no núcleo paraventricular hipotalâmico foi capaz

de ativar a termogênese do TAM por meio da ativação do SNS (LEFEUVRE; ROTHWELL; STOCK, 1987).

Entretanto, os mecanismos pelos quais este hormônio pode levar a redução da capacidade termogênica do tecido ainda são poucos conhecidos e apresentam controvérsias. Neste sentido, nossa **hipótese** é que os GCs regulam a função mitocondrial reduzindo a termogênese deste tecido.

Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi verificar o efeito dos GCs na regulação do metabolismo lipídico, com ênfase nas vias de geração de G3P, bem como avaliar o efeito deste hormônio na capacidade termogênica do TAM.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como principal objetivo investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide no metabolismo de lipídios do TAM, com ênfase sobre as vias de geração de G3P e seu papel sobre a termogênese do tecido.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide por 7 dias no peso e conteúdo lipídico do TAM de ratos;
- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide na lipogênese do TAM, estimada pela atividade de enzimas envolvidas na síntese de AGs, tais como G6PDH e ACL;
- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide na lipólise do TAM;
- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide no controle das 3 vias de geração de G3P no TAM: 1. **via glicolítica**, por meio da captação de 2-desoxi-1- $[^{14}\text{C}]$ -D-glicose; 2. **via gliceroneogênica**, por meio da velocidade de incorporação de 1- $[^{14}\text{C}]$ -piruvato em fração glicerol de TAG e atividade da enzima PEPCCK; 3. **fosforilação direta glicerol**, por meio da atividade da enzima GK, assim como pela incorporação de 1- $[^{14}\text{C}]$ -glicerol em lipídios totais.
- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide na capacidade termogênica do TAM. Para isso foram avaliados o conteúdo proteico de importantes marcadores da termogênese e função mitocondrial do TAM, tais como UCP-1, *voltage-dependent anion channel* (VDAC), citrato sintase e proteínas do complexo da cadeia transportadora de elétrons (*OxPhos*).
- Investigar o efeito do tratamento com glicocorticoide sobre o conteúdo de noradrenalina e temperatura do TAM, afim de demonstrar se este hormônio é capaz de influenciar a resposta do tecido ao SNS.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* ($n = 6$ a 12 /experimento), entre 6 a 7 semanas de idade e peso inicial variando de 180 a 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos no biotério central da FMRP-USP localizado no departamento de Fisiologia, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e acesso à ração comercial balanceada própria para roedores (NUVLAB CR1, NUVITAL®) e água *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos nestas condições por pelo menos 24 horas antes de iniciar o tratamento. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP (Protocolo nº 195/2018). Após o período de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

1. **Grupo Controle:** os animais receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% (1 mL.kg^{-1}) durante 7 dias consecutivos.
2. **Grupo Dexa:** os animais receberam injeção intraperitoneal de fosfato de dexametasona Sigma® (1 mg.kg^{-1}) de volume igual aos controles, durante 7 dias consecutivos.

Os procedimentos experimentais foram realizados no oitavo dia entre 8h e 9h da manhã e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, exceto os animais destinados à coleta de sangue que foram eutanasiados por decapitação (Figura 3). O TAM foi cuidadosamente dissecado em placa de Petri sobre gelo para remoção dos tecidos adjacentes, embalados em papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posteriores determinações do conteúdo proteico por western blot. Para alguns experimentos, o TAM foi utilizado a fresco, imediatamente após ser removido e dissecado.

Figura 3: Representação esquemática do tratamento.

3.2 Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina, ácidos graxos livres e glicerol

A glicemia foi mensurada após os 7 dias de tratamento utilizando fitas de dosagem e glicosímetro da *Accu-Check Active* em uma pequena gota de sangue retirada da cauda dos animais. Para as dosagens séricas, o sangue dos animais após serem eutanasiados por decapitação foi coletado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. A concentração de insulina foi determinada por kit comercial Rat/Mouse Insulin ELISA Kit – Millipore®. A concentração de ácidos graxos livres foi determinada por kit comercial NEFA - RANDOX®. A concentração de glicerol foi determinada por kit comercial glicerol - BIOCLIN®.

3.3 Determinação do conteúdo de lipídios e proteínas totais

A extração dos lipídios totais do TAM de ambos os grupos experimentais foi realizada pelo método de Folch, Lees e Sloane Stanley (1957), onde todo o tecido foi retirado, pesado e colocado em clorofórmio:metanol (2:1), sendo posteriormente homogeneizado e o volume completado para 10 mL. Em seguida, o material foi filtrado utilizando papel Whatman nº 1 e ao filtrado foi adicionado água Milli-Q no volume de 10:2, ou seja, para cada 8 mL do filtrado foram adicionados 1,6 mL de água Milli-Q. Após a separação da fase clorofórmica e aquosa, toda fase clorofórmica foi transferida para tubos previamente pesados para evaporação. A quantificação da gordura foi determinada por método gravimétrico. A extração das proteínas totais do TAM de ambos os grupos experimentais foi realizada utilizando tampão RIPA (pH 7,4) em volume 6x o peso do tecido, contendo Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, Deoxicolato de sódio 1% e SDS 0,1% acrescido dos inibidores de proteases aprotinina 5 µg/mL, PMSF 1 mM e leupeptina 1 µg/mL e dos inibidores de fosfatases, ortovanadato de sódio 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 100 mM, adicionados imediatamente antes do uso do tampão. O tecido foi homogeneizado em Tissue Lyzer, sob agitação máxima por 2 minutos. Em seguida, o homogenado foi centrifugado a 14000 rpm, 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado para determinação da quantidade de proteínas totais. A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al., (1951) e medida espectrofotometricamente a 660 nm.

3.4 Análise histológica

O tecido foi cortado cuidadosamente em um fragmento de aproximadamente 1 cm² e colocado sobre um cassete próprio para cortes em parafina. O cassete foi mantido imerso em béquer contendo paraformaldeído 4% por 48 horas. Após o período de 48 horas, o cassete foi transferido para outro béquer contendo álcool 70°, onde permaneceu por mais 48 horas. Posteriormente, foram realizadas passagens em álcool com grau crescente, sendo que o cassete permaneceu aproximadamente 45 minutos em cada (processo responsável por desidratar o tecido). Após permanecerem *overnight* em álcool 100°, os cassetes foram submetidos a inclusão em xilol (processo responsável por diafanizar o tecido) realizadas em 3 etapas: xilol I, xilol II e xilol III, permanecendo aproximadamente 45 minutos em cada. Em seguida, os tecidos foram incluídos em parafina e cortados em espessura de 3 µm para posterior coloração.

As lâminas com os cortes foram submetidas à desparafinização, com passagens rápidas em xilol, e hidratação, com passagens rápidas em álcool 100°, álcool 95°, álcool 70°. Em seguida, foram coradas com hematoxilina, que apresenta coloração azul-púrpura e é responsável pela coloração de ácidos nucleicos e, eosina com coloração rosa e é responsável por corar proteínas não específicas no citoplasma e matriz extracelular (FISCHER et al., 2008).

3.5 Determinação do conteúdo de noradrenalina

O tecido foi homogeneizado em 5 mL de tampão contendo ácido perclórico 0,2 N com EDTA 1 mM e metabissulfito de sódio 1% como antioxidantes. O homogenado foi centrifugado a 5000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (4 mL) foi transferido para tubos de polietileno e foram adicionadas 50 mg de alumina ativada, 1 mL de tampão Tris 2 M pH 8,9, contendo 0,5% de metabissulfito de sódio e 2,5% de EDTA e 20 µL do padrão interno bromidrato de 3,4-diidroxibenzilamina diluído 8 vezes. Os tubos foram agitados fortemente por 20 minutos em banho a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba à vácuo e a alumina foi lavada duas vezes com 3 mL de solução lavadora contendo EDTA 20 mM, Tris 2 M e metabissulfito de sódio 20%. Após cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. As catecolaminas foram eluídas da alumina por agitação com 800 µL de ácido perclórico 0,1 N durante 10 minutos. A noradrenalina foi dosada com a ajuda de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Proeminence da SHIMADZU com detector eletroquímico Decade Lite, como descrito por Garófalo et al., (1996).

3.6 Determinação da temperatura

Os animais foram anestesiados com mistura de cloridrato de cetamina e xilazina (cetamina 100 mg/kg; xilazina 10 mg/kg de massa corporal de rato) com injeção intraperitoneal (100 µL/100 g) e o tecido adiposo marrom interescapular foi divulsionado na região central no sentido cauda-cranial para inserção do transponder, o qual foi preso na musculatura subjacente por um ponto. Imediatamente após a inserção do transponder, a temperatura basal foi mensurada. Em seguida, foi injetada noradrenalina (20 µg/ 100g de peso corporal) via veia jugular e a temperatura do tecido mensurada de minuto a minuto até a temperatura basal ser reestabelecida. Para mensurar a temperatura no tecido, foi utilizado o sistema de aquisição de dados Bio Medic Data System DAS-6002 por meio de frequências de rádio emitidas pelos sensores (IPTT-3000, BMDs Co.). Tais frequências foram lidas pela sonda receptora (SP-6005) móvel e a identificação e a temperatura do sensor lidas em unidade grau Celsius (°C). A temperatura corporal foi acompanhada utilizando-se um termômetro por via retal.

3.7 Lipólise em fragmentos de TAM

O tecido foi cortado em pequenos fragmentos utilizando um Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co.LTD.) e aproximadamente 100 mg foram pré-incubados em 1 mL de tampão Krebs-Hepes (pH 7,3) acrescido de glicose 5 mM e CaCl₂ 1,62% 83 mM durante 15 minutos. Posteriormente, esses fragmentos foram incubados no mesmo tampão em banho a 37°C sob agitação contínua durante 1 hora. A reação foi interrompida submetendo os tubos de reações a choque térmico, colocando-os imediatamente em gelo. A lipólise basal foi estimada pela concentração de glicerol e de ácidos graxos livres liberados para o meio de incubação. A concentração de ácidos graxos livres foi determinada por kit comercial NEFA - RANDOX® e medida espectrofotometricamente a 550 nm. A concentração de glicerol foi determinada por kit comercial glicerol - BIOCLIN® e medida espectrofotometricamente a 500 nm.

3.8 Captação de glicose em fragmentos de TAM

A captação de glicose foi estimada usando a 2-desoxi-1-[¹⁴C]-glicose. A 2-desoxiglicose é transportada para dentro das células pelos mesmos transportadores de glicose e compete com a glicose pelo sítio ativo da hexoquinase, sendo então fosforilada a 2-desoxiglicose-6-fosfato.

No entanto esta não é substrato das enzimas fosfoglicoisomerase e glicose-6-fosfato desidrogenase (HORTON; MELDRUM; BACHELARD, 1973). Dessa forma, a quantificação da 2-desoxiglicose-6-fosfato nos permite estimar a velocidade de captação de glicose pela célula ou tecido. O tecido foi cortado em pequenos fragmentos utilizando um Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co.LTD.) e aproximadamente 200 mg foram incubados em 1 mL de tampão Krebs-Henseleit-Hepes livre de cálcio (pH 7,4) contendo Hepes 27 mM, NaCl 137 mM, NaHCO_3 4,2 mM, MgSO_4 0,4 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, KCl 5,4 mM e albumina 1%, acrescido de 0,5 uCi de 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose e 1mM de glicose, em banho a 37°C sob agitação contínua durante 2 horas. A reação foi interrompida com 200 uL de H_2SO_4 6N. Em seguida, os fragmentos foram lavados abundantemente com solução salina 0,9% e homogeneizados com líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) em tubos de homogeneização. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um frasco de cintilação e o pellet ressuspense novamente em líquido de cintilação, homogeneizado e centrifugado. Uma alíquota foi retirada e contada a radioatividade para garantir que toda a 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose foi removida. O sobrenadante obtido nesta segunda centrifugação foi transferido para os mesmos frascos de cintilação e levado para contar a radioatividade presente, utilizando o contador Tri-Carb 2100TR da PerkinElmer. A captação de 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose foi expressa em umol de glicose captada.g $\text{TAM}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$.

