MICHELLA SOARES COELHO ARAÚJO

**Obesidade e resistência à insulina induzida
pela restrição crônica no consumo de sal
em ratos Wistar: efeitos sobre o balanço
energético, sistema renina-angiotensina
(SRA) e sinalização da insulina**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo - SP
2005

MICHELLA SOARES COÊLHO ARAÚJO

Obesidade e resistência à insulina induzida pela restrição crônica no consumo de sal em ratos Wistar: efeitos sobre o balanço energético, sistema renina-angiotensina (SRA) e sinalização da insulina

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo - SP
2005

MICHELLA SOARES COELHO ARAÚJO

**Obesidade e resistência à insulina induzida
pela restrição crônica no consumo de sal em
ratos Wistar: efeitos sobre o balanço
energético, sistema renina-angiotensina (SRA)
e sinalização da insulina**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Joel C. Heimann

Colaboradores: Prof^a. Dra. Dulce Elena Casarini
Prof^a. Dra. Jacqueline Luz
Dra. Luzia Naôko Shinohara Furukawa
Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad
Prof^a. Dra. Miriam Stermán Dolnikoff
Dra. Patrícia de Oliveira Prada
Dra. Silvana Chiavegatto

São Paulo - SP
2005

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Coêlho, Michella Soares.

Obesidade e resistência à insulina induzida pela restrição crônica de sal em ratos Wistar: efeitos sobre o balanço energético, sistema renina-angiotensina (SRA) e sinalização da insulina / Michella Soares Coêlho. -- São Paulo, 2005.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Efeitos da variação do consumo de sal sobre a obesidade e resistência à insulina.

Versão do título para o inglês: Obesity and insulin resistance due to chronic low salt intake in Wistar rats: effects on energy balance, renin-angiotensin system (RAS) and insulin signaling.

Descritores: 1. Sal 2. Obesidade 3. Balanço energético 4. Sistema renina-angiotensina (SRA) 5. Leptina e adiponectina 6. Sinalização da insulina. I. Heimann, Joel Cláudio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB158/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

Candidata: Michella Soares Coêlho Araújo.

Título da Tese: Obesidade e resistência à insulina induzida pela restrição crônica no consumo de sal em ratos Wistar: efeitos sobre o balanço energético, sistema renina-angiotensina (SRA) e sinalização da insulina.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 09/12/2005 considerou a

(X) Aprovada

() Reprovada

1. Examinador(a): Assinatura _____
Nome: **Dr. Joel Claudio Heimann**
Instituição: **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.**
2. Examinador(a): Assinatura _____
Nome: **Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes**
Instituição: **Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.**
3. Examinador(a): Assinatura _____
Nome: **Dra. Maria Luiza M. Barreto de Chaves**
Instituição: **Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.**
4. Examinador(a): Assinatura _____
Nome: **Hélio Cesar Salgado**
Instituição: **Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.**
5. Examinador(a): Assinatura _____
Nome: **Mario José Abdalla Saad**
Instituição: **Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 096/2001, sobre o projeto intitulado "*Obesidade induzida por restrição crônica no consumo de sal na dieta em ratos Wistar: participação do sistema nervoso simpático de alterações metabólicas e hormonais*", sob a responsabilidade de **Michella Soares Coelho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 17/09/2001.

(We certify that the protocol nº 096/2001 about "*Obesity induced by chronic dietary salt restriction in Wistar rats: Role of sympathetic nervous system and disorders of metabolic and hormonal profile*" agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 17/09/2001 meeting.)

São Paulo, 17 de setembro de 2001.

Prof. Dra. Estela Maris A. F. Bevilacqua
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Maria Inês Nogueira
Secretária da CEEA

*À minha querida família,
Ao meu estimado esposo,
À amiga Carla,*

*Pelo amor, incentivo e aceitação incondicional da minha dedicação à pesquisa
científica.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Joel C. Heimann pela oportunidade, confiança e orientação exemplar neste projeto de pesquisa. Muito obrigada pela acolhida em seu laboratório e por todos os ensinamentos.

À Dra. Luzia Naôko Shinohara Furukawa pelo exemplo de ética profissional e participação efetiva durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Miriam Sterman Dolnikoff pela colaboração incondicional no desenvolvimento deste projeto.

À Professora Dra. Jacqueline Luz e a aluna Mariana Doce Passadore pela colaboração na avaliação do estudo do balanço energético (Departamento de Fisiologia da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP).

À Dra. Silvana Chiavegatto e o aluno Theo Bibancos pela colaboração nos experimentos de atividade motora espontânea (Departamento de Psiquiatria do Instituto de Psiquiatria e Instituto do Coração da Universidade de São Paulo).

À Dra. Irene Lourdes Noronha e a Bióloga Ivone Braga Oliveira pela colaboração na técnica de imuno-histoquímica (Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP).

À Professora Dra. Dulce Elena Casarini pela colaboração nas dosagens de ANGIO II (Departamento de Clínica Médica da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP).

Ao Professor Dr. Mario José Abdalla Saad e a Dra. Patrícia de Oliveira Prada por acreditar no meu potencial e pela colaboração no estudo da sinalização da insulina (Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).

À Bióloga Luciana Faria de Carvalho pela preparação dos cortes histológicos.

Ao Wagner Vasques Dominguez pela ajuda nas dúvidas de estatística e informática.

As secretárias Denise C. Duarte, Marineide Ribeiro, Selma R. Malaqueta Rigonati e Julieta A. G. dos Santos pela constante colaboração.

Ao Walter Campestre e a Janice das Graças Pião da Silva pela dedicação e ajuda no cuidado com animais e materiais utilizados neste estudo.

À amiga de Pós-Graduação Luciene Lima Furukawa pela ajuda e pela colaboração nos resultados de ANGIO II.

Aos amigos, alunos e ex-alunos do Laboratório de Hipertensão Experimental da FMUSP (Alexandre, Armando, Bete, Daniela, Daniele, Gilson, Giuliana, Karen, Luciene, Nauilo, Patrícia e Sandra).

Ao Departamento de Clínica Médica (Disciplina Nefrologia) da FMUSP pelo constante apoio durante a Pós-Graduação.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Estado do Tocantins pelos ensinamentos durante minha graduação.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 ANIMAIS	30
2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
2.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO	31
2.3.1 Preparo das amostras para medida do conteúdo de calorias	32
2.3.1.1 Carcaça	32
2.3.1.2 Bolo fecal	33
2.3.1.3 Ração	33
2.3.2 Medida do conteúdo de calorias	33
2.3.3 Cálculos do balanço energético	34
2.4 COMPOSIÇÃO CORPORAL	34
2.4.1 Extração e quantificação de lipídios totais	34
2.4.2 Quantificação da proteína total	35
2.4.3 Porcentagem de água corporal	35
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA	35
2.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	37
2.6.1 Dosagem de leptina - LEP	37
2.6.2 Dosagem de insulina e adiponectina	37
2.6.3 Glicemia basal	37
2.7 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL - PAc	37
2.8 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA UCP1 NO TECIDO ADIPOSEO	38
2.8.1 Soluções	38
2.8.2 Procedimento para extração da proteína tecidual	40
2.8.3 "Immunoblotting"	40
2.9 QUANTIFICAÇÃO DE ANGIO II PLASMÁTICA E TECIDUAL	41
2.9.1 Preparação do coquetel de inibidores de peptidases	41
2.9.2 Procedimento para extração dos tecidos	41
2.9.3 Quantificação da concentração de ANGIO II	41
2.10 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA ANGIO II	42
2.10.1 Processo de parafinização dos tecidos	42

2.10.2 Corte do tecido no micrótomo	43
2.10.3 Revestimento das lâminas com gelatina	43
2.10.4 Desparafinização	44
2.10.5 Técnica estroptavidina/fosfatase alcalina para ANGIO II	44
2.10.6 Análise das lâminas	45
2.11 CÁLCULO DO ÍNDICE DE HOMA E QUANTIFICAÇÃO DA OBESIDADE	45
2.12 SINALIZAÇÃO DA INSULINA	46
2.12.1 Procedimento para extração das proteínas teciduais	46
2.12.2 Imunoprecipitação - IP	47
2.12.3 "Immunoblotting" - IB	47
2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3. RESULTADOS	49
3.1 Pressão arterial	49
3.2 Peso corporal, balanço energético, composição corporal e expressão da proteína UCP1	49
3.3 Glicemia e perfil hormonal	50
3.4 Atividade motora espontânea	50
3.5 ANGIO II plasmática e tecidual	51
3.6 Expressão tecidual e fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização da insulina	51
3.6.1 Sinalização da insulina no fígado	52
3.6.2 Sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio	52
3.6.3 Sinalização da insulina no tecido adiposo branco	53
3.6.4 Fosforilação do fator de transcrição gênica Foxo1 no fígado, músculo e tecido adiposo	54
4. RESUMO DOS RESULTADOS	75
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Pressão arterial caudal	55
Figura 2A	Evolução ponderal	55
Figura 2B	Consumo de ração diário	55
Figura 3A	Ingestão hídrica	56
Figura 3B	Volume urinário	56
Figura 04	Energia ingerida	56
Figura 5A	Porcentagem de energia absorvida	57
Figura 5B	Energia metabolizável	57
Figura 5C	Energia fecal	57
Figura 6A	Ganho de energia	58
Figura 6B	Gasto de energia	58
Figura 07	Expressão da proteína UCP-1 no TAM	58
Figura 8A	Conteúdo de proteína total na carcaça	59
Figura 8B	Conteúdo de lipídios totais na carcaça	59
Figura 8C	Porcentagem de água corporal	59
Figura 09	Concentração de leptina plasmática	60
Figura 10	Concentração de adiponectina sérica	60
Figura 11	ANGIO II no tecido adiposo marrom (TAM)	61
Figura 12	ANGIO II no tecido adiposo branco (TAB) mesentérico	62
Figura 13	ANGIO II no tecido adiposo branco retroperitoneal	63
Figura 14	ANGIO II no hipotálamo	64
Figura 15	Sinalização da insulina no fígado	65
Figura 16	Sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio	66
Figura 17	Sinalização no tecido adiposo branco periepídidimo	67
Figura 18	Atividade da Foxo1 no fígado, músculo e tecido adiposo	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre o balanço energético e composição corporal em ratos na 12 ^a semana de vida.	69
Tabela 02 - Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a pressão arterial, glicemia e perfil hormonal em ratos na 12 ^a semana de vida.	70
Tabela 03 - Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a atividade motora geral em ratos com 8 semanas de vida.	71
Tabela 04 - Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a atividade motora geral em ratos com 12 semanas de vida.	72
Tabela 05 - Concentração de angiotensina II no plasma, tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB) periepididimal em ratos com 12 semanas de vida.	73
Tabela 06 - Quantificação de angiotensina II por imuno-histoquímica no tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) e hipotálamo em ratos com 12 semanas de vida.	73
Tabela 07 - Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a adiposidade visceral e índice de HOMA em ratos na 12 ^a semana de vida.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Acrp30:	<i>Adipocyte complement-related protein</i>
AdipoQ e GBP28:	<i>Gelatin binding protein</i>
ADP:	<i>Adiponectina</i>
ADP1:	Receptor de adiponectina do tipo 1
AGT:	<i>Angiotensinogênio</i>
Akt:	Proteína quinase B
ANGIO II:	Angiotensina II
ANOVA:	<i>Análise de variância</i>
apM1:	<i>Adipose most abundant gene transcript 1</i>
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
Foxo1:	Fator de transcrição gênica
HO:	Dieta hipossódica
HOMA-IR:	<i>Homeostasis model of assessment</i>
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR:	Dieta hipersódica
IB:	<i>Immunoblotting</i>
<i>Ip:</i>	Intraperitonal
IP:	Imunoprecipitação
IR:	Receptor de insulina
IRS-1:	Substrato 1 do receptor da insulina
IRS-1 ^{ser307} :	Resíduos de serina 307 do IRS-1
IRS-2:	Substrato 2 do receptor da insulina
JNK:	Proteína c-jun NH ₂ -terminal quinase
LEP:	Leptina
NR:	Dieta normossódica
PAc:	Pressão arterial caudal
PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAI-1:	Inibidor do ativador de plasminogênio
PI-3q:	Enzima fosfatidilinositol 3-quinase
p-OHHgBnz:	<i>p</i> -ácido hidroximercuribenzóico
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SNS:	Sistema nervoso simpático
SRA:	Sistema renina-agiotensina-aldosterona
STAT3:	Transdutor de sinalização e ativador de transcrição 3
TAB:	Tecido adiposo branco
TAM:	Tecido adiposo marrom
TNF α :	Fator de necrose tumoral alfa
UCP-1:	Proteína desacopladora mitocondrial 1
Yp:	Anticorpo antifosforotirosina

RESUMO

Coêlho MS. Obesidade e resistência à insulina induzida pela restrição crônica no consumo de sal em ratos Wistar: efeitos sobre o balanço energético, sistema renina-angiotensina (SRA) e sinalização da insulina. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

A restrição de sal na dieta está associada com resistência à ação da insulina e obesidade. O mecanismo molecular pelo qual a dieta hipossódica (HO) pode induzir resistência à insulina e obesidade não está totalmente compreendido. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da ingestão crônica de sal sobre o peso corporal (PC), sinalização da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo branco (TAB) e sua associação com adiposidade e resistência à insulina. Com esta finalidade, ratos Wistar foram alimentados com dieta HO, normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame. O PC foi avaliado desde o desmame. Ao completarem 12 semanas de vida, foram avaliados pressão arterial, balanço energético, consumo de ração, glicemia, angiotensina II (ANGIO II) plasmática e perfil hormonal. A atividade motora espontânea foi estudada em ratos com 8 e 12 semanas. A sensibilidade à insulina foi analisada pelo índice de HOMA. A expressão da proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP-1) foi quantificada no tecido adiposo marrom (TAM) e o conteúdo de ANGIO II no TAM, TAB e hipotálamo. As etapas iniciais da sinalização da insulina foram avaliadas por imunoprecipitação e *immunoblotting* das proteínas envolvidas como o receptor da insulina (IR), substrato 1 e 2 do IR (IRS-1 e IRS-2), enzima fosfatidilinositol 3 - quinase (PI-3q), proteína quinase B (Akt/PKB), ativação da proteína c-jun NH₂-terminal quinase (JNK) e fosforilação em serina 307 do IRS-1. O PC no desmame foi semelhante entre os grupos de dieta. No entanto, na idade adulta os ratos em dieta HO apresentaram maior PC, adiposidade visceral, glicemia e insulinemia de jejum, concentração de ANGIO II plasmática e aumento do conteúdo de ANGIO II no TAM. Por outro lado, nestes mesmos animais a dieta HO diminuiu o consumo de ração, o gasto energético, a expressão da proteína UCP-1, adiponectina plasmática e o conteúdo de ANGIO II no TAB. A atividade motora não foi diferente entre os grupos estudados. A dieta HO diminuiu a via IR/PI-3q/Akt/Foxo1 de sinalização da insulina no fígado e músculo. Por outro lado, parte desta via (IRS-2/Akt/Foxo1) mostrou-se aumentada no TAB. No fígado e músculo houve um aumento da fosforilação da proteína JNK associada com maior fosforilação do IRS-1^{ser307} no grupo HO. Em conclusão, a restrição ou sobrecarga crônica de sal altera a evolução ponderal associada com modificações no balanço energético e no perfil hormonal na idade adulta. A resistência à insulina induzida pela dieta HO é tecido-específico e foi acompanhada por uma ativação da proteína JNK e um aumento da fosforilação dos resíduos de serina 307 do IRS-1.

Palavras-chave: Sal, obesidade, balanço energético, SRA, resistência à insulina, leptina, adiponectina, sinalização da insulina.

ABSTRACT

Coêlho MS. Obesity and insulin resistance due to chronic low salt intake in Wistar rats: effects on energy balance, renin angiotensin system (RAS) and insulin signaling. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

Restriction of sodium chloride intake has been associated with insulin resistance (INS-R) and obesity. The molecular mechanisms by which the low salt diet (LSD) can induce INS-R and obesity have not yet been established. The aim of the present study was to evaluate the influences of salt intake on body weight (BW) and on insulin signaling in liver, muscle and white adipose tissue (WAT). Wistar rats were fed a LSD, normal (NSD), or high (HSD) salt diet since weaning. At 12 weeks of age, BW, blood pressure (BP), energy balance, food intake, plasma glucose and angiotensin II (ANGIO II), and hormonal profile were evaluated. Afterward, motor activity, HOMA index, uncoupling protein 1 expression (UCP-1) and tissue adipose ANGIO II content was determined. The early steps of insulin signaling (IR: insulin receptor, IRS-1 and IRS-2: IR substrate 1 and 2, PI-3K: phosphatidylinositol 3-kinase), Akt (protein kinase B) phosphorylation, JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) activation and IRS-1^{ser307} (serine 307 of IRS-1) phosphorylation were evaluated by immunoprecipitation and immunoblotting. LSD increased BW, visceral adiposity, blood glucose, insulin, leptin, plasma ANGIO II and its content in BAT. Otherwise, LSD decreased food intake, energy expenditure, UCP-1 expression, adiponectin and ANGIO II content in WAT. Motor activity was not influenced by the dietary salt content. In LSD, a decreasing in IR/PI-3K/Akt/Foxo1 was observed in liver and muscle and an increase in this pathway was showed in adipose tissue. JNK activity and IRS-1^{ser307} phosphorylation were higher in liver and muscle. In conclusion, LSD induced obesity and insulin resistance due to changes in energy expenditure, SRA and insulin signaling. The INS-R is tissue-specific and is accompanied by JNK activation and IRS-1^{ser307} phosphorylation.

Key-words: Salt, Obesity, Energy Balance, RAS, Insulin resistance, Leptin, Adiponectin, Insulin Signaling.

1. INTRODUÇÃO

Estudos em animais de experimentação (Dahl et al., 1962, Denton et al., 1995, da Costa Lima et al., 1997), em grupos de seres humanos (McGregor et al., 1989, Cutler et al., 1991, Law et al., 1991, Mascioli et al., 1991) e epidemiológicos (Meneely et al., 1958, Denton et al., 1997) mostraram que o cloreto de sódio exerce um papel importante na regulação da pressão arterial. Em função deste conhecimento, a restrição de sal na dieta é recomendada como um dos tratamentos não medicamentosos para a hipertensão arterial (WHL, 1993, JNC VII 2003). No entanto, alguns trabalhos (Iwaoka et al., 1988, Ruppert et al., 1991, Fliser 1995) demonstraram efeitos colaterais desta restrição, relatando alterações no metabolismo de glicose (hiperinsulinemia e resistência à insulina).