3.9 Incorporação de 1- ^{14}C -piruvato e glicerol-U- ^{14}C em fração glicerol de TAG em fragmentos de TAM

O tecido foi cortado em pequenos fragmentos utilizando um Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co.LTD.) e aproximadamente 200 mg foram incubados em 1 mL de tampão Krebs-Hepes livre de cálcio (pH 7,4), contendo Hepes 27 mM, NaCl 0,9%, NaHCO_3 1,3% 155 mM, MgSO_4 3,82% 155 mM, MgCl_2 4 mM, KH_2PO_4 2,11% 155 mM, KCl 1,15% 154 mM e albumina 1%, acrescido de piruvato-1- ^{14}C (0,5 μCi , 1 mM) ou glicerol-U- ^{14}C (0,5 μCi , 1 mM) em banho a 37°C sob agitação contínua durante 2 horas. A reação foi interrompida com 200 μL de H_2SO_4 6N, e em seguida os fragmentos foram lavados abundantemente com solução salina 0,9% para retirar o restante da marca não incorporada e homogeneizados em clorofórmio:metanol (2:1) para extração dos lipídios, como descrito no **item 3.3**. Após a separação das fases, a fase aquosa foi aspirada e a fase clorofórmica lavada 3 vezes com 3 mL da mistura da fase superior, preparada com clorofórmio, metanol e mistura

salina. A mistura salina continha CaCl_2 0,04%, MgCl_2 0,034% e NaCl 0,58%. Após cada lavagem, a fase superior foi aspirada e na última, alíquotas da fase clorofórmica foram separadas para evaporar: 2 mL foram colocados direto no frasco de cintilação e o resíduo dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contar a radioatividade dos lipídios totais e 4 mL foram colocados em tubos de ensaio largo para extrair os ácidos graxos. Após a evaporação, foram adicionados 2 mL de KOH etanólica (1 mL de KOH saturada para 20 mL de etanol absoluto) e os tubos foram mantidos em banho a 70°C durante 2 horas para saponificar. Após a saponificação, foram adicionados 4 mL de água Milli-Q e os tubos permaneceram no banho a 90°C até a evaporação de todo o álcool proveniente da KOH etanólica. O material saponificado foi então lavado 3 vezes com 8 mL de éter de petróleo para remoção dos lipídios não saponificáveis. Em cada lavagem, o material foi vortexado cuidadosamente e a fase superior aspirada. Posteriormente, o material foi acidificado com ácido perclórico 6% e os ácidos graxos foram extraídos lavando 3 vezes com éter de petróleo. Em cada lavagem, o material foi transferido para um frasco de cintilação e após a evaporação o resíduo foi dissolvido em líquido de cintilação para a contagem da radioatividade. A fase que sobrou no tubo, que continha a fração glicerol-TAG, foi transferida para um tubo graduado e lavado com água Milli-Q gelada até completar um volume de 5 mL. Uma alíquota de 2 mL foi colocada no frasco de cintilação, dissolvido em líquido de cintilação e a radioatividade foi contada utilizando o contador Tri-Carb 2100TR da PerkinElmer. A incorporação de 1- ^{14}C -piruvato ou glicerol-U- ^{14}C em fração glicerol de TAG foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{g} \cdot \text{TAM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.10 Medida da atividade das enzimas

3.10.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

O tecido foi homogeneizado em 4 mL de tampão contendo sacarose 0,2 M, trietanolamina 20 mM, 2-β-mercaptoetanol 5 mM e EDTA 1 mM (pH 7,5). O homogenado foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. A camada lipídica superior foi descartada e o sobrenadante novamente centrifugado a 100.000 g a 4°C durante 30 minutos para obtenção da fração citosólica. A atividade da enzima foi determinada pela formação do malato, conforme descrito por Ballard, Hanson e Leveille, (1967).

O meio de reação e o homogenado foram pré-incubados separadamente a 37°C durante 5 minutos. O meio de reação continha tampão imidazol 333,33 mM (pH 6,6), MnCl₂ 40 mM, GSH 20 mM, NADH 50 mM, PEP 15 mM, MDH 6U/tubo, KHCO₃ 1M e NaH¹⁴CO₃ 2μCi/tubo. O ensaio enzimático foi iniciado pela adição de 100 μL da fração citosólica em tubos contendo 800 μL do meio de reação mais 100 μL de IDP 12,5 mM. Os brancos da reação continham todos os componentes da mistura exceto o IDP que foi substituído por água. A mistura foi incubada em banho a 37°C e após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de ácido tricloroacético 10%. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos e uma alíquota de 1 mL foi transferida para um frasco de cintilação contendo 100 μL de HCl 2N. Em seguida, os frascos foram colocados em dessecador a vácuo para retirar o NaH¹⁴CO₃ não incorporado em malato, permanecendo até a completa evaporação e o precipitado formado atingir uma cor alaranjada. O precipitado foi então ressuspense em 1 mL de água e posteriormente dissolvido em líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para contagem da radioatividade utilizando o contador Tri-Carb 2100TR da PerkinElmer. A atividade da enzima PEPCK foi expressa em nmol . mg de proteína⁻¹. min⁻¹, sendo que as proteínas do homogenado foram quantificadas pelo método de BCA (Bicinchoninic Acid – Pierce) e medida espectrofotometricamente a 562 nm (SMITH et al., 1985).

3.10.2 Glicerocinase

A atividade da enzima foi determinada conforme descrito por Newsholme, Robinson e Taylor, (1967) e esse método se baseia na conversão do glicerol-¹⁴C em glicerol-¹⁴C-3P.

O tecido foi homogeneizado em 4 mL de tampão contendo KCl 1% e EDTA 1 mM. Os homogenados foram centrifugados a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos. A camada lipídica superior foi descartada e o sobrenadante e o meio de reação foram pré-incubados separadamente

a 37°C durante 5 minutos. O meio de reação continha ATP 6 mM, TRIS 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 4 mM, EDTA 1 mM, NaF 25 mM, 2-β-mercaptoetanol 20 mM, glicerol-U-[¹⁴C] 0,25 μCi/tubo, glicerol 1 mM, fosfocreatina 10 mM, creatina quinase 0,16 mg/mL e albumina 1%. O ensaio enzimático foi iniciado pipetando 20 μL do homogenado em tubos contendo 100 μL do meio de reação. A mistura foi incubada em banho a 37°C e após 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de etanol 98%. Nos brancos da reação, o etanol foi adicionado antes do homogenado. Em seguida, os tubos de reação foram centrifugados a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

A separação do glicerol-¹⁴C do glicerol-¹⁴C-3P foi realizada em cromatografia ascendente utilizando como solvente etanol, amônia e água (80:4:16), aplicando-se 20 μL da mistura de reação em papel de cromatografia Whatman n°1. Neste método, o glicerol não fosforilado move-se com o solvente e o glicerol-3-fosfato permanece entre a origem de aplicação e até 5 cm ascendente. Após a secagem do papel, cada amostra foi cortada em tiras de 5 cm (correspondente a localização do glicerol fosforilado) e colocada em tubos contendo líquido de cintilação SX20-5 (FISHER SCIENTIFIC) para a contagem da radioatividade utilizando o contador Tri-Carb 2100TR da PerkinElmer. A atividade da enzima gliceroquinase foi expressa em nmol . mg de proteína⁻¹. min⁻¹, sendo que as proteínas do homogenado foram quantificadas pelo método de Lowry et al., (1951).

3.10.3 Enzimas associadas à lipogênese

O tecido foi homogeneizado em 4 mL de tampão contendo TRIS 10 mM (pH7,4), sacarose 0,32 M, EDTA 2 mM e 2-β-mercaptoetanol 5 mM. Os homogenados foram centrifugados a 10.000 g a 4°C durante 10 minutos. A camada lipídica superior foi descartada e o sobrenadante foi centrifugado novamente a 100.000 g a 4°C durante 1 hora para obtenção da fração citosólica. O sobrenadante foi coletado para a análise da atividade das enzimas glicose-6-fosfato-desidrogenase e ATP-citrato liase.

- **Glicose-6P-desidrogenase**

Os prótons necessários à síntese de ácidos graxos são fornecidos pelo NADPH sendo que uma das principais reações geradoras de NADPH no metabolismo é a catalisada pela enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase no shunt das pentoses. A atividade da glicose-6-

fosfato-desidrogenase foi determinada pelo método descrito por Lee (1982), que se baseia na redução do NADP^+ medida espectrofotometricamente a 340 nm.

A mistura de reação continha TRIS 0,1 M (pH 8), NADP^+ 1 mM e glicose-6-fosfato 1 mM. O ensaio enzimático foi iniciado pela adição de 100 μL de glicose-6-fosfato que foi omitido do branco. A formação de NADPH foi acompanhada minuto a minuto durante 5 minutos em espectrofotômetro a 340 nm.

- **ATP-citrato-liase**

A atividade da ATP-citrato-liase foi determinada pelo método descrito por Srere (1959), que se baseia na oxidação do NADH, medida espectrofotometricamente a 340 nm.

A mistura de reação continha trietanolamina 50 mM (pH 7,7), ATP 7 mM, MgCl_2 8 mM, citrato de potássio 10 mM, NADH 0,1 mM, 2- β -mercaptoetanol 10 mM, CoA 0,24 mM e NAD-malato desidrogenase 2U/mL. O ensaio enzimático foi iniciado pela adição de 50 μL de citrato de potássio. A oxidação do NADH (omitido do branco) foi acompanhada minuto a minuto durante 5 minutos em espectrofotômetro a 340 nm.

3.11 Análise das proteínas por *Western blot*

Os tecidos foram homogeneizados em tampão RIPA para extração das proteínas totais, como descrito no **item 3.3**. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao tampão de amostra Laemmli, contendo SDS 4%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM e azul de bromofenol 2% (pH 6,8). A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas a 70°C durante 10 minutos e aplicadas em sistema de mini-gel vertical (modelo Protean III Cell BioRad®) de acrilamida:bisacrilamida com 1,5 mm de espessura e 10 ou 15 poços e, gel de separação variando de 6 a 14% de acordo com o peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço foi aplicado o padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa; Fermentas LifeSciences, EUA). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico com tampão de corrida contendo Tris-HCl 25 mM (pH8,4), glicina 115 mM, SDS 0,1%, sob voltagem de 100 Volts, durante 2 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência (BioRad® Trans-Blot SD Cell, EUA) conforme descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose (NC) foram colocados na solução de transferência (pH 7,4) contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 10% e metanol 0,2 M. Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para a membrana de NC, sendo o processo de transferência realizado durante 35 minutos sob a amperagem de 400 mA e voltagem fixa de 25 Volts a temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana de NC foi submetida a *immunoblot*, sendo incubada por 1 hora, sob agitação, a temperatura ambiente em solução de leite desnatado em pó 10%, diluído em solução TBS-T (pH 7,4) contendo Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,16 M e Tween 20 0,1%. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpos primários para a detecção das proteínas de interesse. As diluições dos anticorpos primários (tabela 1) foram realizadas em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica. Os anticorpos foram retirados e as membranas lavadas com solução de TBS-T. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (tabela 1). Após a lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada em sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+ System (BioRad Laboratories Inc., EUA) após a adição do reagente de quimioluminescência (pH8,5) contendo Tris-HCl 1 M, luminol 250 mM, ácido cumárico 90 mM e H₂O₂ 0,01%. As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o *software* ImageJ (*National Institutes of Health*, EUA). Após a

quantificação densitométrica das proteínas, o valor obtido na análise foi dividido pela densitometria da α -tubulina, proteína constitutiva utilizada como referência. O valor obtido na quantificação densitométrica das proteínas mitocondriais foi dividido pelo valor densitométrico da proteína Mitofusina 2, uma proteína mitocondrial utilizada neste trabalho como referência. Os resultados foram comparados com o grupo controle, os quais foi considerado como 1 ou 100% e expressos em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 1: Concentração e fornecedores dos anticorpos primários e secundários utilizados.

Anticorpo (Ac)	Fornecedor	Concentração do Ac primário	Concentração do Ac secundário
α -tubulina	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1:5000
AQP7	Abcam	1:1000	1:2000
Citrato sintase	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1:5000
fosfo-LHS ^{Ser660}	Cell signalling	1:1000	1:2000
Gliceroquinase	Abcam	1:500	1:2000
Glut4	Santa Cruz Biotechnology	1:500	1:2000
Mitofusina 2	Cell signalling	1:1000	1:5000
OxPhos	Abcam	1:1000	1:5000
PEPCK	Santa Cruz Biotechnology	1:3000	1:2000
UCP1	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1:10000
VDAC	Cell signalling	1:1000	1:5000

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando teste *t* de Student não pareado, com $P \leq 0,05$ como nível de significância. Para a análise dos resultados foi utilizado o programa *SigmaPlot* versão 12.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo experimental

Os animais receberam durante todo o período experimental uma dieta comercial balanceada adequada para roedores e água *ad libitum*. Durante 7 dias foram tratados diariamente com uma injeção, via intraperitoneal, de dexametasona na dose de 1 mg.kg^{-1} ou salina 0,9% de mesmo volume. Para caracterizar o modelo experimental foi avaliado diariamente, o peso corporal, a ingestão alimentar, consumo de água e volume urinário dos animais mantidos em gaiola metabólica. Os animais foram mantidos na gaiola metabólica 48 horas antes de iniciar o tratamento para adaptação. No primeiro dia de tratamento, foram colocados 40 gramas de ração e 100 mL de água para todos os animais, sendo repostos todos os dias e mensurados no dia seguinte.

Os animais tratados com dexametasona apresentaram redução significativa do peso corporal a partir do 2º dia de tratamento, efeito observado desde a primeira dose recebida e, no último dia a diferença de peso entre os grupos foi de aproximadamente 30% (Figura 4), sem ocorrer alterações na ingestão alimentar (Figura 5) e ingestão de água (Figura 6). No entanto, os animais tratados apresentaram um aumento do volume urinário no primeiro e nos 2 últimos dias de tratamento (Figura 7).

Figura 4: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no peso corporal (g) de ratos durante 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Figura 5: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na ingestão alimentar (g) de ratos durante 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais.

Figura 6: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na ingestão de água (mL) de ratos durante 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais.

Figura 7: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no volume urinário (mL) de 24 horas de ratos durante 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Os animais tratados também apresentaram uma redução de 35% no peso da glândula adrenal (Figura 8). Ambas as glândulas adrenais, esquerda e direita, apresentaram uma significativa atrofia (Tabela 2).

Figura 8: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no peso das duas glândulas adrenais (mg) de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Tabela 2: Peso das glândulas adrenais esquerda e direita (mg) de ratos após 7 dias de tratamento com salina ou dexametasona (1 mg.kg^{-1}).

Glândula adrenal (mg)	Controle	Dexa
Esquerda	$24,6 \pm 0,8$	$15,6 \pm 1,3^*$
Direita	$24,2 \pm 0,7$	$16,0 \pm 0,8^*$

Os valores representam média $\pm$ EPM de 5 glândulas. $*P < 0,05$.

4.2 Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina, ácidos graxos livres e glicerol

Os animais tratados com dexametasona apresentaram aumento de 27% e 3x na glicemia e níveis séricos de insulina, respectivamente, quando comparados aos animais controles (Tabela 3, Figuras 9A e 9B). Tais achados demonstram que o tratamento com dexametasona induziu um quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia. Além disso, os animais tratados com dexametasona também apresentaram aumento de 2 e 3,5x nos níveis séricos de ácido graxo livre e glicerol, respectivamente, quando comparados aos controles (Tabela 4, Figuras 10A e 10B).

Tabela 3: Glicemia e níveis séricos de insulina em ratos após 7 dias de tratamento com salina ou dexametasona (1 mg.kg^{-1}).

	Controle	Dexa
Glicemia (mg/dL)	93 ± 6	$118 \pm 4^*$
Insulina ($\mu\text{UI/mL}$)	$60,2 \pm 12,5$	$185,3 \pm 11,8^*$

Os valores representam média $\pm$ EPM de 6 animais. $*P < 0,05$.

Figura 9: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na glicemia (A) e insulina sérica (B) de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Tabela 4: Níveis séricos de ácidos graxos livres e glicerol em ratos após 7 dias de tratamento com salina ou dexametasona (1 mg.kg⁻¹).

	Controle	Dexa
Ácidos graxos livres (mmol/L)	0,23 ± 0,04	0,50 ± 0,05*
Glicerol (mmol/L)	0,81 ± 0,09	2,80 ± 0,35*

Os valores representam média ± EPM de 6 a 8 animais. *P<0,05.

A

B

Figura 10: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg⁻¹) nos níveis séricos de ácidos graxos livre (A) e glicerol (B) de ratos após 7 dias. Os valores representam a média ± EPM de 6 a 8 animais. *P < 0,05 vs. Controle.

4.3 Peso, conteúdo de gordura e proteína total do TAM

Ao final do tratamento, o tecido adiposo marrom foi retirado, dissecado e pesado. O peso do TAM dos animais tratados aumentou 74% quando comparado ao peso do tecido dos animais controles (Figura 11A e 11B). Esse aumento foi devido ao maior acúmulo de gordura, visto pelo aumento de aproximadamente 2,5 vezes no conteúdo de gordura total extraído (Figura 12A), demonstrado também pela alteração fenotípica do tecido após o tratamento, através da técnica histológica por coloração em HE, em que se é possível observar maior conteúdo de gotículas de gordura, ganhando uma aparência de TAB (Figura 12B). O tratamento também resultou em uma redução de 40% no conteúdo proteico total (Figura 13).

Figura 11: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no peso do TAM (g) de ratos após 7 dias (A). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle. Imagem representativa do TAM retirado de animal controle e dexa (B).

Figura 12: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo de gordura total (g.TAM^{-1}) do TAM de ratos após 7 dias (A). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 a 6 animais. $*P < 0,05$ vs. Controle. Secções representativas do TAM de animais controles e dexa demonstrando alteração fenotípica após o tratamento. Imagens com aumento de 20x e o traço (—) representa $500 \mu\text{m}$ (B).

Figura 13: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo total de proteínas (mg de proteína.mg TAM⁻¹) do TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. *P < 0,05 vs. Controle.

4.4 Peso dos músculos Tibial anterior, EDL e Soleus

O tratamento com dexametasona promoveu uma redução de aproximadamente 13 e 12% no peso dos músculos Tibial anterior e Soleus, respectivamente, quando comparados aos animais controles após 7 dias de tratamento. Não houve diferença significativa no peso do músculo *Extensor Digitorum Longus* (EDL) (Figura 14).

Figura 14: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no peso dos músculos (g) tibial anterior, EDL e soleus de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. *P < 0,05 vs. Controle.

Os dados apresentados demonstraram a eficiência do modelo de tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}), tais como redução do peso corpóreo (Figura 4), aumento do volume urinário (Figura 7), aumento da glicemia e insulinemia (Figura 9), aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e glicerol (Figura 10), atrofia das glândulas adrenais (Figura 8), possivelmente levando à inibição do eixo HPA e redução da massa muscular (Figura 14). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2017) e outros trabalhos da literatura (BURÉN et al., 2008; CHIMIN et al., 2014; PROTZEK et al., 2016).

O TAM dos animais tratados com dexametasona apresentou um significativo aumento no conteúdo de gordura (Figura 12) com consequente aumento do peso (Figura 11) e mudança fenotípica. Sabendo que a massa de um tecido é regulada pelo balanço entre os processos de síntese e degradação, fomos investigar o efeito do tratamento com dexametasona sobre a síntese de AGs e a regulação das vias de geração de G3P para esterificação dos AGs e formação de TAG, bem como a lipólise em fragmentos de TAM afim de verificar a contribuição desses processos para o aumento de gordura no tecido.

4.5 Atividade lipogênica

A atividade lipogênica do TAM foi avaliada através da atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, importante enzima geradora de NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos e ATP citrato liase, enzima responsável pela conversão de citrato em acetil-CoA e oxaloacetato. Os animais tratados com dexametasona apresentaram um aumento de 79 e 48% na atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (Figura 15A) e ATP citrato liase (15B), respectivamente, sugerindo um aumento da síntese de ácidos graxos induzido pelo tratamento com o glicocorticoide.

Figura 15: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg⁻¹) na atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (nmol. mg proteína⁻¹. min⁻¹) (A) e ATP citrato liase (B) no TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. *P < 0,05 vs. Controle.

Após demonstrar que houve aumento do peso e do conteúdo de gordura total no TAM dos animais tratados com dexametasona (1 mg.kg⁻¹) e após os experimentos sugerirem ocorrer um aumento da síntese de ácidos graxos no TAM destes animais e, sabendo da importância do fornecimento de G3P para esterificar os ácidos graxos para a formação de gordura, fomos investigar a contribuição das diferentes vias de geração de G3P para a formação de TAG. O

G3P pode ser gerado por três vias, tais como: via glicolítica, via gliceroneogênica e fosforilação direta do glicerol, sendo os resultados apresentados nesta ordem.

4.6 Avaliação da via glicolítica em fragmentos de TAM

4.6.1 Índice de captação de glicose

Um método utilizado para estudar a contribuição da via glicolítica é pela estimativa da captação de glicose pelo tecido, por meio da 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose. Este método baseia-se no fato de a glicose e a 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose utilizarem o mesmo transportador e ambos serem substratos da hexoquinase. No entanto, a 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose não é substrato para as enzimas subsequentes da via, acumulando-se e podendo ser dessa forma quantificada.

O índice de captação de glicose foi avaliado em fragmentos de TAM de animais controles e animais tratados com dexametasona. O tratamento com dexametasona não promoveu alteração no índice de captação de glicose (μmol de glicose captada. $\text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$) pelo TAM em comparação ao controle, apesar de uma forte tendência a estar reduzida (Figura 16). O tratamento promoveu, no entanto, uma redução do conteúdo proteico de GLUT4 em 47% (Figura 17).

Figura 16: Efeito do tratamento com dexametasona ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) na captação de glicose em fragmentos de TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais.