Em estudos anteriores deste laboratório verificou-se em ratos Wistar alimentados com dieta hipossódica alterações no metabolismo de glicose e no peso corpóreo, diminuição do número de receptores de insulina, menor captação de glicose e ausência de diferenças na sensibilidade à insulina em adipócitos isolados (da Costa Lima et al., 1997). Em estudos subseqüentes, a sensibilidade à insulina foi avaliada, *in vivo*, pelo método do "clamp" euglicêmico hiperinsulinêmico e os resultados mostraram menor sensibilidade à insulina, aumento da massa adiposa, maior atividade da renina plasmática (Prada et al., 2000) e alterações no metabolismo de lipídios (Catanozi et al., 2001). No entanto, estes estudos não avaliaram o mecanismo pelo qual a restrição de sal na dieta aumenta o peso corporal e induz resistência à insulina.

Uma revisão sistemática da literatura referente à restrição de sal na dieta e pressão arterial, realizada por John Swales (2000) sugere que em termos populacionais não existem dados suficientes na literatura para recomendação da diminuição do consumo de sal na dieta como tratamento totalmente benéfico à saúde de pacientes hipertensos. No entanto, Norman Kaplan (2000) analisando dados da literatura, incluindo trabalhos epidemiológicos, observacionais e intervencionistas, concluiu que a redução do

consumo de sal na dieta apresenta mais efeitos positivos do que negativos para saúde.

Apesar de não haver mais dúvidas que o aumento da pressão arterial está associado com maior risco de complicações cardiovasculares, renais e mortalidade, não existem dados conclusivos, em termos populacionais, que a restrição de sal na dieta diminui estes riscos.

Inúmeros estudos relataram uma associação entre hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes mellitus do tipo 2 e obesidade (Ferrannini et al., 1987, Reaven 1988, Ferrannini et al., 1991, Ravussin et al., 1992, Hsueh et al., 1994, Freidman 2000, Sharma et al., 2005). Entretanto, as complicações e o grau de associação entre estas doenças, ainda hoje são motivos de estudos e controvérsias, onde variáveis (idade, sexo, raça, hábito alimentar, quantidade de massa adiposa, peso corporal e atividade física) podem modular a intensidade destas interações (Kuczmarski et al., 1994), sendo um fator prognóstico para diminuição da longevidade (Chan et al., 1994, Colditz et al., 1995, Stevens et al., 1998).

A obesidade é um fator de risco que aumenta a prevalência de doenças crônicas e mortalidade tanto em homens quanto em mulheres (Ohlson et al., 1985, Stamler et al., 1989, Schapira et al., 1994, Chan et al., 1994, Monson et al., 1995, Colditz et al., 1995, Lissener et al., 1995).

Um estudo epidemiológico realizado em Estocolmo, analisando fichas hospitalares de 504 crianças e acompanhadas por 40 anos, mostrou que a mortalidade por doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, hipertensão arterial e certos tipos de câncer foi maior nos indivíduos obesos (DiPietro et al., 1994). Outros estudos verificaram que o risco relativo de mortalidade por todas as causas associadas com obesidade foi maior nos indivíduos entre 30 e 40 anos (Stevens et al., 1998) e o aumento da adiposidade visceral foi relacionado com complicações metabólicas (Kissebah et al., 1982).

Os fatores que influenciam o desenvolvimento da obesidade podem ser genéticos e ambientais. Os mecanismos genéticos quando presentes podem ser inibidos por fatores ambientais (Bouchard, 1991).

A influência da dieta é um dos fatores ambientais mais estudados na gênese da obesidade (Golay et al., 1997, Kopelman 2000). Num trabalho de tendência secular, após análise de dados históricos de peso corporal de homens convocados para as forças armadas entre 1935 e 1977, os autores verificaram um aumento da prevalência da obesidade precedido por aumento do consumo de dieta rica em gordura neste período na Dinamarca (Sonne-Holm et al., 1977). Estudos epidemiológicos retrospectivos foram realizados na tentativa de correlacionar a influência dos hábitos alimentares e da prevalência da obesidade. De 13 estudos revisados por Lissner et al. (1995), 11 mostraram correlação positiva entre porcentagem de dieta rica em gordura e obesidade. No entanto, estes estudos podem somente estabelecer a associação estatística entre as duas variáveis, eles não necessariamente indicam uma relação de causa e efeito. Neste contexto, Pudel et al. (1995) analisando informações de 200.000 participantes do sexo masculino e feminino do "*Nationwide Preventive Health Programme*" na Alemanha relataram que em indivíduos obesos ocorre um pequeno, mas sistemático, aumento no índice da massa corporal (IMC) associado com o tipo de dieta ingerido. Por outro lado, o estudo "*WHO-MONICA*" realizado em 18 países da Europa, não evidenciou em homens nenhuma relação da dieta com o aumento do IMC (WHO 2000). Além da dieta, fatores comportamentais e sócio-demográficos podem influenciar no ganho de peso corporal. O estudo prospectivo de Rissanen et al. (1991) avaliando duas vezes 12.669 adultos na Finlândia num intervalo de 5 anos, verificou maior ganho de peso corporal nos indivíduos com doenças crônicas, sedentários, fumantes e com menor grau de escolaridade. Em suma, estes estudos populacionais mostraram uma relação entre hábitos alimentares e prevalência da obesidade.

Atualmente, a obesidade é um problema crescente e oneroso de saúde na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, estima-se que 50% da população adulta tem excesso de peso e 22% é obesa. Na Europa, a obesidade atinge de 15 a 20% da população adulta (WHO 1997). No Brasil, segundo Filozof et al. (2001), 35% da população adulta tem excesso de peso corporal. Ao contrário do que se observou nos Estados Unidos e em alguns países europeus, a realização de inquéritos populacionais de representatividade nacional não ocorre de forma sistemática, e os dados disponíveis são de pesquisas sobre o perfil nutricional da população brasileira.

Para a Organização Mundial de Saúde (WHO 2000) em termos populacionais a obesidade em adultos é caracterizada como índice de massa corporal (IMC) igual ou maior a 30kg/m^2 e excesso de peso quando o IMC variar de 25 a $29,9\text{ kg/m}^2$. Apesar das limitações desta medida, estudos mostraram uma relação positiva entre risco relativo de mortalidade e IMC (Stamler et al., 1986). O uso do IMC foi indicado como uma estratégia para padronizar a comparação dos estudos populacionais e facilitar a identificação de indivíduos e grupos dentro da população com maior risco de morbidade e mortalidade.

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial definida como um excesso de massa de tecido adiposo (Kolpeman 2000) e o aumento desta massa podem ocorrer em função das alterações crônicas no balanço energético (Jéquier 2002).

Os componentes do balanço energético são a ingestão calórica e o gasto energético (Wynne et al., 2005). O primeiro refere-se a todo alimento ingerido que possa ser metabolizado pelo organismo. O gasto energético é a soma do gasto metabólico basal, efeito térmico da dieta (produção de calor induzida pela alimentação) e atividade física (Bouchard et al., 1993).

O balanço energético, em condições fisiológicas, é mantido por um equilíbrio entre a ingestão calórica e gasto energético. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio, a longo prazo, entre estas variáveis, o balanço

energético pode ser positivo (ingestão calórica maior do que o gasto energético) favorecendo o desenvolvimento da obesidade ou negativo (ingestão calórica menor do que o gasto energético) induzindo a diminuição do estoque energético e peso corporal (Leibel et al., 1995, Jéquier 2002, Wynne et al., 2005). O desequilíbrio no balanço energético só ocorre a longo prazo, mas segundo Jéquier (2002) um excesso de 5% da ingestão calórica em relação ao gasto energético, durante um ano, é suficiente para induzir um ganho de 5kg de massa adiposa, sendo assim, importante para o desenvolvimento da obesidade. Além disso, estudos relataram evidências de que o estilo de vida sedentário aumenta a prevalência da obesidade (Prentice et al., 1996) e existe uma relação inversa entre IMC e atividade física (Westterterp et al., 1997).

A proporção em que cada um dos componentes do balanço energético contribui para a regulação do peso corporal é específica para cada indivíduo e dependente do estilo de vida e de outros fatores ambientais.

Como já mencionado em estudos anteriores do nosso laboratório, a restrição crônica de sal na dieta é um dos fatores ambientais associados com obesidade em ratos na idade adulta. Assim sendo, seria importante investigar a participação dos componentes do balanço energético na regulação do peso corporal de ratos alimentados com restrição de sal na dieta.

Tecido adiposo e regulação do peso corporal

Os mecanismos que participam da regulação do peso corporal e adiposidade não estão totalmente compreendidos. No entanto, inúmeros estudos mostraram que o controle do peso corporal depende de um circuito complexo de sinalização envolvendo fatores periféricos e centrais inter-relacionados e auto-ajustáveis com influência sobre o balanço energético (Sahu 2004).

Na década de 50, surgiu a hipótese de que o tecido adiposo tem um papel importante na regulação do peso corporal em associação com centros hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar (Kennedy 1953). Estudos em roedores demonstraram que lesão no núcleo ventromedial induzia hiperfagia e

obesidade e estimulação no núcleo lateral do hipotálamo foi associada com afagia (Hetherington et al., 1940, Anand et al., 1951). Num estudo seguinte, ficou evidenciado a participação conjunta do tecido adiposo e hipotálamo na regulação do peso corporal. Neste estudo, 2 ratos foram submetidos a uma *parabiose* (circulação sanguínea cruzada entre 2 ratos). Um destes animais também foi submetido à lesão no hipotálamo ventromedial, o qual induziu o aumento da massa de tecido adiposo. O rato que manteve o hipotálamo intacto apresentou perda de peso por inibição da ingestão alimentar. Os autores concluíram que o aumento da massa adiposa do animal obeso secretava um "fator de saciedade" que não tinha efeito nele em função da sua lesão, mas agia no hipotálamo do rato intacto inibindo sua ingestão alimentar (Hervey 1959). Na época, foi sugerido que existia um "fator de saciedade" liberado pelo tecido adiposo que estimulava áreas do hipotálamo responsáveis pelo controle da ingestão alimentar. No entanto, a hipótese foi pouco aceita, pois o tecido adiposo era visto como um lugar para armazenamento de "gordura corporal".

A importância do tecido adiposo na regulação do peso corporal só foi realmente reconhecida na década de 80 (Siiteri 1987) após a descoberta da síntese e secreção de substâncias neste tecido. Atualmente, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino complexo e com atividade metabólica (Ahima et al., 2000, Kershaw et al., 2004, Gimeno et al., 2005). Este tecido, além de responder a sinalização proveniente do SNC e sistemas hormonais é capaz de expressar e secretar várias substâncias com ação local e sistêmica. Estas substâncias incluem a leptina, adiponectina, adiponutrina, adipisina, TNF- α (fator de necrose tumoral α), resistina, interleucinas, PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio), enzimas envolvidas no metabolismo de glicocorticóides, componentes do sistema renina-angiotensina (SRA), que são chamadas em conjunto de adipocitocinas (Matsuzawa et al., 1999, Ahima et al., 2000). A função metabólica do tecido adiposo é dependente, em parte, das

ações e efeitos local e sistêmico das adipocitocinas no controle da adiposidade (Kershaw et al., 2004).

Leptina (16kDa)

A descoberta da leptina (Zhang et al., 1994) também mostrou que o tecido adiposo participa ativamente do controle do gasto energético e do peso corporal (Ahima et al., 2000). Este polipeptídeo é produzido pelo tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom - TAM (Moinat et al., 1995, Moraes 2003) e em menor quantidade em outros tecidos (Masuzaki et al., 1997, Bado et al., 1998, Jin et al., 2000).

Após a descoberta do receptor da leptina (Tataglia et al., 1995), o papel fisiológico deste hormônio foi objeto de intensa investigação, não somente na regulação do peso corporal, mas também em outras ações fisiológicas como na reprodução, formação de osso e no sistema cardiovascular.

A síntese e secreção da leptina pelos adipócitos são influenciadas pelo estoque energético e é proporcional ao tamanho e número de adipócitos (Sindelar et al., 1999). Outros fatores podem regular a síntese e secreção da leptina. É conhecido que a insulina, glicocorticóides e TNF- α estimulam sua liberação nos adipócitos, enquanto ácidos graxos livres, atividade β -adrenérgica e PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) inibem a liberação da leptina. A distribuição regional da massa adiposa corporal é outro fator importante na determinação da expressão da leptina nos adipócitos (Zimmet 1996, Lonnqvist et al., 1997, de Silva 1998).

A ação da leptina sobre a homeostase energética ocorre através da modulação da ingestão calórica e gasto energético (Bjorbaek et al., 2004). A leptina como um mecanismo de "retroalimentação negativa" proveniente do tecido adiposo age em áreas hipotalâmicas responsáveis pelo controle da ingestão alimentar (Campfield et al., 1995, Frederich et al., 1995, Maffei et al., 1995, Considine et al., 1996, Ahima RS et al., 2000, Kershaw et al., 2004), modulando o comportamento alimentar e aumentando o gasto energético (Ahima

et al., 2000, Gimeno et al., 2005) para reduzir o peso corporal (Halaas et al., 1995). Esta ação pode ocorrer por modulação direta em duas populações de neuropeptídeos hipotalâmicos os orexigênicos e anorexigênicos (Pellymounter et al., 1995), reduzindo e aumentando sua expressão, respectivamente.

Segundo Flier (2004), a restrição alimentar reduz a concentração da leptina circulante como uma resposta fisiológica adaptativa ao "jejum" seguida por diminuição do gasto energético e aumento do "apetite". Em humanos e roedores obesos, que não expressam o gene da leptina, respostas semelhantes são observadas, diminuição do gasto energético e aumento do "apetite". Por outro lado, em outros tipos de obesidade foi observado aumento de leptina circulante. Os autores verificaram, ainda, que altas doses de leptina exógena não diminuem excesso de peso nestes obesos (Bjorbaek et al., 2004), sendo consistente com estados de resistência à ação da leptina (Flier 2004).

O mecanismo de resistência à leptina não está totalmente compreendido. Porém, é sugerido uma falha na sinalização da leptina ou no seu transporte para o hipotálamo (Banks et al., 1996, Bjorbaek et al., 2004, Flier 2004). Scarpace et al. (2000) relataram uma associação entre grau de obesidade e resistência a leptina em ratos Brown Norway alimentados com dieta com alto teor calórico. Estes animais apresentaram um aumento gradual da leptina circulante associada com maior adiposidade e maior peso corporal. No entanto, estes resultados não foram acompanhados por um aumento gradual na ingestão alimentar. Os autores verificaram ainda uma diminuição da transmissão da sinalização da leptina no hipotálamo com redução da fosforilação da proteína STAT3 (transdutor de sinalização e ativador de transcrição 3). Atualmente, considera-se que a proteína STAT3 é um fator importante para a transdução do sinal da leptina no hipotálamo.

Sendo assim, existiu a necessidade de investigar a participação da leptina na obesidade induzida pela dieta hipossódica.

Adiponectina (ADP, 30kDa)

A ADP foi caracterizada em 1995 e 1996 por grupos diferentes e inicialmente foi chamada de apM1, Acrp30, adipoQ e GBP28 (Maeda et al., 1996; Nakano et al., 1996, Hu et al., 1996). Em estudo subsequente, foram identificados dois tipos de receptores para ADP, o ADP1 expresso no músculo e ADP2 expresso do fígado (Yamauchi et al., 2003). É relatado que as diferentes isoformas da ADP, em concordância com dois tipos de receptores, ativam vias distintas para a transdução (fator nuclear kappa B [NF- κ B] ou proteína AMPK [*AMP-activated protein kinase*]) da sua sinalização nos tecidos alvo (Tsao et al., 2002).

A ADP é uma citocina secretada pelos adipócitos e sua expressão é maior no tecido adiposo subcutâneo do que no tecido visceral (Fain et al., 2004) e sua concentração sérica é inversamente proporcional à quantidade de massa de tecido adiposo, índice de massa corporal, concentração de insulina e triacilglicerol plasmático (Weyer et al., 2001, Comuzzie et al., 2001).

Em humanos e roedores, sua concentração no sangue é diminuída em condições de obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo 2 (Ouchi et al., 1999, Hotta et al., 2000, Tsao et al., 2002). Quando a concentração de ADP está aumentada apresenta efeitos anti-inflamatórios (Kopp HP et al., 2005).

Outros estudos relataram a importância da ADP na gênese da obesidade e resistência à insulina. Camundongos com supressão do gene para ADP e alimentados com dieta rica em gordura apresentaram intolerância prematura à glicose, resistência à insulina e influxo de ácidos graxos não esterificados (Maeda et al., 2002). Resultados inversos foram observados em camundongos com expressão aumentada de ADP (Maeda et al., 2002). Em adição, a adiponectina aumenta a produção de óxido nítrico em células endoteliais e estimula a angiogênese. Estes efeitos são mediados através do aumento da

fosforilação do receptor da insulina, ativação da proteína AMPK e modulação das vias de sinalização do NF- κ B (Diez et al., 2003).

Neste contexto, ADP é um importante marcador de algumas doenças crônicas relacionadas com a obesidade, justificando sua quantificação neste modelo de obesidade e resistência induzida pela dieta hipossódica.

Proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP-1, 32kDa)

A função principal do TAM é a produção de calor que em pequenos roedores, é independente de tremor muscular e da termogênese facultativa induzida pela dieta. A capacidade calorigênica do TAM é mantida pela oxidação dos ácidos graxos provenientes dos estoques endógenos de triacilgliceróis. Um dos principais elementos responsáveis pela capacidade de dissipação de energia neste tecido é a proteína UCP-1 (Ricquier et al., 1990) que transforma a energia contida no próton mitocondrial em calor, sendo uma via alternativa de transformar energia química em térmica (Nicholls et al., 1984, Erlanson-Albertsson 2003). A UCP-1 também é chamada de termogenina ou proteína ligada ao guanosina 5' difosfato (GDP). Em um estudo de Masaki et al. (2003) foi verificado que a expressão da proteína UCP-1 no TAM é um bom marcador do gasto energético.