Figura 17: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico de GLUT4 (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

4.7 Avaliação da via gliceroneogênica em fragmentos de TAM

4.7.1 Incorporação de 1-[^{14}C]-piruvato na fração glicerol de TAG

O fluxo na via gliceroneogênica foi determinado pela incorporação de 1-[^{14}C]-piruvato (nmol de piruvato incorporado. $\text{g}^{-1}.\text{2h}^{-1}$) na fração glicerol de TAG em fragmentos de TAM de animais controles e animais tratados com dexametasona. O tratamento com dexametasona não promoveu alteração na via gliceroneogênica, visto que não houve diferença na incorporação de piruvato em glicerol-TAG em relação aos controles (Figura 18).

Figura 18: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na incorporação de 1-[^{14}C]-piruvato em glicerol-TAG em fragmentos de TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais.

4.7.2 Atividade da PEPCK

A PEPCK, enzima que catalisa a descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, tem papel chave na regulação da gliceroneogênese. A atividade da PEPCK foi determinada em fragmentos de TAM de animais controles e animais tratados com dexametasona. O tratamento não promoveu alteração na atividade da PEPCK, visto que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 19). O tratamento com dexametasona também não promoveu alteração no conteúdo proteico da PEPCK quando comparado aos animais controles (Figura 20).

Figura 19: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na atividade da enzima PEPCK em fragmentos de TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais.

A

B

Figura 20: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da PEPCK (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

4.8 Avaliação do processo de fosforilação direta do glicerol em fragmentos de TAM

4.8.1 Atividade da Gliceroquinase

A atividade da gliceroquinase ($\text{nmol.mg de proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$) foi determinada em fragmentos de TAM de animais controles e animais tratados com dexametasona. O tratamento aumentou a atividade da GK em 41% em relação ao controle (Figura 21). O tratamento com dexametasona também promoveu aumento de 55% no conteúdo proteico da enzima quando comparado ao controle (Figura 22).

Figura 21: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na atividade da gliceroquinase em fragmentos de TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Figura 22: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da GK (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

4.8.2 Incorporação de glicerol-U- ^{14}C em lipídios totais em fragmentos de TAM

O processo de fosforilação direta do glicerol também foi estimado pela incorporação de glicerol-U- ^{14}C em lipídios totais ($\text{nmol.g}^{-1}.\text{2h}^{-1}$) em fragmentos de TAM de animais controles e animais tratados com dexametasona. Entretanto, o tratamento reduziu a incorporação de glicerol-U- ^{14}C em lipídios totais em 54% comparado ao controle (Figura 23). Tal resultado poderia talvez ser explicado pela redução de aproximadamente 50% no conteúdo proteico do transportador de glicerol aquagliceroporina 7 (AQP7), na membrana dos adipócitos, o que pode ter lavado a uma menor entrada do glicerol-U- ^{14}C para o interior das células do TAM dos animais tratados com dexametasona (Figura 24).

Figura 23: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na incorporação de glicerol-U- $[^{14}\text{C}]$ em fragmentos de TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Figura 24: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da AQP7 (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Os dados apresentados demonstraram a contribuição das diferentes vias de geração de G3P para a formação de TAG. O tratamento com dexametasona não promoveu alterações na captação de 2-desoxi-1- ^{14}C -glicose (Figura 16), embora tenha reduzido o conteúdo proteico do transportador de glicose GLUT4 (Figura 17). Além disso, o tratamento não promoveu alterações na incorporação de 1- ^{14}C -piruvato em glicerol-TAG (Figura 18) e na atividade (Figura 19) e conteúdo proteico (Figura 20) da PEPCK. Tais resultados sugerem que as vias glicolítica e gliceroneogênica, respectivamente, não apresentam contribuição significativa para o fornecimento de G3P. Em contrapartida, o tratamento foi capaz de promover o aumento da atividade (Figura 21) e do conteúdo proteico da gliceroquinase (Figura 22), enzima responsável pela fosforilação direta do glicerol. Tal resultado indica que provavelmente a via de fosforilação direta do glicerol é a principal via responsável pela geração de G3P para a esterificação dos AGs e formação do TAG, corroborando assim, com o aumento de gordura observado no TAM dos animais tratados com dexametasona (Figura 12).

4.9 Lipólise

A lipólise foi avaliada pela quantidade de ácidos graxos livres e glicerol liberados no meio de incubação. O TAM dos animais tratados com dexametasona parece apresentar uma atividade lipolítica basal reduzida, visto que houve uma redução de 51% na quantidade de ácidos graxos livres (Figura 25A) e uma redução de 54% na quantidade de glicerol (Figura 25B) liberados para o meio de incubação em relação aos valores dos controles. A atividade lipolítica de um tecido é geralmente avaliada pela quantidade de glicerol liberado para o meio de incubação e a comparação entre os grupos só pode ser realizada quando a atividade da GK é igual entre eles. No presente trabalho, a atividade da GK apresentou-se aumentada no grupo tratado com dexametasona, sendo assim, uma parte do glicerol liberado pode ter sido fosforilada e menos glicerol foi liberado.

Para comprovar a redução do processo de lipólise, o conteúdo proteico da pLHS^{ser660} também foi analisado. Quando fosforilada pela PKA, a lipase hormônio sensível é ativada e tem acesso à superfície da gotícula lipídica que será hidrolisada graças a alterações conformacionais induzidas pela fosforilação da peripilina pela PKA. O tratamento com dexametasona promoveu uma redução na fosforilação da LHS em 63% em relação ao controle (Figura 26). Esse resultado corrobora com a redução da lipólise basal encontrada após os 7 dias de tratamento (Figura 25).

Figura 25: Ácido graxo livre (mmol/L) (A) e glicerol (mmol/L) (B) do TAM de ratos controles e tratados com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) liberados para o meio de incubação. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Figura 26: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da pLHS^{Ser660} (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. *P < 0,05 vs. Controle.

4.10 Avaliação do conteúdo de proteínas mitocondriais

Considerando que não houve variação entre grupos (controle e dexta), a proteína mitocondrial mitofusina 2 foi utilizada como proteína referência para corrigir os valores densitométricos das demais proteínas mitocondriais. A proteína mitofusina 2 foi corrigida pelo valor densitométrico do seu respectivo Ponceau da membrana (Figura 27).

Figura 27: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da mitofusina 2 (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) da proteína corrigida pelo seu respectivo Ponceau da membrana encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais.

O TAM é constituído por células multiloculares caracterizadas pela presença de várias pequenas gotículas lipídicas contendo TAG e um grande número de mitocôndrias (CANNON; NEDERGAARD, 2004a). A produção de calor pelas células adiposas marrons deve-se à intensa atividade metabólica das mitocôndrias, que expressam a proteína UCP1, específica do tecido e confere sua propriedade termogênica.

Sabe-se que o excesso de glicocorticoides pode causar a supressão da termogênese no TAM (HIMMS-HAGEN, 1989a). De fato, o tratamento com dexametasona promoveu redução de 42% no conteúdo da UCP1 em relação aos controles (Figura 28), podendo indicar que a capacidade termogênica do tecido se encontra reduzida após o tratamento.

Figura 28: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da UCP1 (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

A fim de demonstrar se o tratamento com dexametasona poderia alterar a função mitocondrial do TAM, avaliamos o conteúdo proteico de importantes marcadores da função e atividade mitocondrial, tais como as proteínas VDAC (um canal iônico localizado na membrana mitocondrial externa, responsável pela regulação do fluxo metabólico e energético através da membrana), citrato sintase (um importante marcador de quantidade de mitocôndrias) e os complexos da cadeia transportadora de elétrons. O tratamento com dexametasona promoveu redução de 42% no conteúdo proteico da VDAC (Figura 29), redução de 49% no conteúdo

proteico da citrato sintase (Figura 30) e redução de aproximadamente 75, 40 e 55% no conteúdo proteico dos complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons, respectivamente (Figura 31).

A

B

Figura 29: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da VDAC (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

A

B

Figura 30: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico da citrato sintase (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Figura 31: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo proteico dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (A) no TAM de ratos após 7 dias. As imagens referentes aos *immunoblots* foram representadas por um total de 3 animais de cada grupo experimental. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (B). Os valores densitométricos representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Esses dados indicam fortemente que o tratamento com dexametasona pode levar à redução da função e atividade termogênica do TAM. Para comprovar se a redução desses marcadores mitocondriais, principalmente a redução encontrada no conteúdo proteico da UCPI (Figura 28), poderia efetivamente contribuir para a supressão da termogênese do TAM, avaliamos a temperatura do tecido após estímulo adrenérgico com noradrenalina.

4.11 Temperatura do TAM após estímulo com noradrenalina

A liberação de noradrenalina estimula a via β 3-adrenérgica/AMPC, ativando fatores e cofatores de transcrição que favorecem a transcrição de genes envolvidos na termogênese e na biogênese mitocondrial resultando no aumento da capacidade termogênica do TAM. Para analisar a capacidade termogênica do TAM, avaliamos a temperatura do tecido após estímulo com noradrenalina. Para isso, um transponder foi inserido abaixo do TAM dos animais controles e tratados com dexametasona para mensurar a temperatura, minuto a minuto, após injeção de noradrenalina (20 μ g/ 100g de peso corporal), via veia jugular. O tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir a capacidade termogênica do tecido, frente ao estímulo com noradrenalina (Figura 32).

Figura 32: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) na temperatura do TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

De fato, o tratamento com dexametasona promoveu uma redução da capacidade termogênica do TAM nos animais tratados. A redução das proteínas mitocondriais levou a uma consequente redução na resposta do tecido ao estímulo noradrenérgico. Dessa forma, fomos investigar se o tratamento com dexametasona seria capaz de alterar o conteúdo de noradrenalina tecidual.

4.12 Determinação do conteúdo de noradrenalina no TAM

A noradrenalina foi extraída e dosada com a ajuda de um HPLC. O tratamento com dexametasona promoveu uma redução de 53% no conteúdo de noradrenalina no TAM dos animais tratados, comparados ao dos controles (Figura 33).

Figura 33: Efeito do tratamento com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) no conteúdo de noradrenalina do TAM de ratos após 7 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 6 animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Os dados apresentados demonstraram que as alterações promovidas pelo tratamento com dexametasona foram capazes de levar à redução da função do TAM. A diminuição do conteúdo proteico da principal proteína responsável pela capacidade termogênica do tecido, a UCP1, bem como a redução do conteúdo proteico de importantes marcadores mitocondriais, como VDAC, citrato sintase e os complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons levaram à redução da capacidade do tecido em aumentar a temperatura após estímulo com noradrenalina. Como visto, o conteúdo de noradrenalina tecidual estava reduzido, sugerindo que possivelmente o tratamento com dexametasona pode interferir na resposta do TAM ao SNS, sendo assim, seria muito interessante medir o turnover de noradrenalina no tecido para corroborar este dado.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Para a manutenção da capacidade do TAM em produzir calor é necessário um suprimento adequado de TAG, visto que os AGs são os principais substratos metabólicos a serem metabolizados pelo tecido. Independente da origem dos AGs, sua esterificação em TAG requer um fornecimento adequado de G3P, que pode ser gerado por três vias, conforme explicado na figura 1, tais como: 1) via glicolítica, em que a glicose é convertida a diidroxiacetona-fosfato e posteriormente em G3P pela ação da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase; 2) via gliceroneogênica, em que ocorre a conversão de substratos tais como lactato, aminoácidos glicogênicos e piruvato em glicerol-3-fosfato através da reversão parcial da via glicolítica; 3) via fosforilação direta do glicerol pela enzima GK, onde o glicerol pode ser reciclado após a hidrólise do TAG endógeno ou captado da circulação, gerando o G3P.