Em mamíferos, o TAM está localizado nas regiões interescapular, subescapular, axilar, cervical dorsal e ao longo de grandes vasos. Nos roedores, o TAM totaliza até 3% do peso corporal e a região interescapular corresponde a 25% do TAM total (Cannon et al., 2004).

O TAM frente a uma sobrecarga calórica é capaz de aumentar o gasto energético e prevenir o desenvolvimento da obesidade. Quando ocorre uma redução na ingestão calórica, ele pode agir diminuindo o gasto energético (Rothwell et al., 1979, Stock 1999). Desta forma, o TAM tem papel importante na regulação do peso corporal e gasto energético.

Sistema renina angiotensina (SRA)

É descrito que a concentração de angiotensina II (ANGIO II) local e sistêmica tem efeitos sobre o metabolismo e o crescimento do tecido adiposo (Zorad et al, 1995, Engeli et al., 2003). Os componentes do SRA como renina, angiotensinogênio (AGT), angiotensina I (ANGIO I), ANGIO II, receptores de ANGIO II do tipo 1 (AT1a, AT1b) e 2 (AT2) e enzima conversora de angiotensina (ECA) são produzidos no tecido adiposo. Em outros estudos, foi demonstrado que a expressão do AGT, ECA e receptor AT1 é maior no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo. Em humanos, alguns estudos mostraram uma correlação positiva entre adiposidade, AGT plasmático, atividade de renina plasmática, atividade da ECA e a expressão de AGT no tecido adiposo branco (Engeli et al., 2003).

O mecanismo pelo qual ANGIO II tem efeitos sobre a regulação do peso corporal é controverso. No entanto, alguns autores sugerem que a concentração de ANGIO II tem efeitos sobre o metabolismo, crescimento e diferenciação dos adipócitos (Zorad et al., 1995, Engeli et al., 2003) promovendo a lipogênese, inibindo a lipólise e indiretamente estimulando a síntese de prostaglandinas. Por outro lado, em adipócitos maduros a ANGIO II pode inibir o recrutamento de pré-adipócitos (Engeli et al., 2003).

Kouyama et al. (2005) demonstraram, em camundongos com supressão do gene para o receptor AT1a e submetidos à dieta hipercalórica, uma diminuição no ganho de peso corporal, na adiposidade e na resistência à insulina sem alteração na ingestão alimentar. Os autores também constataram um aumento do gasto energético (elevação da temperatura retal, aumento do consumo de oxigênio e maior expressão da UCP-1) e uma ativação simpática (aumento da excreção urinária de catecolaminas), além de uma modulação na produção de adipocitocinas no tecido adiposo.

Não é conhecido o mecanismo pelo qual a restrição crônica de sal na dieta induz obesidade em ratos Wistar. Sugerimos a hipótese de que mudanças no

balanço energético, no perfil hormonal, na atividade do SRA tenham participação na alteração de peso corporal e massa adiposa nestes animais (Anexo 1).

Sinalização da insulina

Desde a descoberta da insulina (Banting et al., 1922) inúmeros estudos foram desenvolvidos para tentar entender a participação deste hormônio na manutenção da homeostase glicêmica, crescimento e desenvolvimento dos tecidos e o mecanismo molecular da sua ação em função da prevalência de doenças crônicas como a obesidade, diabetes mellitus do tipo 2 e hipertensão arterial (Ferrannini et al., 1987, Reaven 1988, 1991, Hsueh et al., 1994).

A restrição crônica de sal na dieta está associada com alguns efeitos colaterais (Iwaoka et al., 1988, Sharma et al., 1990, Ruppert et al., 1991) como menor sensibilidade à insulina (Rocchini 1994, Prada et al., 2000, Okamoto et al., 2004). No entanto, não existe um consenso sobre o mecanismo molecular pelo qual a restrição de sal na dieta altera a sensibilidade à ação da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo.

A insulina desencadeia uma série de respostas biológicas e os principais tecidos alvos para a regulação da homeostase da glicose pela insulina incluem o fígado, o músculo e o tecido adiposo.

Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a ativação do seu receptor, resultando na fosforilação em tirosina de vários substratos protéicos intracelulares (Kahn 1993, Van Obberghen 1994), incluindo o IRS-1 e o IRS-2 (substratos do receptor de insulina 1 e 2). Estes substratos quando são fosforilados em tirosina se associam e ativam a enzima PI-3q (fosfatidilinositol 3 quinase). É descrito que a interação da enzima PI-3q com a proteína IRS-1 é essencial para a ação metabólica e mitogênica da insulina (Shepherd et. al., 1995). Esta etapa de associação da PI-3q com as proteínas IRSs é importante para os processos de translocação do transportador de glicose (GLUT4), captação de glicose estimulada pela insulina (Czech et. al., 1999), ativação da

glicogênio sintetase e para a inibição da lipólise estimulada pela insulina (White 1998). A PI-3q é formada por duas subunidades, uma catalítica de 110kDa e outra regulatória de p85. A subunidade regulatória possui dois domínios SH-2 que interagem com os sítios de fosforilação das proteínas IRSs (Myers et. al., 1992). A ativação da PI-3q catalisa a fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3D formando fosfatidilinositol 3-fosfato o qual se liga a domínios PH e regulam diversas moléculas sinalizadoras (as proteínas serina/treonina quinase da família das proteínas quinases). Dentre elas a melhor caracterizada é a quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos (PDK-1) que é uma serina quinase capaz de fosforilar e ativar a proteína Akt (Le Roith et. al., 2001). A proteína Akt/PKB (proteína quinase B) ativada aumenta a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação do GLUT4, aumenta a síntese de glicogênio no músculo e no fígado pela fosforilação e inibição da quinase da glicogênio sintetase 3 (GSK3) e aumenta a lipogênese pela ativação de fatores de transcrição nucleares (Le Roith et al., 2001, Saltiel et. al., 2001).

O fator de transcrição Foxo1 (*Forkead Box Containing Protein Q Sub-family*) é sensível à ação da insulina e regulado por algumas proteínas sinalizadoras. A enzima PI-3q é um dos principais reguladores deste fator de transcrição para mediar os efeitos da insulina e dos fatores de crescimento sobre a expressão gênica após a sinalização da PI-3q e da proteína Akt (Anexos 2, 10 e 11).

Entre os mecanismos que contribuem para alterações na sinalização da insulina, há a fosforilação da serina dos substratos IRS por algumas proteínas como a c-jun NH₂-terminal quinase (JNK). A JNK é uma proteína membro da família MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*). É conhecido que existem três isoformas desta proteína, a JNK1, JNK2 e JNK3 (Ip et al., 1998). Estudos mostraram que a atividade da proteína JNK pode interferir negativamente na sinalização da insulina (Aguire et al., 2002, Lee et al., 2003). Os autores mostraram ainda que a ativação da JNK pode induzir fosforilação em serina 307

do substrato IRS-1, inibindo a interação do IR ativado com este substrato, prejudicando a transdução da sinalização a insulina (Anexo 3).

Neste contexto, do exposto da literatura e dos resultados obtidos neste Laboratório surgiram as seguintes perguntas:

1. Quais os mecanismos envolvidos com alterações de peso corporal associadas com modificações no aporte de sal na dieta?
2. Alterações no perfil hormonal e no balanço energético podem explicar as diferenças de peso corporal e consumo de ração nestes animais?
3. Qual a participação do sistema-renina-angiotensina-aldosterona local e sistêmico na regulação do peso corporal neste modelo experimental?
4. O maior peso corporal dos ratos em dieta hipossódica é decorrente de uma menor atividade motora espontânea?
5. Alterações na via de sinalização da insulina podem explicar a menor sensibilidade à insulina induzida por restrição de sal na dieta?

Com intuito de entender melhor os efeitos da dieta hipossódica sobre a obesidade e a resistência à insulina, o presente estudo teve como objetivos:

Avaliar os possíveis mecanismos pelos quais a sobrecarga ou restrição crônica de sal na dieta tem influência no peso corporal.

Avaliar os efeitos da restrição de sal na dieta sobre a sinalização da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo e sua associação com a adiposidade visceral e com a resistência à insulina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto de pesquisa estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP.

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que logo após o desmame (3ª semana de idade), foram divididos em três grupos e receberam dieta (Harlan Teklad, Madison-WI/EUA): hipossódica - HO (0,15% NaCl e 25% de proteína), normossódica - NR (1,27% NaCl e 25% de proteína) ou hipersódica - HR (7,94% NaCl e 25% de proteína) *ad libitum* até a 12ª semana de idade. No protocolo 4, houve uma exceção, os animais foram divididos em dois grupos e receberam somente dieta NR ou HO.

O fornecimento de ração e de água potável foi *ad libitum* durante o período de estudo.

Os ratos foram acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm) com até 4 animais por gaiola e mantidos em ambiente a 25°C e com ciclos claro-escuro fixos de 12/12 horas.

2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Em todos os protocolos experimentais o peso corporal dos animais foi avaliado (semanalmente ou diariamente) do desmame à idade adulta.

Os experimentos foram divididos em quatro protocolos, descritos a seguir, com objetivo de avaliar os efeitos da restrição de sal sobre a regulação do peso corporal (protocolos 1, 2 e 3) e sobre a sinalização da insulina e sua associação com a adiposidade e resistência à insulina (Protocolo 4 e Anexo 4).

Protocolo 1: Avaliação do balanço energético (calorimetria direta), da composição corporal (lipídios, proteína e porcentagem de água), do consumo de

ração, volume urinário e ingestão hídrica em ratos com 12 semanas de idade e alimentados com dieta HO, NR ou HR desde o desmame.

Protocolo 2: Medida da atividade motora espontânea, glicemia de jejum, perfil hormonal (leptina, insulina e adiponectina), pressão arterial e expressão da proteína UCP-1 em ratos com 8 e/ou 12 semanas de idade nas dietas HO, NR ou HR.

Protocolo 3: Avaliação do SRA sistêmico e local em ratos com 12 semanas de idade nas dietas HR, NR ou HO. A ANGIO II foi quantificada no TAB periepídídimo e TAM por HPLC, e pela técnica de imuno-histoquímica quantificada e visualizada no hipotálamo, TAB retroperitoneal, TAB mesentérico e TAM.

Protocolo 4: Avaliação da transdução do sinal da insulina, estudando a expressão tecidual e o grau de fosforilação das proteínas envolvidas nesta via (IR, IRS-1, IRS-2, PI-3q, JNK, IRS-1^{ser307}, Akt e Foxo1) por imunoprecipitação e "immunoblotting" no fígado, músculo e TAB em ratos com 12 semanas de idade nas dietas HO e NR. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice HOMA e a obesidade pela medida da massa de tecido adiposo.

2.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO

A evolução ponderal foi acompanhada semanalmente do desmame até a 8ª semana de idade em ratos mantidos em gaiola de plástico. Da 8ª a 12ª semana de vida, os ratos foram pesados diariamente.

Para avaliação do balanço energético através da calorimetria e para medida da composição corporal, os ratos em dieta HO, NR ou HR foram divididos em dois subgrupos ao completarem 8 semanas de idade: grupo inicial e grupo final (Anexo 5).

GRUPO INICIAL

Os animais com 8 semanas de vida foram submetidos a jejum noturno (sem restrição de ingestão de água) e na manhã seguinte foram pesados e

anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3% - 40mg/kg, i.p.). Após a anestesia, foi realizada coleta de sangue por punção da aorta abdominal e em seguida os ratos foram sacrificados. O aparelho digestório foi retirado e esvaziado (limpo) sendo a seguir devolvido à carcaça do animal para sua pesagem (Anexo 6). Esta medida foi considerada como peso fresco da carcaça. Todas as carcaças foram acondicionadas em freezer -20°C para posterior medida do conteúdo de calorias.

GRUPO FINAL

Neste grupo, os animais com 8 semanas de idade na dieta HO, NR ou HR foram transferidos para gaiola metabólica (modelo 650-0100, Nalgene Brand Products, New York, NY, EUA) de policarbonato (Anexo 7) para avaliação do balanço energético. Após a adaptação às novas condições, todos os ratos foram pesados diariamente no mesmo horário e iniciou-se a medida do consumo das dietas, da ingestão hídrica e do volume urinário. O bolo fecal foi coletado diariamente e armazenado em freezer -20°C para posterior medida do conteúdo de calorias.

No final de 30 dias de avaliação, os animais também foram submetidos, como descrito no grupo inicial, a jejum noturno, coleta de sangue, esvaziamento do tubo digestório e pesagem da carcaça fresca. A carcaça e o bolo fecal foram armazenados em freezer -20°C para posterior medida do conteúdo de calorias.

2.3.1 Preparo das amostras para medida do conteúdo de calorias

A medida do conteúdo de calorias foi realizada segundo o método descrito por Luz et al. (1998).

2.3.1.1 Carcaça

As carcaças foram autoclavadas (autoclave Fanem, modelo 415, São Paulo, Brasil) por 30 min a uma temperatura de 120°C e a uma pressão de 1kgf/cm² para amolecimento dos tecidos e a seguir transferidas para um liquidificador Waring (Blender, modelo 37BL84). Foi acrescentado um volume de água destilada equivalente ao peso da carcaça fresca para sua homogeneização.

Com a obtenção do homogenato, uma alíquota foi armazenada em freezer -20°C para análises quantitativas de gordura e proteína corporal. O restante do homogenato foi acondicionado em um *becker* e colocado em estufa de secagem (FANEM, modelo 315-SE, São Paulo, Brasil) à temperatura de 60°C para sua desidratação. O homogenato desidratado foi transferido para um dissecador até que atingisse a temperatura ambiente, para depois ser pesado. A estabilização do peso deste material foi utilizada para confirmação da sua desidratação total, obtendo-se o peso seco da carcaça. As amostras desidratadas foram homogeneizadas e prensadas em moinho analítico (marca IKA Works, modelo A-11, Staufen, Alemanha) para posterior medida do conteúdo de calorias (Anexo 6).

2.3.1.2 Bolo fecal

Assim como as carcaças, as amostras do bolo fecal foram colocadas na estufa até sua total desidratação e seu peso seco foi anotado. Este material foi homogeneizado no moinho analítico para posterior medida do conteúdo de calorias.

2.3.1.3 Ração

Uma alíquota das rações (HO, NR e HR) fornecida para os ratos foi triturada no moinho analítico. A ração em pó foi analisada no calorímetro para quantificar o conteúdo energético (kJ) por grama de ração, para calcular a quantidade de calorias ingeridas pelos animais durante os 30 dias de estudo.

2.3.2 Medida do conteúdo de calorias

Seguindo o método proposto por Luz et al. (1998), uma alíquota de 0,25g em pó da carcaça, bolo fecal e rações foram submetidas à medida do conteúdo de calorias utilizando um calorímetro adiabático (marca Ika-Works, modelo C-5000, Staufen, Alemanha) com enchimento de oxigênio e despressurização automática para determinação do valor energético. Com a combustão do material analisado no calorímetro foi quantificado o valor calórico e calculado as variáveis do balanço energético (energia inicial, final, ingerida, absorvida, fecal e

metabolizável, porcentagem de energia absorvida, ganho de energia, gasto de energia e eficiência metabólica bruta).

2.3.3 Cálculos do balanço energético

Energia inicial (kJ): conteúdo calórico das carcaças de ratos com 8 semanas de idade.

Energia final (kJ): conteúdo calórico das carcaças de ratos com 12 semanas.

Energia ingerida (kJ): calculada multiplicando a quantidade de ração ingerida (g) durante os 30 dias pelo conteúdo calórico da ração (kJ).

Energia das fezes (kJ): conteúdo calórico do bolo fecal multiplicado pelo peso seco das fezes.

Energia absorvida (kJ): calculada subtraindo o valor da energia ingerida pelo valor da energia fecal.

Energia metabolizável: foi considerada como 96% da energia absorvida. É sugerido que 4% da energia absorvida é perdida pela urina.

Porcentagem de energia absorvida (%): razão entre energia absorvida e energia ingerida multiplicada por 100.

Ganho de energia (kJ): energia final subtraída da energia inicial.

Gasto de energia: energia metabolizável subtraída do ganho de energia.

Eficiência metabólica bruta (%): razão entre ganho de energia e energia metabolizável multiplicada por 100.

Ganho de peso corporal (g): calculado subtraindo o peso final dos ratos com 12 semanas de idade do peso inicial (8 semanas de idade).

2.4 COMPOSIÇÃO CORPORAL

A composição corporal foi avaliada na carcaça dos animais com 12 semanas provenientes do grupo final.

2.4.1 Extração e quantificação de lipídios totais

Para a extração e quantificação de lipídios totais foi utilizada uma alíquota de 1,0 g do homogenato das carcaças. A avaliação foi realizada seguindo

um protocolo descrito por Folch et al. (1957), utilizando clorofórmio e metanol para formar um sistema bifásico, separando na parte superior do tubo de ensaio o metanol e a salina e na parte inferior do tubo o clorofórmio e a gordura. A fase superior do tubo foi aspirada e na inferior o clorofórmio foi evaporado e o tubo foi deixado em temperatura ambiente e pesado por alguns dias. A estabilização do peso foi considerada como conteúdo de lipídios totais na quantidade de amostra utilizada.

A quantidade de lipídios totais na carcaça foi expressa em g/100g de tecido.

2.4.2 Quantificação da proteína total

O conteúdo de proteína total dos animais foi medido pelo método proposto por Leshner et al. (1972), utilizando uma alíquota (1,0g) do homogenato das carcaças.

A quantidade de proteína total na carcaça foi expressa em mg/ml.

2.4.3 Porcentagem de água corporal

A porcentagem de água corporal foi calculada a partir da diferença entre o peso seco e o peso fresco da carcaça do animal sacrificado na idade adulta, dividido pelo peso fresco e multiplicado por 100.

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA

A atividade motora espontânea dos ratos foi avaliada num campo-aberto segundo o método descrito por Chiavegatto et al. (1998) com adaptações. A observação do animal foi monitorada por câmera de vídeo e gravada em fita VHS (Anexo 8).

O campo-aberto utilizado neste projeto foi construído segundo Broadhurst (1960). Este campo é constituído de uma arena (1m²) de madeira pintada de branco e o piso da arena foi dividido em 36 quadrados iguais. O campo-aberto foi limpo com uma solução de álcool a 5% antes de cada sessão. Este procedimento visou eliminar possíveis odores emitidos por animais

previamente observados. Antes dos experimentos, os ratos foram transferidos para a sala de medida para adaptação ao ambiente.

Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e cada sessão durou cinco minutos. As observações dos animais foram intercaladas e conduzidas entre as 14:00 e 17:30 horas, para evitar possíveis interferências devido a variações circadianas.

As variáveis observadas e registradas neste campo-aberto representam categorias comportamentais que são frequência de locomoção, frequência de levantar, tempo de permanência, tempo de limpeza do animal e número de bolos fecais. Tais variáveis foram identificadas e padronizadas por Chiavegatto et al. (2001).

Frequência de locomoção (LO): o animal, com o tronco afastado do chão por meio de movimentos alternados das quatro patas, levantando-se e voltando a apoiá-las em outro local, desloca-se horizontalmente sobre o fundo da arena do campo-aberto. Uma unidade de medida corresponde ao ato do animal entrar, com as quatro patas, em uma das divisões do fundo da arena.

Frequência de levantar (LE): uma unidade de medida corresponde ao movimento do animal apoiar-se apenas nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo perpendicular em relação ao chão da arena, tocando ou não as paredes laterais com as patas anteriores.

O tempo de permanência do animal no campo-aberto foi medido na área central, intermediária e periférica na arena.

O número de bolos fecais e o tempo de limpeza do animal foram quantificados durante o período de permanência do animal na arena.

A atividade motora espontânea foi observada em ratos com 8 e 12 semanas de idade, na ausência de estímulos externos. Esta movimentação foi considerada como sendo a atividade espontânea do animal.

2.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

2.6.1 Dosagem de leptina - LEP

Para a dosagem de LEP foi utilizado um grupo adicional de ratos com 12 semanas de idade, sacrificados para coleta de sangue sem restrição alimentar.

A LEP foi determinada pelo método de radioimunoensaio, utilizando "kit" comercial específico para LEP de rato (Linco Research Inc., St. Louis, MO, EUA). O teste é considerado completamente homólogo, pois o anticorpo, o antígeno marcado com ^{125}I e os padrões são preparados com leptina de rato altamente purificada.

2.6.2 Dosagem de insulina e adiponectina

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado para separação do plasma e estocado a -20°C até o momento da dosagem. A insulina e a adiponectina foram determinadas pelo método de radioimunoensaio, utilizando "kit" comercial específico para rato (Linco Research Inc., St. Charles, MO, EUA e Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA, respectivamente).

2.6.3 Glicemia basal

A glicemia de jejum foi determinada utilizando tiras reativas analisadas em glicosímetro (Advantage Boehringer Mannheim, EUA) com limites de detecção de 10-600 mg/dl.

2.7 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL - PAc

Pela manhã, os ratos foram transferidos para uma sala apropriada para a medida de PAc. As medidas foram realizadas utilizando o método oscilométrico (Harvard Indirect Rat Tail Blood Pressures Monitor, Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, Inglaterra). Estas medidas foram realizadas em animais acordados, considerando apenas as obtidas na ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Para cada animal foram registradas quatro aferições de PAc e o valor encontrado correspondia à pressão arterial média. Os

animais foram previamente treinados para adaptação ao método de medida de PAc (Anexo 9).

As medidas de PAc foram realizadas em animais com 12 semanas de idade em dieta HO, NR ou HR.

2.8 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA UCP-1 NO TECIDO ADIPOSEO MARROM

Foram utilizados reagentes e aparelhos para eletroforese adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA, EUA).

Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A proteína A marcada com iodo radioativo (^{125}I) e membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0,45 μm) foram adquiridas da Amersham (Aylesbury, UK). A proteína A sepharose 6MB foi adquirida da Pharmacia (Uppsala, Suécia). O anticorpo anti-UCP1 foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology Inc., (Santa Cruz, CA, EUA) e o anticorpo Akt/PKB da Biolabs (Hitchin, Hertfordshire, UK).

2.8.1 Soluções

As soluções utilizadas estão descritas a seguir:

Solução tampão de extração A para extrato total de proteínas: foi utilizado para extração das proteínas do tecido, contendo trizma-base (hidroximetil amino metano) 100mM, pH 7,6, SDS 10%, EDTA 10mM, fluoreto de sódio 100nM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10nM.

Solução tampão de extração B para imunoprecipitação: usada para extração de proteínas do imunoprecipitado, contendo trizma-base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 10M, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), Triton 10% e 0,1mg/ml de aprotinina.

Solução tampão para a lavagem do imunoprecipitado: composta de trizma-base 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 2mM e Triton X-100 0,5%.

Solução tampão de Laemmli (5X): foi utilizada para estocar o material extraído e para sua aplicação no gel de SDS-PAGE, contendo azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão utilizada na eletroforese: composta de trizma-base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0,4%.

Solução tampão para transferência: utilizada para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contendo trizma-base 25mM, glicina 192mM, metanol 20% e SDS 0,02%, para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

Solução tampão para o gel de poli(acrilamida): utilizada para preparar o SDS-PAGE, gel de resolução contendo EDTA 4mM, SDS 2%, trizma-base 750mM, pH 8,9.

Solução tampão para SDS-PAGE: utilizada para preparar o SDS-PAGE, gel de empilhamento contendo EDTA 4mM, SDS 2%, trizma-base 50mM, pH 6,7 ajustado com ácido fosfórico.

Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. É composta de cloreto de sódio 150mM, trizma-base 10mM e Tween 20 a 0,02%.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência, contendo 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para os anticorpos: solução de diluição dos anticorpos, contendo 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

Solução de proteína A marcada com ^{125}I : utilizada para a visualização das bandas em auto-radiografia, contendo 0,1% de leite desnatado, dissolvida em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

2.8.2 Procedimento para extração da proteína tecidual

Os ratos com 12 semanas de idade foram anestesiados com pentobarbital sódico (hypnol 3%, 40mg/kg i.p.) e o TAM foi removido, sendo imediatamente colocado na solução tampão de extração A mantido em gelo, homogeneizado com Polytron PTA (Brinkmann Instruments Inc., modelo PT 10/35, Westbury, NY, EUA) e centrifugado a 11.000rpm por 40min a 4°C (Beckman Coulter Inc., 70.1 Ti rotor - Palo Alto, CA, EUA). As alíquotas do sobrenadante foram estocadas em solução tampão de Laemmli, contendo DTT até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para a quantificação da concentração protéica de cada amostra pelo método de Bradford (1976).

2.8.3 "Immunoblotting"

Para o "immunoblotting", uma alíquota de 250µg do extrato de proteína total foi aquecida em banho-maria por 5min e aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2mm de espessura, balizado por um marcador de peso molecular da Bio-Rad, contendo miosina (205 kDa), β galactosidase (116 kDa), BSA (85 kDa) e ovalbumina (47 kDa). Foi realizada eletroforese em cuba para mini-gel da marca Bio-Rad com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 40 volts por 30 min e depois a 120 volts por 2 horas. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletro-transferência do mini-gel da Bio-Rad, que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como descrito por Towbin et al. (1979).

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas à temperatura ambiente, lavadas com solução basal por 15min e incubadas com anticorpo anti-UCP-1 ou anti-Akt1 (controle) *overnight* a 4°C. Após a primeira incubação, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com a proteína A ¹²⁵I, 2µCi por 2 horas em temperatura ambiente. O excesso de proteína A ¹²⁵I foi lavado com solução basal e as membranas foram colocadas junto ao filme de raio-X (Kodak Co., Rochester, NY, EUA) com

intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, St. Louis, MO, EUA). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C e após um período de 48 horas, os filmes foram revelados de maneira convencional. As bandas foram submetidas a densitometria óptica (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, EUA).

Os resultados foram analisados comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos de dieta estudados.

2.9 QUANTIFICAÇÃO DE ANGIO II PLASMÁTICA E TECIDUAL

2.9.1 Preparação do coquetel de inibidores de peptidases

O coquetel de inibidores foi preparado seguindo a ordem de adição das soluções: $10\mu\text{l}$ de solução de p-OHHgBnz 1nM , $50\mu\text{l}$ de solução α -fenantrolina 30nM , $10\mu\text{l}$ de solução de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1nM , $50\mu\text{l}$ de solução de EDTA 7,5%, $20\mu\text{l}$ de solução de pepstatina 1nM , solução A (HCl 0,18N) e solução B (etanol ácido: 200 ml de solução A e 600ml de etanol absoluto). Para cada amostra de tecido foi utilizado $1.400\mu\text{l}$ do coquetel de inibidores e $280\mu\text{l}$ para amostras de sangue.

2.9.2 Procedimento para extração dos tecidos

Os ratos com 12 semanas de idade foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3%, 40mg/kg i.p.) para coleta de sangue e remoção dos tecidos (adiposo branco periepídimo e adiposo marrom). As amostras foram coletadas em tubo falcon contendo o coquetel de inibidores de peptidases, homogeneizadas, e centrifugadas a 3.000rpm por 15min a 4°C . O plasma e o sobrenadante dos tecidos foram estocados em freezer -80° para posterior quantificação de ANGIO II.

2.9.3 Quantificação da concentração de ANGIO II

A ANGIO II foi determinada utilizando cromatografia de fase reversa acoplada a um detector ultravioleta (214nm) usando a técnica descrita por Franco et al. (2003).

Os tecidos foram previamente homogeneizados em 8ml de tampão de fosfato de sódio 0,1M contendo sacarose 0,34M e cloreto de sódio 0,3M (pH 7,2). O peptídeo Angiotensina III (320ng) foi adicionado em cada amostra como um padrão interno do ensaio.

A extração de ANGIO II foi realizada utilizando cromatografia em colunas Sep-Pak-C₁₈ (Millipore, EUA). A coluna foi ativada com adição de 5ml metanol, 5ml tetraidrofurano, 5ml hexano, 5ml metanol e 10ml de água MilliQ. Em seguida, as amostras foram passadas pela coluna e os peptídeos foram eluídos com a adição dos reagentes: 10ml de água, 5ml de ácido acético 4% e 5ml etanol/ácido acético/água (90:4:6, volume/volume). Os peptídeos de interesse foram extraídos da coluna na última fase e foram evaporados no equipamento Speed Vac SC 110 (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, EUA). Os extratos das amostras foram reconstituídos com 500μl de ácido fosfórico 0,1% em acetonitrila 5%, filtradas e injetadas na coluna aquapore OD 300 (7μm, 4,6x250mm - Applied Biosciences, Salt Lake City, UT, EUA) do sistema de HPLC. Os peptídeos foram inicialmente separados por eluição isocrática durante 5min, seguido por um gradiente linear de 5 a 35% de acetonitrila em ácido fosfórico 0,1% durante 20min a um fluxo de 1,5 ml/min. Os tempos de retenção foram utilizados para identificar os picos de interesse, previamente determinados por eluição com peptídeo padrão.

A concentração de ANGIO II foi determinada no tecido adiposo branco, no tecido adiposo marrom e no plasma. Os cálculos foram realizados baseados na área do pico formado e a concentração de ANGIO II foi expressa em ng/g de tecido analisado e no plasma em ng/ml.

2.10 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA ANGIO II

2.10.1 Processo de parafinização dos tecidos

Os ratos com 12 semanas de idade foram sacrificados para retirada do TAB (mesentérico e retroperitoneal), TAM e hipotálamo que foram

imediatamente transferidos para uma solução fixadora de Duboscq-Brasil durante 40min para conservação das estruturas. Em seguida os fragmentos permaneceram em solução tampão fosfato 0,1M com formol a 10%.

Para a realização do processo de parafinização e inclusão do tecido, os fragmentos foram retirados da solução tampão fosfato 0,1M com formol 10% e transferidos para uma caixeta de metal perfurada. Este processo de inclusão do tecido na parafina foi realizado pelo processador automático de tecido "histokinette" (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) por 14 horas, como descrito a seguir.

O processo de inclusão iniciou-se pela desidratação dos tecidos em álcoois em concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% e álcool absoluto [2 banhos]). Seguiu-se a diafanização, onde os tecidos passaram por uma solução de álcool absoluto e xilol (volume/volume) e por último, foram imersos em parafina fundida a 60°C.

O material parafinado foi incluído em blocos e após solidificação permaneceu em temperatura ambiente.

2.10.2 Corte do tecido no micrótomo

Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram 30min a -20°C antes do corte, para evitar enrugamento do corte do tecido. Os blocos foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis com espessura de 3 a 4µm e aderidos em lâminas previamente revestidas com gelatina a 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

2.10.3 Revestimento das lâminas com gelatina

As lâminas foram lavadas em solução de álcool/éter (1:1). Para o preparo da gelatina foi acrescentado 4g de gelatina purificada do tipo A (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) com 500ml de água destilada a 50°C. Quando esta solução atingiu 30°C, adicionou-se 4g de sulfato de potássio crômico (Sigma

Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e a solução foi filtrada. Para realização do processo de revestimento, as lâminas foram mergulhadas por alguns segundos na solução de gelatina, retirou-se o excesso e foram acondicionadas à 4°C.

2.10.4 Desparafinização

Antes da realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Foram incubadas por 30min em estufa a 60°C. Ao término deste período, as lâminas foram imersas 3 vezes em xilol por 9min; 2 vezes no álcool absoluto por 5min; 2 vezes no álcool 96% por 3min e depois lavadas em água destilada. Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS), pH 7,6.

Após a desparafinização, as lâminas foram colocadas em tampão citrato e levadas ao microondas para exposição antigênica.

2.10.5 Técnica Estreptavidina/fosfatase alcalina para ANGIO II

A reação de imuno-histoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina foi utilizada para identificação de ANGIO II.

As lâminas desparafinizadas foram colocadas em solução de TBS pH 7,6 e colocadas em câmara úmida. Em seguida, foi realizado o bloqueio da avidina e da biotina endógena por 15min cada (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Após este período foi realizado o bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:70, durante 30min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho anti-ANGIO II (Península Laboratories Inc., San Carlos, CA, EUA) na diluição de 1:400, *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Após este período, os cortes foram incubados com anticorpo secundário, anti-imunoglobulina biotinilada de cabra anti-coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), na diluição de 1:1000, durante 45min, seguido do complexo estreptavidina-biotina/fosfatase-alcalina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30min. Todas as lavagens entre as incubações dos anticorpos foram realizadas com solução salina tris-tamponada.

Para revelação foi utilizado um substrato cromogênico preparado à base do corante *fast red*. Este procedimento foi realizado sob microscopia, sendo interrompido com a solução de TBS e o tempo de revelação foi de 8min. Os cortes foram contra-corados com *hemalumbre de Mayer* por 2min e lavados em água corrente. As lamínulas foram colocadas em gelatina glicerizada Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente aquecida.

As células positivas neste tipo de reação se apresentaram na cor vermelha e corresponderam à expressão de ANGIO II no tecido estudado. O núcleo da célula foi marcado com corante na cor azul. O controle negativo do método foi realizado na ausência do anticorpo primário específico no tecido.

2.10.6 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio e as estruturas coradas em vermelho foram identificadas e contadas como positivo para ANGIO II.

Para a apresentação dos resultados em células positivas/mm², o número encontrado por campo foi multiplicado pelo fator de correção 6,25 obtendo-se o número de células positivas/mm². Estes foram os cálculos para o TAB mesentérico e retroperitoneal. Os cortes de tecidos foram analisados em microscópio com aumento de 200 vezes.

No TAM e no hipotálamo foi utilizado o método de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 160 pontos. Foram contados os pontos coincidentes à área ocupada por ANGIO II. Os cortes de tecidos foram analisados em microscópio com aumento de 400 vezes. As fotos destes cortes foram obtidas através de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

2.11 CÁLCULO DO ÍNDICE DE HOMA E QUANTIFICAÇÃO DA OBESIDADE

O índice de HOMA (*homeostasis model of assessment*) foi calculado para avaliar a sensibilidade à insulina nos ratos com 12 semanas de idade. Este índice

foi calculado usando a fórmula matemática descrita por Matthews et al. (1985) e atualizada por Bonora et al. (2000): Fórmula: glicemia de jejum (mmol/l) x insulinemia de jejum (μ U/ml) / 22,5.

A obesidade foi avaliada através da medida da massa de tecido adiposo mesentérico, periepídidimo e retroperitoneal nos ratos com 12 semanas de idade.

2.12 SINALIZAÇÃO DA INSULINA

Utilizando a técnica de imunoprecipitação (IP) e "immunoblotting" (IB) foi quantificada a expressão protéica e a fosforilação de algumas proteínas envolvidas na transdução do sinal da insulina. Dentre elas, foi estudado o receptor da insulina (IR), o substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2), a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3q), a proteína quinase B (PKB/Akt), a proteína c-jun N-terminal quinase (JNK), a serina 307 do IRS-1, o fator de transcrição Foxo1 no fígado, no músculo gastrocnêmio e no TAB periepídidimo.

Os reagentes, aparelhos e soluções utilizadas para eletroforese foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA, EUA) e estão descritos no item 2.8.

Para estimular a sinalização da insulina nos tecidos, foi utilizada insulina regular humana (Humulin®-R, Eli Lilly Co., Indianápolis, IN, EUA).

Os anticorpos utilizados foram o antifosforotirosina (α PY), anti-IR subunidade β (α IR), anti-IRS-1, anti-Akt1/2, anti-pJNK e anti-JNK1 e anti-IRS1^{ser307} adquiridos da Santa Cruz Technology Inc., (Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos anti-PI-3q, anti-IRS-2 e anti-phospho-IRS-1^{ser307} foram adquiridos da Upstate Biotechnology, Inc., (Lake Placid, NY, EUA). Outros anticorpos utilizados foram anti-pAkt e anti-pFoxo1 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, EUA).

2.12.1 Procedimento para extração das proteínas teciduais

Os ratos com 12 semanas, após jejum de 6 horas, foram anestesiados (Hypnol 3%, 40mg/kg i.p) e a cavidade abdominal foi aberta para exposição da veia

porta onde foi administrada em "*bolus*" uma injeção de 0,2ml de solução salina (NaCl 0,9%) com ou sem insulina cristalina (2 μ g). O fígado foi removido após 30 segundos da injeção de insulina e músculo e tecido adiposo após 90 segundos.