Estudos prévios do laboratório demonstraram que os GCs promoveram redução do peso corporal e da massa muscular, induziram resistência periférica à insulina e aumentaram a quantidade de gordura no TAB RETRO e EPI de animais tratados com dexametasona. Esse aumento na quantidade de gordura dos depósitos de TAB foram decorrentes da maior síntese *de novo* de AGs, vista pela maior incorporação de $^3\text{H}_2\text{O}$ e, das alterações nas vias de geração de G3P para esterificação dos AGs e formação de TAG de forma depósito-dependente (FERREIRA et al., 2017). Outros dados da literatura também demonstraram que os GCs são capazes de promover o aumento da atividade lipogênica no TAB mesentérico, aumentando a atividade das enzimas associadas à lipogênese, tais como ácido graxo sintase (AGS), G6PDH e enzima málica (CHIMIN et al., 2014). No TAM, os GCs parecem exercer efeitos semelhantes aos observados no tecido adiposo branco, uma vez que alguns estudos demonstraram que esses hormônios são capazes de aumentar a quantidade de gordura, bem como aumentar a expressão de alguns genes lipogênicos no TAM de animais tratados (DOIG et al., 2017; LUIJTEN et al., 2019). No entanto, os mecanismos envolvidos na formação e acúmulo dos TAG no TAM induzidos pelos GCs ainda não são bem conhecidos.

Este trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito dos GCs na regulação do metabolismo lipídico, com ênfase nas vias de geração de G3P, bem como avaliar o efeito deste hormônio na capacidade termogênica do TAM de ratos.

Para comprovar a **hipótese** de que os glicocorticoides podem provocar alterações no metabolismo lipídico do TAM, alterando as vias de geração de G3P, bem como regular a função mitocondrial e a termogênese do tecido, ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* foram tratados diariamente com uma injeção intraperitoneal de igual volume de fosfato de

dexametasona Sigma® (1 mg.kg⁻¹) ou salina 0,9% (1 mL.kg⁻¹) durante 7 dias consecutivos.

Os GCs exercem inúmeros efeitos fisiológicos sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, quando disponíveis em concentrações normais, disponibilizando substratos para o metabolismo oxidativo (VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007). No entanto, quando as concentrações plasmáticas deste hormônio excedem o normal, resultam em diversos distúrbios metabólicos. Embora os glicocorticoides sintéticos, tais como a dexametasona, sejam amplamente utilizados para o tratamento de diversas condições, este hormônio pode levar à redução do peso corporal, alterações no metabolismo glicídico, com aumento da insulina de jejum e redução da captação periférica de glicose (PASIEKA; RAFACHO, 2016), promovendo um quadro de resistência periférica à insulina e hiperglicemia.

Os efeitos dos GCs podem ser dependentes da dose e tempo de administração. A dose de dexametasona (1 mg.kg⁻¹) e o tempo de administração (7 dias) foram previamente validados por outros autores (BURÉN et al., 2008), inclusive por um estudo recente do nosso laboratório (FERREIRA et al., 2017), demonstrando a capacidade deste tratamento em desencadear um quadro de resistência periférica à insulina em roedores, com notável aumento dos níveis glicêmicos e de insulina. Nosso laboratório demonstrou que os animais tratados com dexametasona apresentaram alterações no teste de tolerância à glicose (apresentando níveis plasmáticos de glicose significativamente mais altos comparados aos animais controles e um retorno aos níveis glicêmicos basais mais lento) e no teste de tolerância à insulina (apresentando níveis glicêmicos superiores aos dos animais controles, permanecendo assim mesmo após 30 minutos da administração de insulina) (FERREIRA et al., 2017). Além disso, os animais tratados com dexametasona apresentaram alterações no peso corporal, ingestão hídrica e volume urinário.

O presente estudo demonstrou que o tratamento com dexametasona, durante 7 dias, foi capaz de promover: 1. redução do peso corporal, observado desde o segundo dia de tratamento, sem ocorrer alterações no consumo alimentar e consumo hídrico; 2. aumento do volume urinário; 3. redução do peso dos músculos soleus e tibial anterior; 4. atrofia das glândulas adrenais; 5. aumento da glicemia e insulinemia e, 6. aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e glicerol. Esses resultados foram corroborados por dados obtidos por outros autores (CHIMIN et al., 2014; PASIEKA; RAFACHO, 2016; PROTZEK et al., 2016; FERREIRA et al., 2017).

A redução do peso corporal encontrada nos animais tratados com dexametasona pode possivelmente ser explicada pela redução da massa muscular dos animais, tendo sido observada

no presente trabalho redução do peso dos músculos tibial anterior e soleus. Os GCs regulam o metabolismo de proteínas no músculo esquelético, apresentando um efeito oposto ao da insulina. A transmissão do sinal insulínico envolve diversas proteínas e apresenta como um dos principais efetores a proteína quinase B (Akt), que tem um importante papel na regulação de fatores de transcrição envolvidos na degradação e síntese proteica. O anabolismo e o catabolismo proteico são regulados pela Akt por vias distintas, de forma que quando esta proteína é ativada por fosforilação, pode estimular a síntese proteica via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e, em paralelo, inibir a degradação proteica via supressão da atividade transcricional de Foxo (*forkhead box class o*) (BODINE; FURLOW, 2015). Os GCs podem inibir a síntese proteica ou ativar a degradação das proteínas por interagir diretamente com a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), levando à redução da atividade desta com consequente redução da atividade da Akt. Além disso, a ativação do sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma pelos GCs é mediada pelo aumento da expressão dos atrogenes atrogin-1 e MURF-1, responsáveis pelo direcionamento das proteínas a serem degradadas pela maquinaria proteassomal. Estas alterações no *turnover* proteico podem ser explicadas pela alteração na produção de dois fatores que controlam a massa muscular, tais como (IGF-I) e a miostatina, em que sabidamente a diminuição da produção de IGF-I, bem como o aumento da produção de miostatina contribuem para a atrofia muscular induzida pelos GCs (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008).

Os animais tratados com dexametasona também apresentaram aumento do volume urinário comparados aos animais controles. A diferença no volume urinário encontrada no primeiro dia pode ser devido à alguma alteração na adaptação dos animais, visto que nos próximos 4 dias esta diferença não foi observada. Nos dois últimos dias de tratamento, os animais tratados apresentaram novamente um aumento no volume urinário e esse dado pode ser explicado pelo fato de que os GCs, quando em níveis elevados, podem levar à diurese osmótica (efeito poliúrico) ao se ligarem aos receptores mineralocorticoides, levando à reabsorção de sódio e à excreção de potássio, hidrogênio e água. Este efeito pode ser mediado pela ação direta dos GCs nos túbulos renais ou por inibição da liberação do hormônio antidiurético, a vasopressina, visto que os GCs podem suprimir a expressão de vasopressina em neurônios hipotalâmicos (ERKUT; POOL; SWAAB, 1998; RUGINSK et al., 2009).

Os GCs são sintetizados e secretados pelas células da zona fasciculada do córtex da glândula adrenal e sua concentração circulante é regulada pelo eixo HPA. Esses hormônios podem controlar suas ações fisiológicas pela retroalimentação negativa, reduzindo a síntese e

secreção do CRH e ACTH, quando presentes em altas concentrações. Dessa forma, na ausência do estímulo pelo ACTH, a glândula adrenal perde a capacidade de produzir cortisol. Os animais tratados com dexametasona apresentaram uma redução significativa no peso das glândulas adrenais (esquerda e direita), sugerindo que a dose utilizada foi efetiva para inibir o eixo HPA. Esse resultado foi corroborado por outros autores (NICOLAIDES et al., 2000; CHIMIN et al., 2014).

Dependendo da dose e tempo de tratamento, os GCs podem induzir aumento das concentrações plasmáticas de glicose e de TAG, acompanhada pelo aumento das concentrações séricas de insulina (BURÉN et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com dexametasona (1 mg.kg^{-1}) durante 7 dias apresentaram altos níveis de glicose sanguínea e elevada insulinemia, acompanhados pela redução do conteúdo proteico do transportador de glicose GLUT4, quando comparados aos animais controles. A hiperinsulinemia é geralmente decorrente do aumento da massa, tamanho e proliferação das células β -pancreáticas que elevam a síntese e secreção de insulina (PROTZEK et al., 2016). Foi demonstrado, em roedores tratados com dexametasona, um significativo aumento na secreção de insulina após sobrecarga de glicose (*in vivo*) e em ilhotas pancreáticas perfundidas ou incubadas na presença de glicose (*in vitro*) (MARTÍNEZ et al., 2016). O aumento da glicemia encontrada nos animais tratados pode ser explicada pela redução da captação de glicose em decorrência da menor translocação de GLUT4 para a superfície da membrana celular (ROSE; HERZIG, 2013; PASIEKA; RAFACHO, 2016) e pelo aumento da neoglicogênese hepática (BEAUDRY et al., 2013). Animais adrenalectomizados apresentaram diminuição significativa da glicemia em relação aos animais controles, sugerindo assim, uma maior sensibilidade à ação da insulina devido à baixa quantidade de GCs circulante (CABELLO et al., 1990; SODRÉ, 2014).

Uma outra característica do modelo de tratamento com dexametasona é a alteração no metabolismo das lipoproteínas resultando no aumento dos níveis plasmáticos de TAG e AGs livres (HENKIN; COMO; OBERMAN, 1992). Os GCs apresentam um papel modulador sobre os níveis de lipídios circulantes, aumentando os níveis de AGs livres e glicerol por ativação da LHS (SLAVIN; ONG; KERN, 1994). Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com dexametasona apresentaram aumento significativo dos níveis séricos de AGL e glicerol, estando de acordo com esses achados prévios. Esses resultados poderiam possivelmente ser explicados pelo aumento da atividade lipolítica induzida pelos GCs nos depósitos de TAB EPI e RETRO, como demonstrado por FERREIRA et al., (2017).

Os GCs apresentam efeito determinante na distribuição da gordura corporal levando ao maior acúmulo de TAG, dependendo da localização dos depósitos de gordura. Nossos resultados demonstraram que o aumento do peso do TAM, acompanhado pelo aumento da quantidade de gordura total e marcante alteração fenotípica, ganhando uma aparência de TAB, vista pela maior quantidade de gotículas de gordura no tecido dos animais tratados com dexametasona, ocorreu juntamente com o aumento da síntese de ácidos graxos, sugerido pelo aumento da atividade das enzimas G6PDH e ACL. No TAM os GCs são também capazes de promover aumento da expressão de alguns genes adipogênicos tais como ácido graxo sintase (*Fasn*) e da proteína alongadora de ácidos graxos de cadeia muito longa (*Elovl3*) (LUIJTEN et al., 2019). No TAB mesentérico de animais tratados com 2,5 mg.kg⁻¹ de dexametasona, também foi observado maior expressão gênica e atividade da enzima G6PDH e maior expressão gênica desta enzima no TAB subcutâneo (CHIMIN et al., 2014). Experimentos para quantificar a síntese de AG a partir de ³H₂O são interessantes e deverão ser realizados para a medida da lipogênese total no TAM. Entretanto, dados da literatura mostram que os GCs aumentam a síntese de AG no TAB EPI e RETRO de ratos tratados, vista pela maior incorporação de ³H₂O nestes tecidos (FERREIRA et al., 2017).

Independente da origem dos AGs, o fornecimento de G3P é essencial para a síntese de TAG. Nosso trabalho demonstrou que o GC aumentou o conteúdo de gordura no TAM, possivelmente por aumentar a síntese de AGs e promoveu alterações na regulação das vias de geração de G3P para manter os estoques de TAG no TAM. A síntese de G3P, em diferentes situações fisiológicas é regulada por fatores metabólicos, neurais, nutricionais e hormonais. Nosso laboratório apresenta vasta experiência em estudar as vias de geração de G3P, tendo por vários anos contribuído para a elucidação dos mecanismos envolvidos na manutenção dos estoques de TAG e a regulação destas vias em diferentes tecidos e modelos experimentais como jejum, diabetes e diferentes tipos de dietas, tais como ricas em proteínas, livre de carboidratos ou hipercalóricas e ricas em lipídios.

O tratamento com dexametasona, embora não tenha alterado significativamente a captação de glicose pelo TAM, mostrou uma tendência em reduzir a via glicolítica para a geração de G3P. Esse resultado foi, contudo, acompanhado pela redução do conteúdo proteico do transportador de glicose GLUT4 no tecido dos animais tratados quando comparado ao dos animais controles. Resultado semelhante foi obtido *in vitro* em adipócitos de TAB EPI e RETRO de animais tratados com dexametasona, visto que a incorporação de glicose e o conteúdo proteico de GLUT4 encontravam-se reduzidos nestas células (FERREIRA et al.,

2017). Além disso, camundongos alimentados durante 8 semanas com uma dieta hiperlipídica apresentaram resistência à insulina e menor captação de glicose e conteúdo proteico de GLUT4 nos TABs EPI e RETRO (BUZELLE, 2016). No TAM de animais adaptados à dieta HP com baixa insulinemia, a captação de glicose e o conteúdo de GLUT4 também estavam reduzidos e, a substituição desta dieta por uma dieta balanceada, elevando os níveis plasmáticos de insulina para valores normais, foi capaz de restaurar a captação de glicose pelo tecido, resultando no aumento da captação de glicose e na redução da gliceroneogênese (KAWASHITA et al., 2002b).

Tendo em vista que o conteúdo de gordura está aumentado no TAM dos animais tratados com dexametasona e que possivelmente a síntese de AGs também esteja aumentada neste tecido, seria coerente supor que uma ativação da via gliceroneogênica seria necessária para fornecer G3P para a esterificação dos AGs, já que a redução do conteúdo de GLUT4 impossibilitaria o fornecimento de G3P pela via glicolítica. FRASSON et al., (2012) demonstraram que em situações em que os níveis de insulina plasmáticos estão reduzidos, como jejum, diabetes e dieta HP, há um aumento significativo na via gliceroneogênica e uma redução na captação de glicose pelo TAB, demonstrando um controle recíproco entre estas vias. Este controle recíproco entre as duas vias foi reforçado pelos achados de CHAVES et al., (2006), (2008), demonstrando que animais alimentados com dieta cafeteria durante 24 dias, onde havia altos níveis de insulina, apresentaram aumento na captação de glicose e redução na via gliceroneogênica nos TABs RETRO e EPI e no TAM quando comparados aos animais controles. Interessantes foram os achados de FERREIRA et al., (2017) que demonstraram em situação de altos níveis de insulina mas com resistência a este hormônio, induzida pelo tratamento com dexametasona, demonstrando diferenças no controle das vias de geração do G3P dependendo da localização do tecido. O TAB RETRO apresentou redução da captação de glicose e aumento da gliceroneogênese, enquanto que no TAB EPI essas duas vias se encontravam reduzidas, sugerindo que os GCs regulam as vias de geração de G3P de forma depósito-dependente (FERREIRA et al., 2017). No presente trabalho, não houve diferença significativa na regulação da via gliceroneogênica entre os grupos experimentais. O tratamento com dexametasona não alterou a incorporação de piruvato em glicerol-TAG, bem como a atividade e o conteúdo proteico da enzima PEPCK, enzima chave da gliceroneogênese, no TAM dos animais tratados quando comparados aos controles. Em contrapartida, tanto ratos tratados com dexametasona (FERREIRA et al., 2017), como camundongos alimentados durante 8 semanas com dieta hiperlipídica (BUZELLE, 2016), modelos em que apresentam resistência à

insulina, foi observada redução da via gliceroneogênica no TAB EPI quando comparados aos animais controles, sugerindo que esta via é regulada de forma tecido-dependente.

No presente trabalho, a provável redução na via glicolítica e a inexistente diferença na via gliceroneogênica no TAM dos animais tratados com dexametasona comparados aos controles parecem inconsistentes, uma vez que seria esperado encontrar um controle recíproco entre estas vias e não explicam o maior acúmulo de gordura no tecido destes animais, tendo em vista que o tecido parece ser capaz de manter a síntese de G3P para a eficiente esterificação dos AGs e formação de TAG. Porém, o aumento da atividade e conteúdo proteico da enzima GK no TAM dos animais tratados com dexametasona sugere que o G3P necessário para a esterificação dos AGs parece ser proveniente principalmente da fosforilação direta do glicerol. Mesmo que no TAM dos animais tratados com dexametasona tenha sido observada redução na incorporação de glicerol em lipídios totais, podemos sugerir que o fornecimento de G3P, representado por aproximadamente $40 \text{ nmol de glicerol incorporado} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{2h}^{-1}$, foi capaz de esterificar todo o AG sintetizado *de novo* ou pré-formado, provenientes da circulação ou da reciclagem endógena, visto que cada mol de glicerol pode esterificar 3 moles de AGs. Uma outra questão a ser levada em consideração é a condição experimental da realização do experimento *in vitro* de incorporação de glicerol- $\text{U-}[^{14}\text{C}]$ em lipídios totais: 1) pode ser considerado que o glicerol marcado possa ter sofrido, nas células do grupo tratado com dexametasona, uma diluição radioisotópica, devido à redução de AQP7 e à menor saída de glicerol oriunda da lipólise, aumentando dessa forma, a concentração do glicerol “frio” dentro do adipócito; ou ainda 2) poderia ser considerado que o glicerol (marcado e frio) colocado no meio de incubação nos experimentos *in vitro* não tenha entrado igualmente nas células (comparando os ratos controles e tratados com dexta), com a mesma velocidade (devido ao menor número de AQP7) e assim a atividade específica dentro das células controles e experimentais seria diferente, o que impossibilita a interpretação real dos resultados. Assim nossos resultados sugerem que a dexametasona pode ser capaz de aumentar a taxa de reesterificação de AG em TAG no TAM, já que há aumento da atividade da GK e há redução do conteúdo proteico da AQP7, sugerindo que o tecido limita a liberação de glicerol e de AG para a circulação. Além disso, foi demonstrado que animais nocautes para AQP7 apresentam uma maior atividade da GK, estando associada à maior síntese de TAG e tamanho dos adipócitos (HIBUSE et al., 2005).

Animais alimentados com dieta cafeteria durante 24 dias também apresentaram uma maior ativação desta via, vista pela maior incorporação de glicerol em lipídios totais e maior

atividade da enzima GK, contribuindo significativamente para o fornecimento de G3P (CHAVES et al., 2008). Essa via de fosforilação do glicerol pela GK e incorporação em glicerol-TAG também se encontrou ativa no TAB EPI e RETRO de camundongos alimentados com dieta rica em lipídios (BUZELLE, 2016) e no EPI de animais tratados com dexametasona (FERREIRA et al., 2017).

Estudos do nosso laboratório demonstraram que tanto a atividade quanto a expressão da GK estão sob controle direto do SNS (KAWASHITA et al., 2002b; FESTUCCIA et al., 2003c). A exposição de ratos ao frio durante 12 e 24 horas, situação que sabidamente aumenta o fluxo simpático para o TAM, promove elevação da expressão da GK em duas e quatro vezes, bem como promove aumento da sua atividade em 30 e 100%, respectivamente. Após a desnervação simpática cirúrgica desse tecido, a atividade da enzima apresenta uma redução comparada ao lado inervado do tecido. Este efeito pôde ser mimetizado pela administração de antagonistas adrenérgicos do tipo beta. Além disso, foi observado aumento da atividade e expressão da GK após 24 e 72 horas de infusão de noradrenalina (FESTUCCIA et al., 2003c). A infusão de noradrenalina promoveu um aumento da atividade da GK no TAB RETRO e EPI de animais alimentados com dieta balanceada, jejuados, diabéticos e alimentados com dieta cafeteria, indicando que a GK tem sua atividade estimulada pelas catecolaminas (VALENTIM, 2012). Adicionalmente, ratos alimentados com dieta cafeteria também apresentaram aumento da atividade da GK no TAM e este efeito foi inibido pela desnervação simpática do tecido (CHAVES et al., 2008). Já em ratos adaptados à dieta HP, em que o fluxo simpático para o TAM encontra-se reduzido, a atividade da GK também se mostrou reduzida (BRITO et al., 1998) e tornou-se ainda menor após a desnervação simpática (KAWASHITA et al., 2002a). Efeitos semelhantes foram observados no TAB, evidenciados pela redução da atividade da GK após desnervação simpática dos depósitos adiposos RETRO e EPI de ratos alimentados com dieta comercial balanceada (FRASSON, 2010). Além disso, ratos alimentados com dieta hiperproteica possuem atividade simpática reduzida no RETRO e reduzida atividade da GK neste depósito (FRASSON, 2005). Esses dados evidenciam a importância do SNS no controle da GK em diferentes situações.

No entanto, a regulação da GK parece envolver também a participação de outros hormônios, em especial, a insulina. Em animais jejuados, diabéticos ou alimentados com dieta HP, situações nas quais os níveis de insulina estão baixos, a atividade desta enzima se encontra reduzida no TAB desses animais (FRASSON et al., 2012). Por outro lado, a atividade da GK está aumentada no TAB dos animais submetidos à dieta hipercalórica e hiperlipídica (HCHL),

acompanhando o aumento dos níveis plasmáticos de insulina (CHAVES et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a reposição da insulina em animais diabéticos restaurou a atividade da GK em adipócitos de TAB e, de forma similar, a atividade da GK em células adiposas de ratos *ob⁻/ob⁻* está correlacionada positivamente com os níveis plasmáticos de insulina (KOSCHINSKY; GRIES; HERBERG, 1971). KAWASHITA et al., (2002) demonstraram que a substituição da dieta HP pela dieta balanceada, elevando os níveis plasmáticos de insulina para valores normais, reestabelece completamente a síntese de AG e parcialmente a atividade de enzimas relacionadas à lipogênese no TAM. Entretanto, a desnervação simpática unilateral do TAM prejudica esta restauração. Contudo, ao tratar esses animais com soro anti-insulina foi possível notar um bloqueio total da restauração da lipogênese do TAM em ambos os lobos, innervado e desnervado, sugerindo que o TAM é capaz de manter significativa taxa de lipogênese na ausência do estímulo simpático, mas não na ausência de insulina.

Estudos da regulação gênica da GK no TAB verificaram que a região promotora do gene possui um elemento de resposta ao receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPRE) ao qual se liga ao heterodímero formado pelo PPAR γ (receptores ativados por proliferador de peroxissomo gama) e RXR α (receptores X retinóides alfa). Nos adipócitos brancos maduros, o heterodímero RXR α -PPAR γ recruta correpressores e mantém a transcrição do gene da GK constitutivamente inibida, fazendo com que o conteúdo basal da enzima seja muito pequeno. O fator determinante na indução da GK é o coativador de PPAR gama 1 alfa (PGC-1 α) (GUAN et al., 2002). Estímulos que aumentam os níveis intracelulares de PGC-1 α , levam à associação do PGC-1 α ao dímero RXR α -PPAR γ , causando a liberação dos correpressores e o recrutamento de coativadores de transcrição, possibilitando o aumento da síntese da GK. Os GCs são capazes de aumentar a expressão gênica do PGC-1 α no fígado, regulando a gliconeogênese hepática (BERNAL-MIZRACHI et al., 2003). Além disso, RAMAGE et al., (2016) demonstraram que o tratamento com GC promoveu aumento da expressão gênica do PGC-1 α em adipócitos de TAM de humanos e TAB inguinal de camundongos.