O material extraído foi imediatamente colocado na solução tampão de extração A (extrato total - IB) ou em tampão de extração B (extrato total - IP) e imediatamente homogeneizado no Polytron ajustado na velocidade máxima. Depois foi centrifugado a 12.000rpm por 40min a 4°C e as alíquotas do sobrenadante foram estocadas em solução tampão de Laemmli, contendo DTT 200mM até a fase seguinte (IP e IB ou IB direto). Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para a quantificação da concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico - biureto (kit protal, Laborlab, Guarulhos, SP, Brasil).

2.12.2 Imunoprecipitação - IP

O sobrenadante do extrato foi utilizado para imunoprecipitação com os anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica e o volume do anticorpo aplicado foi fixo (10 μ l/amostra). As amostras foram incubadas por 12-14 horas a 4°C. Em seguida foram acrescidos 50 μ L de proteína-A Sepharose e as amostras foram novamente incubadas por 2 horas a 4°C e depois centrifugadas por 15min. As proteínas precipitadas foram lavadas 3 vezes com solução tampão e preparadas para a fase seguinte (IB).

2.12.3 "Immunoblotting" - IB

As proteínas precipitadas (IP) e/ou extrato total (IB) foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. Uma quantidade do extrato tecidual (250 μ g) para IB de cada amostra foram aplicadas no gel de poliacrilamida. Após a eletroforese em cuba de mini-gel, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose conforme descrito no item 2.8.3.

Os anticorpos utilizados neste "immunoblotting" foram anti-fosfotirosina e anti-PI-3q. Para quantificar a fosforilação da proteína Akt e Foxo1 não foi necessário imunoprecipitação do homogenato. Foi utilizado extrato total dos

homogenatos dos tecidos e anticorpos anti-fosfo-Akt/PKB e anti-Foxo1 no "immunoblotting". As membranas obtidas foram expostas ao filme de raio-X e reveladas conforme descrito no item 2.8.3.

Os resultados foram analisados comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos de dieta estudados.

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e erro-padrão da média. Utilizou-se análise de variância de um fator (one way-ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls' para avaliar as diferenças entre as médias dos resultados obtidos nos diversos grupos analisados. Também foi utilizada a análise de variância de dois fatores (two way-ANOVA) para avaliação da evolução ponderal, volume urinário e ingestão hídrica. No balanço energético, diferenças de eficiência metabólica entre os grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre médias obtidas no protocolo 4. O erro alfa menor do que 5% foi aceito para rejeitar a hipótese de nulidade.

3. RESULTADOS

As tabelas e figuras referidas no texto encontram-se no final deste capítulo.

3.1 Pressão arterial

A PAc (mmHg) foi verificada nos animais com 12 semanas de idade. Os valores encontrados foram maiores ($p<0,05$) nos ratos alimentados com dieta HR quando comparados aos grupos NR ou HO. A PAc não foi diferente entre os grupos HO e NR. Estes resultados estão demonstrados na Figura 1 e Tabela 2.

3.2 Peso corporal, balanço energético, composição corporal e expressão da proteína UCP1

A evolução ponderal dos ratos desde o desmame até a 12ª semana de idade apresentou perfil semelhante entre os quatro protocolos estudados e diferenças entre as dietas. Desta forma, só mostraremos os resultados de peso corporal do balanço energético.

O peso corporal no desmame foi semelhante entre os três grupos de dieta estudados (HR=43,8±4, n=21; NR=44,8±8, n=18 e HO=45,4±3g, n=16). No entanto, a partir da 8ª até 12ª semana, o peso corporal foi maior ($p<0,05$) nos ratos em dieta HO e menor ($p<0,05$) nos animais em dieta HR comparado ao grupo NR. Estes resultados estão demonstrados na Figura 2A.

Os resultados a seguir foram avaliados diariamente da 8ª a 12ª semana de idade em ratos mantidos em gaiolas metabólicas. O consumo médio de ração durante 30 dias foi maior ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR (21,3±0,9, n=8) e menor ($p<0,05$) no grupo HO (19,0±0,8, n=9) quando comparado ao grupo NR (20,3±1,2g/rato/dia, n=8). Estes resultados estão demonstrados na Figura 2B. A ingestão hídrica e volume urinário foram maiores ($p<0,05$) nos ratos alimentados com dieta HR quando comparado ao grupo NR e HO (Figuras 3A e 3B). A energia ingerida, porcentagem de energia absorvida, energia metabolizável e o gasto de energia foram maiores ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR e menores ($p<0,05$) nos ratos em dieta HO quando comparados ao grupo NR (Figuras 4, 5A, 5B, 6B e

Tabela 1). A eficiência metabólica não foi diferente entre os grupos de dieta estudados (Tabela 1). A energia fecal foi maior ($p<0,05$) em ratos que consumiram dieta HO em comparação aos grupos NR e HR e menor ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR quando comparados ao grupo NR (Figura 5C e Tabela 1). O ganho de energia foi menor ($p<0,05$) no grupo HO quando comparado com o grupo HR (Figura 6A).

A expressão da proteína UCP-1 no TAM, um marcador de gasto energético, avaliada na idade adulta foi maior ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR ($137,9\pm0,9$; $n=4$) e menor nos ratos alimentados com dieta HO ($86,1\pm9,8$; $n=5$) quando comparado ao grupo NR ($100\pm9,5$ unidades arbitrárias; $n=5$). Este resultado está demonstrado na figura 7.

A composição corporal foi avaliada na carcaça dos animais na idade adulta. Os ratos submetidos à dieta HO apresentaram um aumento ($p<0,05$) no conteúdo de proteína e lipídios totais, quando comparados aos grupos NR ou HR (Figuras 8A, 8B e Tabela 1). A porcentagem de água corporal não foi diferente entre os grupos de dieta estudados. Estes resultados estão demonstrados na Figura 8C e Tabela 1.

3.3 Glicemia e perfil hormonal

O perfil hormonal e a glicemia de jejum foram avaliados em ratos na 12ª semana de idade.

A glicemia e a insulinemia de jejum foram maiores ($p<0,05$) nos ratos alimentados com dieta HO comparado aos grupos HR ou NR (Tabela 2).

A leptina plasmática foi menor ($p<0,05$) e a adiponectina circulante foi maior ($p<0,05$) no grupo submetido à sobrecarga crônica de sal na dieta em comparação aos grupos NR e HO (Figuras 9, 10 e Tabela 2).

3.4 Atividade motora espontânea

Os resultados da atividade motora, observada em campo-aberto, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de dieta estudados, tanto em ratos na 8ª e 12ª semana de idade. Nestes animais, o peso corporal foi

maior ($p<0,05$) tanto na 8ª e 12ª semana nos animais alimentados com dieta HO e menor ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR em comparação ao grupo NR (Tabelas 3 e 4).

3.5 ANGIO II plasmática e tecidual

A concentração plasmática de ANGIO II foi menor ($p<0,05$) nos ratos em dieta HR e maior ($p=0,05$) nos animais em dieta HO quando comparado ao grupo NR. No TAM o conteúdo de ANGIO II foi maior ($p<0,05$) e no TAB periepididimal foi menor ($p<0,05$) no grupo HO quando comparado com grupo NR ou HR (Tabela 5).

A avaliação do conteúdo de ANGIO II, utilizando a técnica de imuno-histoquímica confirmou, em parte, estes resultados e possibilitou a visualização do conteúdo de ANGIO II nos tecidos, além de acrescentar a quantificação de ANGIO II no hipotálamo e no TAB retroperitoneal e mesentérico.

Por imuno-histoquímica, a quantificação de ANGIO II no TAM (Figura 11 e Tabela 6) foi maior ($p<0,05$) e no TAB mesentérico (Figura 12 e Tabela 6) foi menor ($p<0,05$) no grupo HO em comparação aos ratos em dieta HR. No TAB retroperitoneal a quantidade de ANGIO II não foi diferente entre os grupos de dieta (Figura 13). A quantidade de ANGIO II no hipotálamo em ratos alimentados com dieta HO foi menor ($p<0,05$) quando comparado com o grupo NR e HR (Figura 14 e Tabela 6).

3.6 Expressão tecidual e fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização da insulina

No protocolo 4 foram estudados somente ratos em dieta HO e NR.

No desmame, o peso corporal não foi diferente entre os dois grupos de dieta (NR= $53\pm 2,2$ vs. HO= $50\pm 1,6$ g, $n=8$ em cada grupo, $p>0,05$). Entretanto, com 12 semanas de vida, o peso corporal, a massa de tecido adiposo periepididimal, retroperitoneal, mesentérica, foram maiores ($p<0,05$) nos animais em dieta HO quando comparados com o grupo NR (Tabela 7).

A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice de HOMA. Quando maior este índice menor será a sensibilidade à insulina. Os resultados demonstraram um maior ($p < 0,05$) índice de HOMA no grupo em dieta HO quando comparado ao grupo NR (Tabela 7). Para identificar quais os tecidos que estão relacionados com menor sensibilidade à insulina no grupo HO, a sinalização da insulina foi avaliada neste estudo.

3.6.1 Sinalização da insulina no fígado

Em ratos com 12 semanas de vida, a expressão do receptor da insulina (IR), do substrato 1 e 2 do IR (IRS-1 e IRS-2) não foi diferente entre os grupos de dieta HO e NR (Figuras 15A, 15C e 15F). Neste tecido, após estímulo com insulina (injeção de insulina na veia porta), a fosforilação da tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 foi menor ($p < 0,05$) no grupo em dieta HO* quando comparado com ratos na dieta NR* (Figuras 15B, 15D e 15G). Após estímulo pela insulina, a associação da expressão do IRS-1 e IRS-2 com a subunidade p85 da enzima PI-3q foi menor ($p < 0,05$) no grupo HO quando comparado com os ratos em dieta NR (Figuras 15E e 15H).

A expressão da proteína Akt no fígado não foi diferente entre os grupos HO e NR (Figura 15I). No entanto, após o estímulo com a insulina, o grupo HO apresentou uma menor ($p < 0,05$) fosforilação da proteína Akt em comparação ao grupo NR (Figura 15J).

A expressão da proteína JNK1 não foi diferente entre as dietas HO e NR (Figura 15K). No entanto, a fosforilação da proteína JNK (1 e 2) foi maior ($p < 0,05$) nos animais em dieta HO quando comparado ao grupo de animais que receberam dieta NR (Figura 15L). O resultado desta fosforilação avaliou a ativação da proteína JNK na via de sinalização da insulina.

A associação da expressão do substrato IRS-1 com a proteína JNK1 e fosforilação em serina 307 do substrato IRS-1 foi maior ($p < 0,05$) no grupo em dieta HO em comparação ao grupo NR. Estes resultados estão demonstrados nas figuras 15M e 15N.

3.6.2 Sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio

Em ratos na idade adulta, a expressão do IR, IRS-1, IRS-2, da proteína Akt e da proteína JNK1 (Figuras 16A, 16C, 16F, 16I e 16K) não foi diferente entre os grupos HO e NR ($p < 0,05$). Após o estímulo com a insulina, os animais em dieta HO apresentaram menor ($p < 0,05$) fosforilação da tirosina do IR e IRS-1 e menor ($p < 0,05$) associação com a enzima PI-3q quando comparado com o grupo NR (Figuras 16B, 16D e 16E). No entanto, mesmo após o estímulo com a insulina, a fosforilação do substrato IRS-2 e sua associação com a subunidade p85 da PI-3q não foram diferentes entre os grupos de dieta HO e NR (Figuras 16G e 16H).

A fosforilação da proteína Akt estimulada pela insulina foi menor ($p < 0,05$) no grupo HO quando comparado com ratos em dieta NR (Figura 16J).

A ativação da proteína JNK1 e sua associação com a expressão do IRS-1 foram maiores ($p < 0,05$) no grupo HO em comparação ao grupo NR (Figuras 16L e 16M).

A fosforilação em serina 307 do substrato IRS-1 foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que consumiram dieta HO quando comparados ao grupo NR (Figuras 16N).

3.6.3 Sinalização da insulina no tecido adiposo branco

Em animais com 12 semanas de vida, a expressão do IR e sua fosforilação antes e após o estímulo com a insulina não foram diferentes entre os grupos de dieta HO e NR. Estes resultados estão demonstrados nas Figuras 17A e 17B.

A expressão do IRS-1 não foi diferente entre os grupos de dieta HO e NR (Figura 17C). Após o estímulo com a insulina, o grupo em dieta HO apresentou uma menor ($p < 0,05$) fosforilação da tirosina do IRS-1 (Figura 17D) e na associação do IRS-1 com a enzima PI-3q (Figura 17E) quando comparado com o grupo NR.

A expressão do IRS-2 e da proteína Akt não foi diferente entre os grupos de dieta (Figuras 17F e 17I). Após a injeção de insulina houve uma maior ($p < 0,05$) fosforilação da tirosina do IRS-2 (Figura 17G) e da sua associação com

a subunidade p85 da enzima PI-3q no grupo HO em comparação ao grupo NR (Figura 17H). Foi também observado uma maior ($p<0,05$) fosforilação da proteína Akt antes (NR^- vs. HO^-) e após estímulo (NR^+ vs. HO^+) com insulina quando comparado ao grupo NR (Figura 17J).

A expressão protéica da JNK1, sua fosforilação e associação com o substrato IRS-1 não foram diferentes entre os grupos HO e NR (Figuras 17K, 17L e 17M).

A fosforilação em serina 307 do substrato IRS-1 não foi diferente entre os grupos HO e NR (Figura 17N).

3.6.4 Fosforilação da Foxo1 no fígado, músculo e tecido adiposo

A isoforma Foxo1 é um fator de transcrição sensível à ação da insulina e regulado por algumas proteínas sinalizadoras como a enzima PI-3q e a proteína Akt. A Foxo1 é importante para mediar os efeitos da insulina e dos fatores de crescimento sobre a expressão de alguns genes. Em função dos resultados obtidos no grupo HO (alteração na via de sinalização da PI-3q e Akt) foi investigado se os efeitos da dieta HO conseguiriam interferir na expressão e fosforilação do fator de transcrição Foxo1 neste modelo de resistência insulínica (Anexo 10 e 11).

Os ratos em dieta HO apresentaram uma menor ($p<0,05$) fosforilação da Foxo1 induzida pela insulina no fígado e músculo, quando comparado com ratos em dieta NR (Figuras 18A e 18B).

No tecido adiposo, os ratos em dieta HO apresentaram uma maior ($p<0,05$) fosforilação/inativação da Foxo1 estimulada pela insulina quando comparado com os ratos alimentados com dieta NR (Figura 18C).

Figura 1: Pressão arterial caudal medida na 12ª semana de vida em ratos alimentados com dieta HO (n=8), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. HO e NR.

Figura 2: **A)** Evolução ponderal e **B)** consumo de ração diário (avaliados da 8ª a 12ª semana de vida) de ratos alimentados com dieta HO (n=9, ●), NR (n=8, ■) ou HR (n=8, ▲) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NR e HR, ** $p < 0,05$ vs. NR.

A)

B)

Figura 3: A) Ingestão hídrica e B) volume urinário, avaliados da 8ª a 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=9, ●), NR (n=8, ●) ou HR (n=8, ●) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HO.

Figura 4: Energia ingerida, avaliada da 8ª a 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=9), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HR, **p<0,05 vs. NR.

A)

B)

C)

Figura 5: A) Porcentagem de energia absorvida, B) energia metabolizável e C) energia fecal, avaliada da 8ª a 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=9), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HR, **p<0,05 vs. NR.

Figura 6: A) Ganho de energia e B) gasto de energia, avaliado da 8ª a 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=9), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NR e HR, ** $p < 0,05$ vs. NR.

Figura 7: Expressão da proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP-1) no TAM em unidade arbitrária por μg de proteína total. Variável analisada na 12ª semana de vida em ratos na dieta HO (n=9), NR (n=5) ou HR (n=4) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NR e HR, ** $p < 0,05$ vs. NR.

Figura 8: A) Conteúdo de proteína total, B) gordura total e C) porcentagem de água corporal, avaliado na 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=9), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NR e HR.

Figura 9: Leptina, avaliada na 12ª semana de vida, em ratos alimentados com dieta HO (n=12), NR (n=10) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. HO e NR.

Figura 10: Adiponectina, avaliada na 12ª semana de vida, em ratos adultos alimentados com dieta HO (n=8), NR (n=8) ou HR (n=8) desde o desmame. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. HO e NR.

Figura 11: Quantificação e visualização de ANGIO II no tecido adiposo marrom pela técnica de imuno-histoquímica em ratos adultos alimentados com dieta HO (n=5), NR (n=5) ou HR (n=5) desde o desmame. Foram analisadas 5 lâminas em cada grupo. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. HR. (Foto: Objetiva no aumento de 400 vezes).

Figura 12: Quantificação e visualização de ANGIO II no tecido adiposo branco mesentérico pela técnica de imuno-histoquímica em ratos adultos alimentados com dieta HO (n=5), NR (n=5) ou HR (n=5) desde o desmame. Foram analisadas 5 lâminas em cada grupo. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. HR. (Foto: Objetiva no aumento de 400 vezes).

Figura 13: Quantificação e visualização de ANGIO II no tecido adiposo branco retroperitoneal pela técnica de imuno-histoquímica em ratos adultos alimentados com dieta HO (n=4), NR (n=5) ou HR (n=5) desde o desmame. Foram analisadas de 4-5 lâminas em cada grupo. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. (Foto: Objetiva no aumento de 400 vezes).

Figura 14: Quantificação e visualização de ANGII no hipotálamo pela técnica de imuno-histoquímica em ratos adultos alimentados com dieta HO (n=6), NR (n=5) ou HR (n=4) desde o desmame. Foram analisadas de 4-5 lâminas em cada grupo. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NR e HR. (Foto: Objetiva no aumento de 400 vezes).

Figura 16: Sinalização da insulina no **MÚSCULO GASTROCNÊMIO** de animais em dieta HO (n=5) ou NR (n=5) na idade adulta. **A)** Expressão do IR. Uma Alíquota do extrato total contendo a mesma quantidade de proteína foi utilizada para imunoprecipitação (IP) e "immunoblotting" (IB) com anticorpo anti-IR. **B)** Fosforilação do IR antes (-) e após (+) a injeção da insulina (IP com anti-IR e IB com antifosfotirosina - pY). **C)** Expressão do IRS-1 (IP e IB com anti-IRS-1). **D)** Fosforilação do IRS-1 (IP com anti-IRS-1 e IB com pY). **E)** Associação do IRS-1 com a PI-3q (IP com anti-IRS-1 e IB com anti-PI-3q). **F)** Expressão IRS-2 (IP e IB com anti-IRS-2). **G)** Fosforilação do IRS-2 (IP com anti-IRS-2 e IB com anti-pY). **H)** Associação do IP com anti-IRS-2 e IB com anti-PI-3q. **I)** Expressão da Akt (IB anti-Akt). **J)** Fosforilação da Akt (IB com anti-pAkt). **K)** Expressão da JNK1 (IB com anti-JNK1). **L)** Fosforilação da JNK (IB com anti-pJNK). **M)** Associação do IP com anti-IRS-1 e IB com anti-JNK1. **N)** Fosforilação em serina 307 do IRS-1 (IB com anti-IRS-1^{ser307}). Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p <0,05 vs. NR*, **p <0,001 vs. NR.

Figura 17: Sinalização da insulina no **ADIPOSO BRANCO** de animais em dieta HO (n=5) ou NR (n=5) na idade adulta. **A)** Expressão do IR. Uma Aliquota do extrato total contendo a mesma quantidade de proteína foi utilizada para imunoprecipitação (IP) e "immunoblotting" (IB) com anticorpo anti-IR. **B)** Fosforilação do IR antes (-) e após (+) a injeção da insulina (IP com anti-IR e IB com antifosfotirosina - pY). **C)** Expressão do IRS-1 (IP e IB com anti-IRS-1). **D)** Fosforilação do IRS-1 (IP com anti-IRS-1 e IB com pY). **E)** Associação do IRS-1 com a PI-3q (IP com anti-IRS-1 e IB com anti-PI-3q). **F)** Expressão IRS-2 (IP e IB com anti-IRS-2). **G)** Fosforilação do IRS-2 (IP com anti-IRS-2 e IB com anti-pY). **H)** Associação do IP com anti-IRS-2 e IB com anti-PI-3q. **I)** Expressão da Akt (IB anti-Akt). **J)** Fosforilação da Akt (IB com anti-pAkt). **K)** Expressão da JNK1 (IB com anti-JNK1). **L)** Fosforilação da JNK (IB com anti-pJNK). **M)** Associação do IP com anti-IRS-1 e IB com anti-JNK1. **N)** Fosforilação em serina 307 do IRS-1 (IB com anti-IRS-1^{ser307}). Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR⁺, **P <0,001 vs. NR⁺, §p<0,05 vs. NR⁻.

Figura 18: Fosforilação do fator de transcrição Foxo1. Este fator foi avaliado no **A) FÍGADO** **B) MÚSCULO GASTROCNÊMIO** e **C) TECIDO ADIPOSITO BRANCO** antes (-) e após (+) o estímulo com a injeção da insulina em animais na dieta HO (n=5) ou NR (n=5) na idade adulta. Uma Alíquota do extrato total contendo a mesma quantidade de proteína foi utilizada para "immunoblotting" (IB) com anticorpo anti-pFOXO1. As bandas foram analisadas por densitometria óptica. Os resultados estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR⁺.

Tabela 1. Efeitos da variação do consumo de sal na dieta sobre o balanço energético e composição corporal em ratos na 12ª semana de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

Variáveis	HO	n	NR	n	HR	n
Energia ingerida (kJ)	8.874 ± 184,2*	9	9.827 ± 180,5	8	10.402 ± 188,7**	8
% energia absorvida (kJ)	86,52 ± 0,53*	9	90,45 ± 0,63	8	95,91 ± 0,66**	8
Energia fecal (kJ)	1.199 ± 59,32*	9	941 ± 71,75	8	376 ± 32,30**	8
Ganho de energia (kJ)	878,3 ± 132#	9	1.009 ± 110	8	1.333 ± 107	8
Energia metabolizável (kJ)	7.369 ± 147*	9	8.530 ± 145	8	9.625 ± 174**	8
Gasto de energia (kJ)	6.490,3 ± 166*	9	7.478,2 ± 144	8	8.387,1 ± 273**	8
Eficiência metabólica (%)	11,87 ± 1,7	9	11,8 ± 1,2	8	13,9 ± 1,1	8
Proteína na carcaça (mg/g)	254 ± 7,2*	9	209 ± 16,7	8	221 ± 8,2	8
Lipídios na carcaça (g/100g)	17,18 ± 1,16*	9	14,12 ± 0,52	8	13,25 ± 1,04	8
Água na carcaça (%)	63,2 ± 0,4	9	62 ± 0,3	8	62,6 ± 0,7	8

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HR, **p<0,05 vs. NR, #p<0,05 vs. HR. A unidade energética utilizada foi o quilo Joule (kJ). Um quilo caloria corresponde a 4,184kJ.

Tabela 2. Efeitos da variação do consumo de sal na dieta sobre a pressão arterial, glicemia e perfil hormonal em ratos com 12 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

Variáveis	HO	n	NR	n	HR	n
PAC (mmHg)	121 ± 1,5	8	123 ± 2,2	8	136 ± 2,6*	8
Glicemia de jejum (mmol/l)	5,8 ± 0,12**	7	4,8 ± 0,15	9	5,0 ± 0,12	8
Insulinemia de jejum (pmol/l)	712 ± 61,5**	7	257 ± 45,4	5	326 ± 32,1	8
Leptina (ng /ml)	9.7 ± 1,0	12	8.4 ± 0,6	10	4.5 ± 0,4*	8
Adiponectina sérica (µg/ml)	3,4 ± 0,1	8	3,5 ± 0,2	8	4,7 ± 0,3*	8

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. HO e NR, **p<0,05 vs. NR e HR.

Tabela 3. Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a atividade motora geral em ratos com 8 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

Variáveis	HO (n= 8)	NR (n= 8)	HR (n= 8)
Nº de bolos fecais	4,13 ± 1,32	1,88 ± 0,93	5,38 ± 0,94
Frequência de levantar	16,00 ± 2,69	14,88 ± 1,60	15,00 ± 3,41
Freq. de locomoção na área central + intermediária	11,37 ± 4,00	9,63 ± 2,60	8,00 ± 1,55
Freq. de locomoção periférica	65,75 ± 11,21	65,88 ± 9,52	52,13 ± 11,24
Freq. de locomoção total	77,13 ± 11,71	75,50 ± 10,24	60,13 ± 12,58
Tempo na área central e intermediária (s)	34,75 ± 17,97	24,25 ± 5,85	37,63 ± 8,13
Tempo na área periférica (s)	265,25 ± 17,97	275,75 ± 5,85	262,38 ± 8,13
Tempo de limpeza (s)	48,13 ± 8,40	43,13±10,16	45,25 ± 10,32
Peso corporal (g)	351,75 ± 9,87*	322,00±8,19	294,50 ± 5,95**

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HR, ** p<0,05 vs. NR. A variável bolo fecal foi avaliada por ser uma característica de aumento de atividade ou estresse do animal.

Tabela 4. Efeitos da variação no consumo de sal na dieta sobre a atividade motora geral em ratos com 12 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

Variáveis	HO (n= 8)	NR (n= 8)	HR (n= 8)
Nº de bolos fecais	2,63 ± 1,07	3,13 ± 0,79	5,13 ± 0,81
Frequência de levantar	25,75 ± 4,06	21,25 ± 2,45	16,38 ± 3,61
Freq. de locomoção na área central + intermediária	12,25 ± 3,00	11,25 ± 3,60	6,63 ± 2,50
Freq. de locomoção periférica	81,38 ± 7,54	77,63 ± 12,41	53,00 ± 11,28
Freq. de locomoção total	93,63 ± 9,17	88,88 ± 15,11	59,63 ± 12,56
Tempo na área central e intermediária (s)	23,75 ± 5,08	16,00 ± 5,75	21,38 ± 7,12
Tempo na área periférica (s)	276,25 ± 5,08	284,00 ± 5,75	278,63 ± 7,12
Tempo de limpeza (s)	29,00 ± 4,78	26,63 ± 5,54	33,25 ± 12,94
Peso corporal (g)	483,50 ± 9,5*	431,50 ± 6,2	392 ± 8,7**

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HR, ** p<0,05 vs. NR. A variável bolo fecal foi avaliada por ser uma característica de aumento de atividade ou estresse do animal.

Tabela 5. Concentração de ANGIO II no plasma, no tecido adiposo marrom (TAM) e no tecido adiposo branco (TAB) periepídídimal em ratos com 12 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

	HO	n	NR	n	HR	n
Angio II plasmática (ng/ml)	97,41 ± 9,61	4	75,29 ± 10,08	4	14,19 ± 4,15*	4
Angio II no TAM (ng/g)	283,5 ± 43,87**	4	129 ± 9,0	4	119 ± 6,84	4
Angio II no TAB (ng/g)	52,25 ± 12,70**	4	102,6 ± 13,75	4	120,1 ± 11,31	4

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR e HO, **p<0,05 vs. NR e HR.

Tabela 6. Quantificação de ANGIO II por imuno-histoquímica no tecido adiposo marrom (TAM), no tecido adiposo branco (TAB) e no hipotálamo em ratos com 12 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde o desmame

ANGIO II	HO	n	NR	n	HR	n
TAM (pontos/campos)	9,27 ± 0,81*	5	6,77 ± 1,45	5	4,41 ± 1,11	5
TAB mesentérico (nº cell/campo)	13,46 ± 2,28*	5	21,42 ± 4,28	5	36,28 ± 7,27	5
TAB retroperitoneal (nº cell/campo)	16,40 ± 5,23	4	15,56 ± 3,66	5	21,24 ± 4,57	5
Hipotálamo (pontos/campos)	4,83 ± 0,66**	6	14,54 ± 2,82	5	17,51 ± 2,55	4

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. HR, **p<0,05 vs. NR e HR.

Tabela 7. Efeitos da variação do consumo de sal na dieta sobre adiposidade e o índice de HOMA em ratos com 12 semanas de vida. Estes animais foram alimentados com dieta hipossódica (HO) ou normossódica (NR) desde o desmame

Variáveis	HO	NR
Peso corporal (g)	435 ± 8*	407 ± 9
TAB periepididimal (g/100g)	1,80 ± 0,10*	1,46 ± 0,09
TAB retroperitoneal (g/100g)	1,97 ± 0,13*	1,45 ± 0,16
TAB mesentérico (g/100g)	1,69 ± 0,18**	1,07 ± 0,08
Índice de HOMA	26,2 ± 2,4 ***	8,0 ± 1,5

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro-padrão da média. *p<0,05 vs. NR, **p<0,01 vs. NR, *** p<0,001 vs. NR. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

Os principais resultados encontrados no presente estudo foram:

Ratos Wistar em dieta HO apresentaram na idade adulta:

- Maior peso corporal associado com aumento da massa de tecido adiposo, conteúdo de proteína e gordura corporal.
- Menor consumo de ração.
- Maior insulinemia e glicemia de jejum.
- Maior resistência à insulina avaliada pelo índice de HOMA.
- Menor gasto energético associado à diminuição da expressão da proteína UCP-1 no TAM.
- Maior concentração de ANGIO II no TAM e menor conteúdo de ANGIO II no TAB mesentérico e no hipotálamo.
- Maior resistência insulínica no fígado e músculo associada com ativação da proteína JNK e fosforilação em serina 307 do IRS-1, diminuição da via de sinalização da enzima PI-3q e da proteína Akt.
- Aumento na via de sinalização da enzima PI-3q e da proteína Akt no tecido adiposo foi associado com maior fosforilação inibitória do fator de transcrição Foxo1.

Ratos Wistar em dieta HR apresentaram na idade adulta:

- Maior pressão arterial.
- Maior ingestão hídrica e volume urinário.
- Menor peso corporal acompanhado de um maior consumo de ração.
- Maior gasto energético associado com aumento da expressão da proteína UCP-1 no TAM.
- Maior concentração de adiponectina sérica e diminuição de leptina plasmática.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciaram que sobrecarga ou restrição crônica de sal na dieta (do desmame à idade adulta) tem influência sobre o peso corporal de ratos Wistar machos. Foi verificado que as alterações de peso estavam associadas com modificações no gasto energético, na expressão da proteína UCP-1, no perfil hormonal e no SRA local e sistêmico, em ratos na idade adulta.

No desmame, o peso corporal não foi diferente entre os grupos de dieta. No entanto, a partir da 8ª semana de idade, o peso corporal foi maior no grupo em dieta HO e menor no grupo em dieta HR. Esta diferença manteve-se até a 12ª semana, sugerindo que a variação do conteúdo de sal da dieta tem influência sobre o peso corporal de ratos Wistar machos. Este achado confirma os resultados obtidos em estudos realizados neste laboratório (da Costa et al., 1997, Prada et al., 2000) e por outros grupos (Catanozi et al., 2001, Okamoto et al., 2004), que demonstraram que ratos Wistar submetidos cronicamente à dieta HO desde o desmame apresentaram na idade adulta maior peso corporal associado com aumento da massa de tecido adiposo, menor sensibilidade à insulina e alterações no metabolismo lipídico. No estudo atual, foi possível identificar o momento a partir do qual as diferenças de peso se manifestaram.

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial definida como um excesso de massa de tecido adiposo. O aumento de massa adiposa ocorre em função de alterações crônicas no balanço energético que induzem maior ingestão calórica e menor gasto energético (Iossa et al., 1999). Considerando os conceitos retro-mencionados, os resultados de estudos anteriores do nosso laboratório indicam que a dieta HO induz à obesidade na idade adulta (Prada et al., 2000) e confirmados no presente estudo pelo aumento da massa de tecido adiposo nestes animais.

A primeira hipótese que surgiu para explicar as diferenças de peso corporal entre os 3 grupos de dieta foi uma variação no consumo de ração.

Os ratos em dieta HO apresentaram maior peso mesmo consumindo menor quantidade de ração e o inverso foi verificado no grupo HR, ou seja, menor peso corporal associado com maior consumo de ração. O consumo de ração avaliado durante 30 dias não explica as diferenças de peso corporal observadas entre os grupos de dieta e desta forma a mencionada hipótese não foi confirmada. Uma das possíveis explicações para estes resultados seriam alterações crônicas no balanço energético destes animais.

Segundo Iossa et al. (1999), o balanço energético, em condições fisiológicas, é mantido por um equilíbrio entre a ingestão calórica e gasto energético. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio, a longo prazo, entre estas variáveis, o balanço energético pode ser positivo (ingestão calórica maior do que o gasto energético) favorecendo o desenvolvimento de obesidade ou negativo (ingestão calórica menor do que o gasto energético) induzindo a diminuição do estoque energético e do peso corporal.

Neste estudo, o balanço energético foi avaliado por calorimetria direta em ratos com 8 e com 12 semanas de idade. Os ratos em dieta HO apresentaram menor gasto energético e o inverso foi observado no grupo HR, indicando um balanço energético positivo e negativo, respectivamente. Desta forma, os resultados observados em ratos submetidos à restrição de sal na dieta indicam que é plausível ocorrer aumento de peso corporal associado com menor quantidade de energia ingerida e metabolizável, desde que o gasto energético do animal também seja menor.

A obesidade pode ser gerada na vigência de menor consumo calórico desde que ocorra uma redução maior nas necessidades energéticas do organismo (Iossa et al., 1999, Lionetti et al., 1996). Redução do gasto energético pode ocorrer em consequência de alterações na capacidade funcional e termogênica do TAM, no perfil hormonal e na atividade física. Xavier et al. (2003),

estudando ratos Wistar, avaliaram a capacidade funcional do TAM, após injeção de noradrenalina (estimulador fisiológico do metabolismo no TAM). Os ratos em dieta HO apresentaram uma diminuição da capacidade funcional e termogênica no TAM (temperatura do tecido) e uma redução da temperatura retal. Neste estudo foi mostrado também que a capacidade de ligação da guanosina 5'-difosfato (GDP) às mitocôndrias deste tecido, foi menor no grupo HO, indicando menor quantidade de UCP-1 exposta na membrana mitocondrial do TAM. A associação deste trabalho com os resultados do presente estudo sugere que a diminuição da capacidade termogênica no TAM, em ratos na dieta HO, pode ter contribuído para o aumento da adiposidade e do peso. O inverso também pode ser verdadeiro para explicar a diminuição de peso corporal no grupo HR.

O TAM frente a uma sobrecarga calórica é capaz de aumentar o gasto energético e quando ocorre uma redução na ingestão calórica este tecido pode agir diminuindo o gasto energético (Rothwell et al., 1979, Stock 1999). Sendo assim, no presente trabalho investigamos melhor a participação do TAM na regulação do peso corporal e do gasto energético avaliando as alterações na expressão da proteína UCP-1.

A função principal do TAM é a produção de calor e sua capacidade calorigênica é mantida pela oxidação dos ácidos graxos provenientes dos estoques endógenos de triacilgliceróis. Um dos principais elementos responsáveis pela capacidade de dissipação de energia neste tecido é a proteína UCP-1 (Ricquier et al., 1990).

No presente estudo, a expressão da proteína UCP-1 no TAM foi maior no grupo em dieta HR e menor nos ratos em dieta HO. Segundo Masaki et al. (2003) foi relatado que a expressão da proteína UCP-1 no TAM é um bom marcador do gasto energético. Assim sendo, estes resultados também contribuem para a confirmar a hipótese de que menor/maior atividade do TAM está associada ao maior/menor ganho de peso nos ratos em dieta HO e HR, respectivamente.

É conhecido que a termogênese via proteína UCP-1 pode ser influenciada por alguns hormônios dentre eles a leptina (Masuzaki et al., 1997).

Após a descoberta da leptina (Zhang et al., 1994) ficou também evidenciado que o tecido adiposo branco participa ativamente do controle do gasto energético e do peso corporal (Ahima et al., 2000), pois este hormônio contribui para a redução do peso e massa adiposa diminuindo a ingestão de alimentos e o gasto energético (Campfield et al., 1995, Frederich et al., 1995, Maffei et al., 1995, Ahima et al., 2000).