Uma vez que os nossos animais apresentaram altos níveis de GCs sem uma clara deficiência na ação da insulina neste tecido, é possível supor que os GCs são responsáveis por aumentar a fosforilação do glicerol no TAM, podendo ter um efeito direto na síntese da GK, sendo ainda o presente trabalho o primeiro a demonstrar o efeito destes hormônios na regulação das vias de geração de G3P no TAM.

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com dexametasona resultou em uma menor atividade lipolítica no TAM dos animais tratados quando comparados aos

animais controles, vista pela reduzida liberação de glicerol e AGs para o meio de incubação. No entanto, é preciso ter cautela ao analisar esse resultado, uma vez que a atividade da enzima GK se encontra aumentada no tecido dos animais tratados com dexametasona, uma parte do glicerol pode ser fosforilado e dessa forma, uma menor quantidade de glicerol é liberado para o meio, subestimando a real taxa lipolítica do tecido. Assim sendo, os valores obtidos podem ser resultantes de uma maior reesterificação do glicerol e não de uma lipólise reduzida de fato.

No estudo de VALENTIM (2012), fragmentos de TAB EPI de animais submetidos à infusão de noradrenalina, quando avaliados *in vitro*, além da atividade da GK aumentada também apresentaram uma maior incorporação de glicerol em glicerol-TAG e uma redução na liberação de AGs e glicerol para o meio de incubação, sugerindo que a maior atividade da GK intensifica a fosforilação do glicerol e previne que o glicerol e os AGs oriundos da lipólise sejam liberados pelo TAB. Este dado foi confirmado pela inibição *in vitro* da GK, em que foi possível observar uma maior liberação de glicerol para o meio de incubação pelos fragmentos de TAB. Em conjunto, esses resultados sugerem que as alterações na atividade da GK podem interferir no metabolismo lipídico dos diferentes depósitos de gordura, regulando a reesterificação e a liberação de AGs e glicerol pelo tecido. Dessa forma, a liberação de glicerol para o meio de incubação representa de forma precisa a atividade lipolítica de um tecido apenas quando a atividade da GK é igual entre os grupos experimentais.

Entretanto, a redução no conteúdo proteico da LHS fosforilada, e assim ativa, está de acordo com a menor atividade lipolítica no TAM de animais tratados com o GC. Corroborando nossos resultados, BUZELLE (2016) observou um efeito semelhante em adipócitos isolados do TAB RETRO de animais alimentados durante 8 semanas com dieta hiperlipídica. Neste estudo, além da atividade da GK aumentada, a incorporação de glicerol em lipídios totais reduzida, bem como o conteúdo proteico da AQP7 reduzido, foi observada redução na atividade lipolítica estimulada por noradrenalina nestas células, juntamente com a redução dos níveis de fosforilação da LHS. Entretanto, estudos de FERREIRA et al., (2017) e XU et al., (2009) demonstraram que em adipócitos isolados do TAB EPI de animais tratados com GCs, a atividade lipolítica se encontrava aumentada nessas células, vista pela maior liberação de glicerol e AGs para o meio de incubação. Além disso, o tratamento aumentou o conteúdo proteico da LHS e ATGL, bem como a fosforilação da LHS em Ser⁶⁶⁰ (resíduo alvo de PKA), sendo este último resultado abolido pela inibição da PKA (XU et al., 2009).

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o aumento de gordura no TAM estimulado pelo tratamento com dexametasona é provavelmente decorrente

do aumento da síntese de AG, avaliada indiretamente por meio da atividade das enzimas associadas à lipogênese G6PDH e ACL e do aumento da atividade da GK, aumentando a formação do G3P necessário para esterificação dos AGs e formação dos TAGs que se acumulam neste tecido. Também pode ter contribuído para este acúmulo de gordura a possível redução da atividade lipolítica, confirmada pelo menor conteúdo proteico da pLHS^{ser660}. Apesar dos valores obtidos na concentração de glicerol e AGs no meio de incubação também estarem reduzidos, eles não correspondem à real taxa de liberação dos mesmos pela lipólise, visto que o menor conteúdo de AQP7 na membrana dos adipócitos do grupo tratado com dexametasona pode ter influenciado na menor liberação destas moléculas, assim como as diferenças de atividade da GK podem ter propiciado uma maior reesterificação no TAM destes animais com o tratamento hormonal.

Outro importante resultado obtido neste trabalho foi o efeito dos GCs sobre a termogênese do TAM. A recente descoberta da atividade do TAM em humanos adultos tem revelado uma possibilidade de tratamento para a obesidade, diabetes e dislipidemia por meio do aumento do gasto energético (SIDOSSIS; KAJIMURA, 2015). Além disso, foi demonstrado que a atividade deste tecido está inversamente correlacionada com o índice de massa corporal, visto que indivíduos obesos apresentam uma reduzida atividade termogênica do TAM (CYPESS et al., 2009). Dessa forma, é de extrema importância o estudo dos mecanismos que podem levar à ativação ou inibição da atividade termogênica deste tecido.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir o conteúdo proteico da UCP-1, sugerindo que a capacidade termogênica do tecido poderia estar reduzida. Em roedores, os GCs suprimem a UCP-1, enquanto que animais adrenalectomizados ou tratados com o antagonista de GR (RU38486) apresentaram um aumento na termogênese e nos níveis proteicos de UCP-1 (VAN DEN BEUKEL et al., 2015). Além disso, LIU et al., (2013) demonstraram que a superexpressão da 11 β -HSD1 diminui a função do TAM, enquanto que a inibição farmacológica ou nocaute para esta enzima resultam na ativação do tecido. Em humanos, entretanto, foi demonstrado que os GCs aumentaram a captação de ¹⁸F-fluorodeoxiglicose pelo TAM em homens adultos saudáveis, mensurada por tomografia de emissão de pósitron e tomografia computadorizada, bem como a respiração e conteúdo proteico da UCP-1 em adipócitos primários deste tecido (RAMAGE et al., 2016). Esses dados sugerem que os GCs podem regular a atividade mitocondrial de forma espécie-dependente por mecanismos ainda desconhecidos.

Como demonstrado por DOIG et al., (2017), o tratamento de camundongos com o GC

induziu uma redução na respiração e no número de cópias de DNA mitocondrial, demonstrando que este hormônio pode afetar diretamente a função das mitocôndrias. No presente trabalho foi demonstrado que o tratamento com dexametasona reduziu o conteúdo proteico de diversos marcadores da função mitocondrial, tais como VDAC, citrato sintase e os complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons. Esses efeitos foram também relatados por outros autores (MARTINEZ-DEMENA et al., 2016; RAMAGE et al., 2016; DOIG et al., 2017). Além disso, LIU et al., (2012) demonstraram que a superexpressão da 11 β -HSD1 em adipócitos primários de TAM de camundongos resultou em significativa redução da expressão de genes marcadores da função deste tecido, tais como UCP-1 e as subunidades da citocromo c oxidase (Cox7a1 e Cox8b).

O SNS exerce um papel primordial na função termogênica do TAM. A liberação de noradrenalina estimula a via β 3-adrenérgica/AMPC, ativando fatores e cofatores de transcrição que favorecem a transcrição de genes envolvidos na termogênese e na biogênese mitocondrial que resultam no aumento da capacidade termogênica do TAM. O conteúdo proteico da UCP-1, particularmente, está relacionado com a intensidade do estímulo simpático para o tecido (HIMMS-HAGEN, 1990). Animais expostos ao frio durante 24 e 72 horas (PRZYGODDA, 2016) e, animais alimentados com dieta cafeteria por 24 dias (CHAVES et al., 2008), modelos capazes de aumentar o estímulo simpático para o TAM, apresentaram maior conteúdo de UCP-1, bem como uma maior ligação mitocondrial de GDP à sítios de afinidade à nucleotídeos de purinas localizados na UCP-1 e maior temperatura do tecido. Nossos resultados demonstraram que a redução dos marcadores mitocondriais, principalmente a redução encontrada no conteúdo proteico da UCP1, contribuiu efetivamente para a redução da capacidade termogênica do TAM confirmada pela menor elevação da temperatura do tecido de animais tratados com dexametasona em resposta à noradrenalina. Estes dados foram corroborados por BRITO, BRITO e MIGLIORINI, (1992), ao demonstrarem que animais alimentados com dieta HP, que sabidamente reduzem a resposta do TAM ao estímulo simpático, apresentaram menor atividade da citocromo oxidase e conteúdo proteico mitocondrial, além do decréscimo na capacidade do TAM de aumentar a temperatura em resposta à noradrenalina.

Os GCs apresentam efeitos complexos na termogênese do TAM e, alguns estudos tem sugerido que os efeitos deletérios na função do tecido causada pelos GCs é devido à inibição da expressão e função dos receptores β -3 adrenérgicos (FÈVE et al., 1992; SOUMANO et al., 2000). No entanto, outro estudo sugeriu que os GCs não afetam diretamente os receptores β -adrenérgicos no TAM e que os efeitos deste hormônio seriam mediados por controle central

pela redução da produção do CRH no hipotálamo, resultando na perda do estímulo e atividade do SNS para o TAM (HIMMS-HAGEN, 1989a), visto que os impulsos aferentes relacionados ao controle da temperatura são integrados no hipotálamo e que as células neurais responsáveis pela inervação do TAM podem também ser encontradas em várias áreas hipotalâmicas (MORRISON, 2004). Além disso, foi demonstrado que uma microinjeção de CRH no núcleo paraventricular hipotalâmico foi capaz de ativar a termogênese do TAM por meio da ativação do SNS (LEFEUVRE; ROTHWELL; STOCK, 1987).

Além dos resultados apresentados à cerca do conteúdo proteico dos marcadores de função mitocondrial e termogênese do TAM, demonstramos que o tratamento com dexametasona promoveu uma redução no conteúdo de noradrenalina tecidual, sugerindo que possivelmente os GCs podem reduzir o turnover de noradrenalina, assim como interferir na resposta do TAM ao SNS.

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o tratamento com dexametasona levou à diminuição da termogênese do TAM, vista pela redução da proteína que desempenha a principal função do tecido, a UCP-1. Além disso, demonstramos que os GCs interferem na função mitocondrial, vista pela redução no conteúdo proteico da VDAC, citrato sintase e os complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons. Esses resultados, em conjunto, explicam a redução na capacidade do TAM em aumentar a temperatura após estímulo com noradrenalina e, a redução do conteúdo de noradrenalina tecidual sugere que os GCs interferem na resposta do TAM ao SNS.

Experimentos adicionais deverão ser realizados para verificar o efeito dos GCs em TAM desnervado e em TAM de animais expostos ao frio.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho confirmam trabalhos anteriores, demonstrando que o fornecimento de G3P necessário para a esterificação de AGs e síntese de TAG parece ser controlado por mudanças nas vias de geração de G3P e que estas vias são reguladas de forma diferente para manter um fornecimento adequado de G3P.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que os GCs desempenham um papel importante na modulação das vias de geração de G3P e acúmulo de gordura no TAM de ratos. Pode-se concluir que este aumento da gordura observado no tecido dos animais tratados com o hormônio, foi decorrente da maior síntese de AGs e da maior fosforilação do glicerol pela enzima GK. Demonstramos pela primeira vez que os GCs regulam a atividade da GK no TAM, sendo esta provavelmente a responsável pela geração de G3P e formação de TAG no tecido. Além disso, nosso trabalho demonstrou que os GCs suprimem a termogênese do TAM possivelmente por interferir na resposta do tecido ao SNS, demonstrando pela primeira vez a redução do conteúdo de noradrenalina tecidual após o tratamento com dexametasona.

Em conjunto, esses achados fornecem importantes evidências relacionadas aos mecanismos envolvidos no acúmulo de gordura e supressão da termogênese no TAM mediados pelos GCs.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v. 523, p. 513–523, 1999.
- BALLARD, F. J.; HANSON, R. W.; LEVEILLE, G. A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. **The Journal of biological chemistry**, v. 242, n. 11, p. 2746–2750, 1967.
- BARTNESS, T. J.; VAUGHAN, C. H.; SONG, C. K. REVIEW Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 36–42, 2010.
- BEAUDRY, J. L. et al. Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit islet glucose responsiveness in young male sprague-dawley rats. **Endocrinology**, v. 154, p. 3197–3208, 2013.
- BERNAL-MIZRACHI, C. et al. Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR- α dependent in LDL receptor-null mice. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1069–1075, 2003.
- BODINE, S. C.; FURLOW, J. D. Glucocorticoid Signaling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 872, 2015.
- BRITO, M. N.; BRITO, N. A.; MIGLIORINI, R. H. Thermogenic capacity of brown adipose tissue is reduced in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 2081–2086, 1992.
- BRITO, M. N. et al. Sympathetic activity in brown adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 69, n. 1, p. 1–5, 1998.
- BRITO, M. N. et al. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 4, p. R1003–1009, 1999.
- BURÉN, J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, n. 1, p. 91–101, 2008.
- BUZELLE, S. L. **Metabolismo de ácidos graxos e glicerol no tecido adiposo branco de camundongos com resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica**. Ribeirão Preto, 2016. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
- CABELLO, M. A. et al. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid treatment on the levels of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol in isolated rat hepatocytes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 68, n. 1, p. R1–5, 1990.
- CANNON, B.; HOUSTEK, J.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: More Than an Effector of Thermogenesis? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1, p. 171–187, 1998.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004b.

CHAVES, V. E. et al. Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2475–2480, 2006.

CHAVES, V. E. et al. Fatty acid synthesis and generation of glycerol-3-phosphate in brown adipose tissue from rats fed a cafeteria diet. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 7, p. 416–423, 2008.

CHAVES, V. E. et al. Increased glyceride-glycerol synthesis in liver and brown adipose tissue of rat: In-vivo contribution of glycolysis and glyceroneogenesis. **Lipids**, v. 47, n. 8, p. 773–780, 2012.

CHIMIN, P. et al. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 2, p. 409–420, 2014.

CROWLEY, V. E. F.; YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 4, p. 276–286, 2002.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009.

DE FRANÇA, S. A. et al. A low-protein, high-carbohydrate diet stimulates thermogenesis in the brown adipose tissue of rats via ATF-2. **Lipids**, v. 51, n. 3, p. 303–310, 2016.

DOIG, C. L. et al. 11 β -HSD1 modulates the set point of brown adipose tissue response to glucocorticoids in male mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 6, p. 1964–1976, 2017.

ERKUT, Z. A.; POOL, C.; SWAAB, D. F. Glucocorticoids Suppress Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin Expression in Human Hypothalamic Neurons. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 6, p. 2066–2073, 1998.

FERREIRA, G. N. et al. Differential regulation of glyceroneogenesis by glucocorticoids in epididymal and retroperitoneal white adipose tissue from rats. **Endocrine**, v. 57, n. 2, p. 287–297, 2017.

FESTUCCIA, W. T. L. et al. Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, p. 177–182, 2003a.

FESTUCCIA, W. T. L. et al. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 6, p. R1536–R1541, 2003b.

FÈVE, B. et al. Inhibition by dexamethasone of beta 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15909–15915, 1992.

FISCHER, A. H. et al. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2008, n. 6, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FRASSON, D. et al. The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 61, n. 10, p. 1473–1485, 2012.

GAROFALO, M. A. et al. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 1996.

GUAN, H. P. et al. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. **Nature Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1122–1128, 2002.

GUPTA, B. B. P.; LALCHHANDAMA, K. Molecular mechanisms of glucocorticoid action. **Current Science**, v. 83, n. 9, p. 1103–1111, 2002.

HABER, R. S.; WEINSTEIN, S. P. Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance: GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone. **Diabetes**, v. 41, n. 6, p. 728–735, 1992.

HAYASHI, M.; NAGASAKA, T. Suppression of norepinephrine-induced thermogenesis in brown adipose tissue by fasting. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 245, n. 6, p. E582–E586, 1983.

HENKIN, Y.; COMO, J. A.; OBERMAN, A. Secondary Dyslipidemia. **JAMA**, v. 267, n. 7, p. 961–973, 1992.

HIBUSE, T. et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. **PNAS**, v. 102, n. 31, p. 10993–10998, 2005.

HIMMS-HAGEN, J. Nonshivering thermogenesis. **Brain Research Bulletin**, v. 12, n. 2, p. 151–160, 1984.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. **Progress in Lipid Research**, v. 28, n. 2, p. 67–115, 1989b.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 11, p. 2890–2898, 1990.

HORTON, R. W.; MELDRUM, B. S.; BACHELARD, H. S. Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-deoxy-D-glucose. **Journal of neurochemistry**, v. 21, n. 3, p. 507–520, 1973.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 451–480, 1999.

KAWASHITA, N. H. et al. Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 4, p. R1185–R1190, 2002a.

KAWASHITA, N. H. et al. Relative importance of sympathetic outflow and insulin in the reactivation of brown adipose tissue lipogenesis in rats adapted to a high-protein diet. **Metabolism**, v. 51, n. 3, p. 343–349, 2002b.

KETTELHUT, I. C.; FOSS, M. C.; MIGLIORINI, R. H. Lipolysis and the antilipolytic effect of insulin in adipocytes from rats adapted to a high-protein diet. **Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 1985.

KOZAK, L. P.; HARPER, M.-E. MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEINS IN ENERGY EXPENDITURE. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 339–363, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, C. Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. **Methods in enzymology**, v. 89 Pt D, p. 252–257, 1982.

LEFEUVRE, R. A.; ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1217–1221, 1987.

LIU, J. et al. Essential roles of 11 β -HSD1 in regulating brown adipocyte function. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 50, n. 1, p. 103–113, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUIJTEN, I. H. N. et al. Glucocorticoid-induced obesity develops independently of UCP1. **Cell Reports**, v. 27, p. 1686–1698, 2019.

MARTINEZ-DEMENA, R. et al. Effect of glucocorticoids on the activity, expression and proximal promoter of type II deiodinase in rat brown adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 428, p. 58–67, 2016.

MARTÍNEZ, B. B. et al. Experimental model of glucocorticoid-induced insulin resistance. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 645–649, 2016.

MORENO, M. et al. Cold exposure induces different uncoupling-protein thermogenin masking/unmasking processes in brown adipose tissue depending on mitochondrial subtypes. **The Biochemical Journal**, v. 300 n. 2, p. 463–468, 1994.

MORRISON, S. F. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. **Physiology**, v. 19, n. 2, p. 67–74, 2004.

MOURA, M. A. F. et al. Effect of cold acclimation on brown adipose tissue fatty acid synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **Metabolism**, v. 50, n. 12, p. 1493–1498, 2001.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. E444–E452, 2007.

NEWSHOLME, E. A.; ROBINSON, J.; TAYLOR, K. A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 132, n. 2, p. 338–346, 1967.

NICOLAIDES, N. C. et al. Glucocorticoid therapy and adrenal suppression. **Endotext**, 2000.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033–1044, 2013.

PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of glucocorticoid excess on glucose tolerance: Clinical and preclinical evidence. **Metabolites**, v. 6, n. 3, p. 1–21, 2016.

PERSICO, P.; CERCHIO, M.; JEFFAY, H. Glycerokinase in mammalian adipose tissue: stimulation by lipogenic substances. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 228, n. 6, p. 1868–1874, 1975.

POGGIOLI, R. et al. Dexamethasone reduces energy expenditure and increases susceptibility to diet-induced obesity in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 415–420, 2013.

PROTZEK, A. O. P. et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 1–8, 2016.

PRZYGODDA, F. **Mecanismos e vias de sinalizações envolvidos na ação anabólica da inervação simpática no tecido adiposo marrom de ratos**. Ribeirão Preto, 2016. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RAMAGE, L. E. et al. Glucocorticoids Acutely Increase Brown Adipose Tissue Activity in Humans, Revealing Species-Specific Differences in UCP-1 Regulation. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 130–141, 2016.

ROSE, A. J.; HERZIG, S. Metabolic control through glucocorticoid hormones: An update. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 380, n. 1–2, p. 65–78, 2013.

RUGINSK, S. G. et al. Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 61–67, 2009.

SCHAKMAN, O. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2163–2172, 2013.

SCHAKMAN, O.; GILSON, H.; THISSEN, J. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 1, p. 1–10, 2008.

SELTZER, W. K. et al. Adrenal dysfunction in glycerol kinase deficiency. **Biochemical medicine**, v. 33, n. 2, p. 189–199, 1985.

SHIMIZU, I.; WALSH, K. The whitening of brown fat and its implications for weight management in obesity. **Current obesity reports**, v. 4, n. 2, p. 224–229, 2015.

SHIMIZU, Y.; NIKAMI, H.; SAITO, M. Sympathetic Activation of Glucose Utilization in Brown Adipose Tissue in Rats. **Journal of Biochemistry**, v.110, p. 688-692, 1991.

SIDOSSIS, L.; KAJIMURA, S. Brown and beige fat in humans: Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 2, p.478-486, 2015.

SLAVIN, B. G.; ONG, J. M.; KERN, P. A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **Journal of lipid research**, v. 35, n. 9, p. 1535–1541, 1994.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SODRÉ, G. N. F. **Papel dos glicocorticoides na regulação das vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo branco de ratos**. Ribeirão Preto, 2014. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

SOUMANO, K. et al. Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 165, n. 2, p. 7–15, 2000.

SRERE, P. A. The Citrate Cleavage Enzyme. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 234, n. 10, p. 2544-2547, 1959.

STRACK, A. M.; BRADBURY, M. J.; DALLMAN, M. F. Corticosterone decreases nonshivering thermogenesis and increases lipid storage in brown adipose tissue. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 1, p. R183–R191, 2017.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

VALENTIM, R. R. **O Papel das catecolaminas na regulação da gliceroquinase e sua importância no tecido adiposo branco de ratos**. Ribeirão Preto, 2012. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

VAN DEN BEUKEL, J. C. et al. Cold exposure partially corrects disturbances in lipid metabolism in a male mouse model of glucocorticoid excess. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4115–4128, 2015.

VEGIOPOULOS, A.; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1–2, p. 43–61, 2007.

WON JAHNG, J. et al. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 1–2, p. 64–70, 2008.

XU, C. et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 8, p. 1161–1170, 2009.

YANG, S.; ZHANG, L. Glucocorticoids and vascular reactivity. **Current vascular pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2004.