No presente estudo, os ratos em dieta HR apresentaram menor concentração de leptina plasmática e o inverso foi verificado no grupo HO. Por outro lado, o aumento de leptina circulante no grupo HO não foi capaz de controlar o peso corporal, indicando uma possível resistência à ação da leptina no hipotálamo. Desta forma é possível que a ação efetiva da leptina sobre o controle do peso corporal que ocorre em condições fisiológicas se modifique por ocasião da restrição de sal na dieta. De fato, na situação de sobrecarga salina constatamos diminuição da concentração de leptina plasmática, aumento no consumo alimentar e diminuição do peso corpóreo, resultados indicativos de plena atuação fisiológica da leptina.

Scarpace et al. (2000) descreveram uma associação entre o grau de obesidade e resistência a leptina, em ratos Brown Norway. Estes animais apresentaram um aumento gradual da leptina circulante associada com maior adiposidade e maior peso corporal. Entretanto, estes resultados não foram acompanhados por um aumento progressivo na ingestão alimentar no período estudado. Estes ratos apresentaram uma diminuição da transmissão da sinalização da leptina para o hipotálamo com redução da fosforilação da proteína STAT3. Além disso, atualmente considera-se que a proteína STAT3 é um fator importante para a transdução do sinal da leptina no hipotálamo (Sahu 2004). Assim sendo, seria interessante investigar se eventualmente no grupo HO a

diminuição da sinalização da proteína STAT3 no hipotálamo está relacionada às alterações do comportamento alimentar e peso corporal.

A ADP foi outro hormônio estudado neste trabalho. Os ratos em dieta HR apresentaram maior concentração de ADP e o resultado oposto foi observado no grupo HO. Em humanos e roedores, a concentração de ADP encontra-se diminuída em condições de obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo 2 (Ouchi et al., 1999, Hotta et al., 2000, Tsao et al., 2002).

Em camundongos com resistência à insulina, o tratamento crônico com ADP reduziu o ganho de peso corporal sem alterar a ingestão alimentar (Yamauchi et al., 2003) e reverteu a resistência (Yamauchi et al., 2001). Segundo os autores, estes efeitos são atribuídos a maior oxidação de ácidos graxos e captação de glicose pela ativação do fator de transcrição PPAR- α e da proteína MAP quinase (Yamauchi et al., 2003). Os autores sugerem que a oxidação de ácidos graxos foi independente da lipase hormônio sensível, indicando que a redução dos ácidos graxos plasmáticos poderia resultar da aceleração de sua captação tecidual e não da estimulação da lipólise (Fruebis et al., 2001).

No presente trabalho, a maior concentração de ADP no grupo HR pode ter contribuído para um aumento do catabolismo dos ácidos graxos e conseqüentemente diminuição da massa adiposa e melhora na sensibilidade à insulina por ativação do fator de transcrição PPAR- α e da proteína MAP quinase. E como hipótese, é plausível que o inverso seja verdadeiro para o grupo HO. No entanto, este comentário é apenas especulativo e merece ser investigado.

Alteração no SRA plasmático e tecidual seria uma eventual hipótese para explicar as diferenças de peso corporal entre as dietas.

No presente estudo, a dieta HO aumentou a concentração de ANGII no TAM e no plasma. Esse aumento de ANGII no plasma do grupo em dieta HO não atingiu diferença estatística em relação ao grupo em dieta NR.

Entretanto, o conteúdo de ANGIO II foi menor no TAB mesentérico e hipotálamo. Além disso, não houve diferença de ANGIO II no TAB retroperitoneal, sugerindo que a participação do SRA na regulação do peso corporal destes animais poderia ser tecido específico. É plausível sugerir que o aumento do peso corporal, no grupo HO, possa ser decorrente de um efeito hipertrófico no TAB (Ailhaud et al., 2000) causado pela elevação de ANGIO II circulante. Os resultados do presente estudo sugerem que a dieta HO pode modular de forma diferenciada o conteúdo de ANGIO II nos tecidos em relação ao plasma. Entretanto, não podemos afirmar que o SRA sistêmico sobrepõe ao tecidual frente a restrição de sal na dieta para regular o peso corporal.

Resultados anteriores deste laboratório e da literatura, nos ratos em dieta HR, mostraram menor atividade da renina plasmática concomitante com redução de peso corporal (da Costa Lima et al., 1997, Prada et al., 2000, Cholewa et al., 2001). Outros estudos evidenciaram uma correlação positiva entre a concentração de AGT e atividade de renina plasmática com a massa de tecido adiposo (Bloem et al., 1995, Licata et al., 1994).

Em relação ao maior peso no grupo HO, alguns autores evidenciaram que a concentração de ANGIO II plasmático tem efeitos sobre o metabolismo, o crescimento e a diferenciação dos adipócitos (Zorad et al., 1995, Engeli et al., 2003) promovendo a lipogênese, inibindo a lipólise e indiretamente estimulando a síntese de prostaglandinas. Por outro lado, em adipócitos maduros a ANGIO II pode inibir o recrutamento de pré-adipócitos (Engeli et al., 2003).

Kouyama et al. (2005) observaram, em camundongos com supressão do gene para o receptor AT1 e submetidos à dieta hipercalórica, uma diminuição no ganho de peso corporal, na adiposidade e na resistência à insulina sem alteração na ingestão alimentar. Os autores também constatarem um aumento do gasto energético (temperatura retal, consumo de oxigênio e expressão da UCP-1) e atividade simpática (excreção urinária de catecolaminas). Por outro lado, resultados semelhantes também foram demonstrados em camundongos com

supressão do gene para o receptor AT₂ (Yvan-Charvet et al., 2005). Os efeitos protetores foram atribuídos ao aumento do gasto energético e da oxidação de lipídios e a participação dos fatores de transcrição PPAR α - e PPAR- β .

Neste contexto, podemos sugerir que o aumento de ANGIO II no plasma e no TAM no grupo HO poderá ser responsável pela diminuição do gasto energético e eventualmente da oxidação de lipídios. O aumento de ANGIO II plasmática no grupo HO poderia também exercer um efeito trófico no TAB, favorecendo tanto a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos. Estudos adicionais serão necessários para confirmar estas conjeturas.

Um outro fator que pode ter contribuído para as diferenças de peso corporal entre os grupos de dieta foi à variação na ingestão hídrica. Esta hipótese surgiu em função do trabalho de Boschmann et al. (2003). Eles demonstraram em pacientes obesos, que o aumento crônico da ingestão hídrica reduzia o peso corporal associada com aumento do gasto energético.

Como esperado, os ratos em dieta HR apresentaram maior ingestão hídrica e conseqüentemente maior excreção de volume urinário. Estes resultados foram constantes durante os 30 dias de avaliação. Nos ratos em dieta HO o resultado obtido foi o inverso. O mecanismo pelo qual o aumento da ingestão hídrica pode contribuir para a diminuição do peso corporal é pouco estudado.

A regulação do peso corporal é um assunto complexo e dependente de vários mecanismos. Uma outra hipótese para explicar as diferenças de peso corporal entre os grupos de dieta poderia ser aquela proposta por Tou et al. (2002) sugerindo que a redução do gasto energético pode estar associada com diminuição da atividade física, uma vez que esta última é considerada como um fator importante para o aumento do ganho de peso e da obesidade. Foi verificado no presente estudo que a atividade motora espontânea dos animais avaliada com 8 e com 12 semanas de idade não foi diferente entre os 3 grupos

de dieta permitindo assim inferir que as alterações no peso corpóreo não estão relacionadas a diferenças na atividade física dos animais.

Os ratos que receberam sobrecarga crônica de sal apresentam maior PAc em comparação ao grupo NR e HO. Em estudos anteriores no nosso Laboratório (da Costa et al., 1997, Prada et al., 2000) foi observado resultado semelhante havendo concordância com os resultados obtidos neste trabalho.

Sinalização da insulina

Os resultados do presente estudo, em ratos na idade adulta, mostraram que a ingestão de dieta HO leva ao aumento do peso corporal e da massa de tecido adiposo (periepídimo, retroperitoneal e mesentérico) e induziu resistência à insulina.

A resistência insulínica destes animais foi avaliada pelo índice de HOMA, confirmando os resultados anteriores do laboratório (Prada et al., 2000) obtidos pelo "clamp" euglicêmico hiperinsulinêmico. Foi verificada também alteração na transdução do sinal da insulina no fígado e músculo dos animais em estudo.

Os efeitos da restrição de sal sobre a sensibilidade à insulina foi motivo de investigação em outros trabalhos (Rocchini 1994, Prada et al., 2000, Okamoto et al., 2004). No entanto, na literatura ainda não existe um consenso sobre o mecanismo molecular pelo qual a dieta HO induz diminuição da sensibilidade à insulina.

No presente estudo, após estímulo com insulina, a transdução do sinal da insulina no fígado mostrou-se prejudicada nos ratos em dieta HO. Houve uma diminuição da fosforilação em tirosina do substrato IRS-1 e IRS-2 e na sua associação com a enzima PI-3q e uma diminuição na fosforilação da proteína Akt. A interação da PI-3q com as proteínas IRSs são essenciais para as ações metabólicas e mitogênicas da insulina (Shepherd et al., 1995).

No músculo, após estímulo com insulina, houve uma diminuição na fosforilação da tirosina do IRS-1 e sua associação com a PI-3q e uma diminuição na fosforilação da proteína Akt. Estudos prévios mostraram que no músculo o substrato IRS-1 é mais importante do que o IRS-2 para mediar os efeitos da insulina sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios (Yamauchi et al., 1996, Previs et al., 2000).

A proteína Akt participa diretamente da ação da insulina estimulando a translocação do GLUT4, da fosforilação da enzima glicogênio sintetase e ativação de fatores de transcrição (Cross et al., 1995, Le Roith et al., 2001, Saltiel et al., 2001). A fosforilação da proteína Akt inativa o fator de transcrição Foxo1 no núcleo e inibe sua atividade transcricional (Kops et al., 1999, Kaestner et al., 2000) prejudicando a transdução do sinal da insulina e tendo efeitos sobre o metabolismo de glicose e lipídico (Altomonte et al., 2003, 2004). Isto sugere que alterações na sinalização da insulina no fígado e no músculo de ratos em dieta HO possam ter contribuído para desencadear a resistência à insulina nestes animais.

No tecido adiposo branco, as etapas iniciais da transmissão do sinal da insulina apresentaram modulação diferenciada. Nos ratos em dieta HO houve uma diminuição na fosforilação da tirosina do IRS-1 e um aumento na fosforilação do IRS-2 em concordância com a atividade da enzima PI-3q. O resultado interessante foi o aumento na fosforilação da proteína Akt, sugerindo que neste tecido a sinalização da insulina via IRS-1 se sobrepôs aos efeitos do IRS-2. Estudos de Previs et al. (2000), utilizando animais com supressão do gene para o IRS-1 e IRS-2, contribuíram para explicar melhor a regulação tecido-específico dos substratos IRSs sobre o metabolismo dos carboidratos. Nos animais com supressão do gene para IRS-1, o transporte de glicose estimulado pela insulina foi prejudicado no músculo e tecido adiposo. O mesmo não ocorreu nos animais com supressão do gene para o IRS-2. Araki et al. (1994)

e Yamauchi et al. (1996) mostraram que o IRS-1 tem função predominante sobre o músculo e o IRS-2 sobre o fígado e tecido adiposo.

No presente estudo, a ativação da proteína Akt no tecido adiposo de ratos em dieta HO contribuiu para a estimulação negativa do fator de transcrição Foxo1, aumentando sua fosforilação/inativação. Nakae et al. (2003), mostraram neste tecido um aumento da diferenciação dos adipócitos em função da inativação da Foxo1. E o aumento da fosforilação do IRS-2 e ativação da PI-3q em conjunto com a ativação da proteína Akt contribuíram para lipogênese por inativação do fator de transcrição Foxo1.

Dados da literatura verificaram que a proteína Akt regula diretamente a transcrição de genes através da sua ação sobre fatores de transcrição. O fator de transcrição Foxo1 foi descrito como um efetor na sinalização da insulina em vários tecidos que participam do metabolismo de glicose (Kops et al., 1999). Na ausência de estímulos com a insulina, a proteína Foxo1 está presente no núcleo das células do fígado, músculo e tecido adiposo, onde participa da transcrição de genes que regulam a gliconeogênese, lipogênese e diferenciação de pré-adipócitos. A função da Foxo1 é inibida pela estimulação com a insulina e fatores de crescimento (Farmer et al., 2003), através da ação da proteína Akt, que fosforila a Foxo1 e esta migra do núcleo para o citoplasma (Birkenkamp et al., 2003, Nakae et al., 2003).

Em outros modelos de resistência insulínica, foi demonstrado que no tecido adiposo há um aumento na via de sinalização da insulina (IRS-2/PI-3q/Akt), bem como maior adiposidade (Hirata et al., 2003, Prada et al., 2005) e confirmados no presente estudo.

No presente estudo, no fígado e no músculo de ratos em dieta HO, houve um aumento na fosforilação da proteína JNK1 associada com a maior fosforilação em serina 307 do IRS-1, sugerindo o possível mecanismo pelo qual dieta HO induz resistência à insulina. O mecanismo provável para a alteração da via de sinalização da insulina no fígado e músculo foi a maior fosforilação em a

serina 307 do IRS-1 que está envolvida com indução de resistência à insulina (Tanti et al., 1994, Hotamisligil et al., 1996, Mothe et al., 1996). É conhecido que a ativação da proteína JNK induz a fosforilação em serina 307 do IRS-1 (Aguirre et al., 2002) bloqueando a interação do receptor da insulina com seus substratos e inibindo a ação da insulina na célula. Em outro modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura, Prada et al. (2005) verificaram um aumento na fosforilação da proteína JNK1 e do substrato IRS-1 em serina 307 associado com resistência à insulina. No presente estudo, apesar de ter sido demonstrado no tecido adiposo uma redução na fosforilação da tirosina do IRS-1, esta não foi acompanhada por um aumento na fosforilação do IRS-1^{Ser307} ou na ativação da proteína JNK. Estes resultados nos permitem sugerir que a proteína JNK1 não foi importante na redução da fosforilação do IRS-1 e que a fosforilação de outras serinas podem participar desta modulação.

Dados da literatura mostraram outros dois mecanismos que podem contribuir para a redução da fosforilação da tirosina do substrato IRS-1. O primeiro estudo mostrou um aumento na atividade da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) que atua como um efector negativo do IR, defosforilando o IR e o substrato IRS-1 (Goldstein et al., 2000). Recentemente, foi descrito um novo mecanismo de modulação do substrato IRS-1 através da nitrosação ou nitrosilação desta proteína, o qual reduz a atividade de tirosina quinase do IR e do IRS-1 (Carvalho-Filho et al., 2004). Estas são duas possibilidades que merecem ser investigadas no grupo HO, além de um estudo em camundongos com supressão do gene para proteína JNK-/-.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

Restrição ou sobrecarga crônica de sal na dieta tem influência sobre o peso corporal associado com alterações no perfil hormonal, no balanço energético e na atividade do SRA plasmático e tecidual em ratos Wistar na idade adulta.

A resistência à insulina induzida pela dieta HO é tecido específico nos animais estudados. No fígado e músculo, esta resistência está associada com a ativação da proteína JNK e fosforilação em serina 307 do IRS-1, a qual diminuiu a via de sinalização da enzima PI-3q e da proteína Akt prejudicando a transdução do sinal da insulina nestes tecidos.

No tecido adiposo branco, a dieta HO não induziu resistência insulínica. Foi observado um aumento na via de sinalização da enzima PI-3q e da proteína Akt, a qual estimulou negativamente a fosforilação/inativação da Foxo1 que pode ter contribuído para o aumento da adiposidade nos animais em dieta HO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

1. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J Biol Chem*. 2002;277:1531-1537.
2. Ahima RS, Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. *TEM*. 2000; 11:327-332.
3. Ahima RS, Flier J. Leptin. *Ann Rev Physiol*. 2000;62:413-437.
4. Ailhaud G, Fukamizu A, Massiera F, Negrel R, Saint-Marc P, Teboul M. Angiotensinogen, angiotensin II and adipose tissue development. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24:S33-S35.
5. Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M, Dong HH. Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *The Journal Clinical Investigation*. 2004;114:1493-1503.
6. Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, Thung SN, Meseck M, Accili D, Dong H. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E718-E728.
7. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951;77:323-324.
8. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372:186-190.
9. Banks WA, Kastin AJ, Huang et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17:305-311.
10. Bating FG, Best CH. Pancreatic extracts. *J Lab Clin Med*. 1992;7:464-672.

(*) De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) 2005*. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

-
11. Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit.* 2003;9:RA55-RA61.
 12. Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:292-297.
 13. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-331.
 14. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in White and black children. *J Clin Invest.* 1995;95:948-953.
 15. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000;23:57-63.
 16. Boschmann M, Steiniger J, Hille U, Tank J, Adams F, Sharma AM, Klaus S, Luft FC, Jordan J. Water-induced thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:6015-6019.
 17. Bouchard C, Perusse L. Genetics of obesity. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:337-354.
 18. Bouchard C. Current understanding of etiology genetic and nongenetic factors. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:1561S-1565S.
 19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
 20. Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eysenck, HJ. ed. *Experiments in personality.* London, Routledge and Kegan Paul, 1960.
 21. Camplield LA, Smith FJ, Guisez J, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:456-549.
 22. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.

-
23. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JBC, Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJA. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2004;54:959-67.
 24. Catanozi S, Rocha JC, Nakandakare ER, Passarelli M, Mesquita CH, Silva AA, Dolnikoff MS, Harada LM, Quintao EC, Heimann JC. The rise of the plasma lipid concentration elicited by dietary sodium chloride restriction in Wistar rats is due to an impairment of the plasma triacylglycerol removal rate. *Atherosclerosis*. 2001;158:81-86.
 25. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care*. 1994;17:961-969.
 26. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1277-1281.
 27. Chiavegatto S, Nasello AG, Bernardi MM. Histamine and spontaneous motor-activity: biphasic changes, receptors involved and participation of the striatal dopamine system. *Life Sci*. 1989;62:1875-1888.
 28. Cholewa, BC, Mattson, DL. Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice. *Am J Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2001;281:R987-R993.
 29. Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med*. 1995;122:481-486.
 30. Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, Maas D, Takahashi M, Kihara S, Tanaka S, Matsuzawa Y, Blangero J, Cohen D, Kissebah A. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:4321-4325.
 31. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292-295.
 32. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378:785-789.

-
33. Cutler JA, Follmann D, Elliott P, Suh I. An overview of randomized trials of sodium reduction and blood pressure. *Hypertension*. 1991; 17(suppl I):I27-I33.
 34. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999;274(4):1865-1868.
 35. da Costa Lima NK, Lima FB, dos Santos EA, Okamoto MM, Matsushita DH, Hell NS, Heimann JC. Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity. *Am J Hypertens*. 1997;10:720-727.
 36. Dahl LK, Heine M, Tassinari. Effect if chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med*. 1962;115:1173-1190.
 37. De Silva A, De Courten M, Zimmet P, Nicholson G, Kotowicz M, Pasco J, Collier GR. Lifestyle factors fail to explain the variation in plasma leptin concentrations in women. *Nutrition*. 1998;14(9):653-7.
 38. Denton D, Weisinger R, Mundy NI, Wickings EJ, Dixon A, Moisson P, Pingard AM, Shade R, Carey D, Ardaillou R. The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nature Med*. 1995;1:1009-1016.
 39. Denton D. Can hypertension be prevented? *J Human Hypertension*. 1997;11:563-569.
 40. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(3):293-300.
 41. DiPietro L, Mossberg HO, Stunkard AJ. A40-year history of overweight children in Stockholm: life-time overweight, morbidity and mortality. *Int J Obes Disord*. 1994;18:585-590.
 42. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:807-825.
 43. Erlanson-Albertsson. The role of uncoupling protein in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand*. 2003;178:405-412.
 44. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and

adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273-2282.

45. Farmer Sr. The forkhead transcription factor Foxo1: a possible link between obesity and insulin resistance. The forkhead transcription factor Foxo1: a possible link between obesity and insulin resistance. *Mol Cell*. 2003;11(1):6-8.
46. Ferrannini E, Haffber SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia*. 1991;121:1283-1288.
47. Ferrannini E; Buzzigoli G; Bonadonna R; Giorico MA; Oleggini M; Graziadei L; Pedrinelli R; Brandi L; Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*. 1987;317-357.
48. Filozof C, Gonzalez C, Sereday M, Mazza C, Branguinsky. Obesity prevalence and trends in Latin-American countries. *Obes rev*. 2001;2:99-106.
49. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004;116(2):337-3350.
50. Fliser D, Fode P, Arnold U, Nowicki M, Kohl B, Ritz E. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest*. 1995;25:39-43.
51. Folch J, Lees M, Sloane Stanley CH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.
52. Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem*. 1992;267:22171-22177.
53. Franco MCP, Akamine EH, Di Marco GS. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the rennin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*. 2003;59:767-775.
54. Frederich RC, Lollman B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn B. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. *J Clin Invest*. 1995;96:1658-1663.
55. Freidman JM. Obesity in the new millennium. *Nature*. 2000;404:632-634.

-
56. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2005-2010.
 57. Gimeno RE, Klamann LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advance. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5:122-128.
 58. Golay A, Bobbioni E. The role of dietary fat in obesity. In *J Obes*. 1997;21:S2-S11.
 59. Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem*. 2000;275:4283-4289.
 60. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995 28;269(5223):543-536.
 61. Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*. 1959;145(2):336-52.
 62. Hetherington AW, Ransonn SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*. 1940;78:149-172.
 63. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carnevalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Saad MJA. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sciences*. 2003;73:1369-1381.
 64. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333-336.
 65. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271:665-6658.
 66. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T,

-
- Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1595-1599.
67. Hsueh WA, Buchanan TA. Obesity and hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994;23:405-427.
68. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996;271(18):10697-10703.
69. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. Energy intake and utilization vary during development in rats. *J Nutr.* 1999;129:1593-1596.
70. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology.* 1998;10:205-219.
71. Iwaoka T, Umeda T, Ohono M, Inoue J, Naomi S, Sato T, Kawakami I. The effect of low and high NaCl on oral glucose tolerance. *Klin Wochenschr.* 1988;66(16):724-728.
72. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N.Y Acad Sci.* 2002;967:379-388.
73. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology.* 2000;141:333-339.
74. JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE (JNC VII). The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA.* 2003;289:2534-2573.
75. Kaestner KH, Knöchel W & Martínez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & Development.* 2000;14:142-146.
76. Kahn CR, Folli F. Molecular determinants of insulin action. *Horm Res.* 1993;39(Suppl 3):93-101.
77. Kaplan NM. Evidence in favor of moderate dietary sodium reduction. *Am J Hypertension.* 2000;13:8-13.

-
78. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 1953;140:656-660.
79. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-2556.
80. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-2556.
81. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(2):254-260.
82. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;406:636-643.
83. Kopp HP, Krzyzanowska K, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, Scherthaner G. Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *J Obes Relat Metab Disord*. 2005;29:766-771.
84. Kops GJPL, Burgering BMT. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:17088-17097.
85. Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology*. 2005;146:3481-3489.
86. Kuczmarski RJ; Flegal KM; Campbell SM et al: increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA*. 1994;272:205-211.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
88. Law MR, Frost CD, Wald NJ. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? III-analysis of data from trials of salt reduction. *BMJ*. 1991;302:819-824.
89. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001;24(3):588-597.

-
90. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J Biol Chem.* 2003;278:2896-2902.
 91. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirisch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med.* 1995;332:621-628.
 92. Leshner AI, Litwin VA, Squibb RL. A simple method for carcass analysis. *Physiol Behav.* 1972;9:281-282.
 93. Licata G, Scaglione R, Ganguzzo A, Corrao D, Donatelli M, Parrinello G, Dichiara MA, Merlino G, Cecala MG. Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in Young obese subjects. *Am J Hypertens.* 1994;7:314-320.
 94. Lionetti L, Iossa S, Brand MD, Liverini G. The mechanism of stimulation of respiration on isolated hepatocytes from rats fed an energy dense diet. *Nutr Biochem.* 1996;7:571-576.
 95. Lissener L, Heitmann BL. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur J Clin Nutr.* 1995;49:79-90.
 96. Lonnqvist F, Wennlund A, Arner P. Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21(4):255-60.
 97. Luz J, Griggio MA. Effects of aging on the energy balance of pregnant rats. *Ann Nutr Metab.* 1998;42:237-243.
 98. MacGregor GA, Markandu ND, Sagnella GA, Singer DR, Cappuccio FP. Double-blind study of three sodium intakes and long-term effects of sodium restriction on essential hypertension. *Lancet.* 1989;2(8674):1244-1247.
 99. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;221(2):286-289.
 100. Maffei MJ, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee Gm. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1:1156-1161.
 101. Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Corticotropin-releasing hormone-mediated

pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology*. 2003;144:3547-3554.

102. Mascioli S, Grimm Jr, Launer C, Svendsen K, Flack J, Gonzalez N, Elmer P, Neaton J. Sodium chloride raises blood pressure in normotensive subjects. The study of sodium and blood pressure. *Hypertension*. 1991;17 (suppl 1):I21-I26.
103. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T. Nonadipose production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3:1029-1033.
104. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome. X. Contribution of adipocytokines, adipocyte-derived bioactive substances. *Ann NY Acad Sci*. 1999;892:146-154.
105. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
106. Meneely GR, Ball CO. Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and the protective effect of potassium chloride. *Am J Med*. 1958;25:713-725.
107. Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeanner F, Seydoux J, Dulloo AG, Giacobino JP. Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Letters*. 1995;373:131-134.
108. Monson JE, Willett WC, Stampfer MJ. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med*. 1995;333:677-685.
109. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D, Bégeot M. Study of the alternation of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology*. 2003;144:4773-4782.
110. Mothe I, Van Obberghen E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem*. 1996;271:11222-11227.
111. Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. IRS-1 activates

-
- phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10350-10354.
112. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2003;4(1):119-129.
113. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996;120(4):803-812.
114. Nicholls DG, Locke R. Thermogenic mechanisms in Brown fat. *Physiol Rev*. 1984;64:1-64.
115. Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985;34:1055-1058.
116. Okamoto MM, Sumida DH, Carvalho CR, Vargas AM, Heimann JC, Schaan BD, Machado UF. Changes in dietary sodium consumption modulate GLUT4 gene expression and early steps of insulin signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286:R779-R785.
117. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102(11):1296-1301.
118. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995;269(5223):540-543.
119. Prada P, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension*. 2000;35:424-429.
120. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. 2005;146:1576-1587.

-
121. Prentice AM, Black AE, Coward WA, Cole TJ. Energy expenditure in overweight and obese adults in affluent societies: an analysis of 319 doubly labeled water measurements. *Euro J Clin Nutr.* 1996;50:93-97.
 122. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275:38990-38994.
 123. Pudel V, Ellrott T. Nutrition behavior in Germany. *Internist (Berl).* 1992;36:1032-1039.
 124. Ravussin E, Swinburn BA. Pathophysiology of obesity. *Lancet.* 1992;340:404-408.
 125. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease: Bating lecture. *Diabetes.* 1988;37:1595-1607.
 126. Ricquier D, Bouillaud L, Casteilla L. The uncoupling protein of brown adipose tissue: physiological and molecular aspects. *UCLA symp. Mol Cel Biol New Ser.* 1990;132:107-116.
 127. Rissanen AM, Heliovaara M, Knekt P, Reunanen A, Aromaa A. Determinants of weight gain and overweight in adult Finns. *Eur J Clin Nutr.* 1991;45:419-430.
 128. Rocchini AP. The relationship of sodium sensitivity to insulin resistance. *Am J Med Sci.* 1994;307:S75-S80.
 129. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature.* 1979;281:31-35.
 130. Ruppert M, Diehl J, Kolloch R, Overlack A, Kraft K, Gobel B, Hittel N, Stumpe KO. Short-term dietary sodium restriction increases serum lipids and insulin in salt-sensitive and salt-resistant normotensive adults. *Klin Wochenschr.* 1991;69(Suppl 25):51-57.
 131. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol.* 2004;24:225-253.
 132. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathway in time and space. *Trends in Cell Biology.* 2002;12:65-71.
 133. Scarpace PJ, Matheny M, She EW. Impaired leptin signal transduction with age-related obesity. *Neuropharmacology.* 2000;39:1872-1879.

-
134. Schapira DV, Clark RA, Wolff PA, Jarrett AR, Kumar NB, Aziz NM. Visceral obesity and breast cancer risk. *Cancer*. 1994;74:632-639.
 135. Sharma AM; Chetty VT. Obesity, hypertension and insulin resistance. *Act Diabetol*. 2005;42:S3-S8.
 136. Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J*. 1995;305:25-28.
 137. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987;45(1 Suppl):277-282.
 138. Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, Wilkinson CW, Woods SC, Schwartz MW. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes*. 1999;48:1275-1280.
 139. Sonne-Holm S, Sorensen T. Post-war course of the prevalence of extreme overweight among Danish young men. *J Chron Dis*. 1977;30:351-358.
 140. Stamler J, Neaton JD, Wentworth DN. Blood pressure (systolic and diastolic) and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension*. 1989;13:I2-I12.
 141. Stamler J, Wentworth DN, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356.222 primary screeners of the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *JAMA*. 1986;256:2823-2828.
 142. Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med*. 1998;338(1):1-7.
 143. Stock MJ. Gluttony and thermogenesis revisited. *Int J Obes*. 1999;23:1105-1117.
 144. Swales J. Population advice on salt restriction: The social issues. *Am J Hypertens*. 2000;13:2-7.
 145. Tanti JF, Gremeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem*. 1994;269:6051-6057.

-
146. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-1271.
 147. Thomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16309-6313.
 148. Tou JCL, Wade CE. Determinants affecting physical activity levels in animal models. *Exp Biol Med*. 2002;227(8):587-600.
 149. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4354.
 150. Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):213-221.
 151. Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia*. 1994;37:S125-S134.
 152. Westerterp KR, Goran MI. Relationship between physical activity related energy expenditure and body composition: a gender difference. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21:184-188.
 153. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1930-1935.
 154. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:3-11.
 155. WHO Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000; 894:i-xii, 1-253.
 156. World Hypertension League. Nonpharmacological interventions as and adjunct to the pharmacological treatment of hypertension: a statement by WHL. *J Hum Hypertens*. 1993;7:159-164.

-
157. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Blomm S. Appetite control. *J Endocrinol*. 2005;184:291-318.
158. Xavier AR, Garófalo MAR, Migliorini RH, Kettelhut IC. Dietary sodium restriction exacerbates age-related changes in rat adipose tissue and liver lipogenesis. *Metabolism*. 2003;52:1072-1077.
159. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423:762-769.
160. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7:941-946.
161. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T. Insulin Signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16:3074-3084.
162. Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulange A. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54:991-999.
163. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-432.
164. Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L, Kral JG. The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys*. 1995;14:383-391.

HIPÓTESE: Regulação do PC DIETA

* Expressão de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos

Anexo 1: Representação esquemática do possível mecanismo pelo qual a dieta hipossódica (HO) induz alterações no peso corporal (PC). A dieta HO está associada com maior PC e menor consumo de ração (CR). ① A hipótese para explicar estes resultados é um menor gasto energético (GE) e menor expressão da proteína UCP-1 no tecido adiposo marrom (TAM). Isto sugere menor capacidade funcional e termogênica do TAM que pode contribuir para uma diminuição da oxidação de ácidos graxos (AG). ② ANGII plasmática tem efeito trófico sobre o tecido adiposo branco (TAB) diminuindo o GE e a oxidação de AG. ③ O aumento de leptina (LEP) circulante é capaz de diminuir o GE por ação direta no TAM interferindo na expressão da UCP-1. Outra hipótese é uma diminuição da transmissão do sinal da leptina no hipotálamo por redução na fosforilação da proteína STAT3, a qual diminui a expressão de genes envolvidos com a regulação do PC. ④ A diminuição de adiponectina (ADP) circulante reduz o influxo de AG não esterificados (AFNE), aumenta a oxidação de AG e reduz a captação de glicose hepática, diminui a produção de óxido nítrico e a expressão de genes envolvidos na diferenciação dos adipócitos. ⑤ O fator de transcrição Foxo1 quando presente no núcleo da célula inibe a transcrição de genes que regulam a gliconeogênese, lipogênese e diferenciação de pré-adipócitos. Após o estímulo com a insulina, o aumento da fosforilação da proteína Akt ativa o Foxo1 no núcleo, o qual migra para o citoplasma e deixa de exercer suas funções. Estas ações em conjunto, como hipótese, contribuem para o aumento da adiposidade.

Anexo 2: Representação esquemática da sinalização da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo. O receptor da insulina é capaz de se autofosforilar e fosforilar substratos celulares (IRS-1 e IRS-2), os quais interagem com moléculas sinalizadoras como a subunidade p85 da enzima PI-3q que ativa a proteína Akt. Esta proteína é capaz de estimular a captação de glicose via GLUT4 (transportador de glicose) e a síntese de glicogênio no fígado e músculo, a lipogênese no tecido adiposo e fosforilação de fatores de transcrição como a Foxo1 no fígado, músculo e tecido adiposo.

Anexo 3: Representação esquemática do mecanismo molecular pelo qual restrição crônica de sal na dieta pode induzir resistência à insulina em ratos Wistar na idade adulta. O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína com atividade de tirosina quinase intrínseca, e quando ativado pela insulina se autofosforila sobre os resíduos de tirosina no domínio citoplasmático. No entanto, a fosforilação pode ocorrer sobre os resíduos da serina do IR, a qual bloqueia a atividade de tirosina quinase do IR. A ativação da proteína JNK pode ser um dos mecanismos pelo qual isto acontece, pois a proteína JNK pode estimular a fosforilação da serina 307 do IRS-1 diminuindo a interação do IR com seus substratos e conseqüentemente prejudicando a sinalização da insulina e contribuindo para a resistência à insulina nos animais em dieta hipossódica (HO).

Protocolo Experimental Geral

Anexo 4: Representação esquemática do protocolo experimental geral. O peso corporal de todos os animais foi avaliado desde o desmame (3ª semana de idade) até a 12ª de idade. O balanço energético foi avaliado em ratos com 8 e com 12 semanas de idade. As demais variáveis foram avaliadas em animais com 12 semanas de idade (idade adulta).

Anexo 5: Representação esquemática do protocolo do balanço energético. Para a avaliação do balanço energético através da calorimetria os ratos nas três dias foram divididos em dois subgrupos ao completarem 8 semanas de idade, o grupo inicial e o grupo final. No grupo inicial, os ratos com 8 semanas de idade foram sacrificados para avaliação do conteúdo de calorias total na carcaça e os resultados foram utilizados para calcular a energia inicial. No grupo final, os animais com 8 semanas foram transferidos para gaiolas metabólicas até completarem 12 semanas de idade. Durante este período todos os dias algumas variáveis foram avaliadas: peso corporal, consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário e coleta do bolo fecal. No final de 30 dias de avaliação estes animais foram sacrificados para avaliação do conteúdo de calorias total na carcaça. O bolo fecal coletado e as rações utilizadas também foram avaliados quanto a seu conteúdo de caloria.

PROCEDIMENTO

Coleta de sangue
 ↓
 Limpeza do tubo digestório
 ↓
 Armazenamento da carcaça do animal

**Determinação
calorimétrica**

Carcaça
Bolo fecal
Ração

**Composição
corporal**

Alíquota do
homogenato
da carcaça

DETERMINAÇÃO CALORIMÉTRICA

**CARCAÇA
FEZES
RAÇÃO**

Calorímetro

Leitura no calorímetro = valor energético

Anexo 6: Representação esquemática dos procedimentos para a determinação calorimétrica e avaliação da composição corporal.

Legenda:

1. Orifício para ventilação do ambiente
2. Recipiente para água
3. Área para acondicionamento do animal
4. Recipiente para armazenamento de ração
5. Coletor de água
6. Coletor de fezes
7. Coletor de urina

Anexo 7: Representação esquemática da gaiola metabólica utilizada para a avaliação do balanço energético.

ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA

Categorias comportamentais:

Frequência de locomoção, frequência de levantar, tempo de permanência, tempo de limpeza do animal e número de bolos fecais.

Anexo 8: Representação esquemática do protocolo para avaliação da atividade motora espontânea em campo aberto. Esta variável foi avaliada em ratos com 8 e 12 semanas de idade na ausência de estímulos externos. A observação do animal foi monitorada por câmera de vídeo e gravada em fita VHS. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e cada sessão durou cinco minutos. As variáveis observadas e registradas no campo-aberto representam categorias comportamentais que são frequência de locomoção, frequência de levantar, tempo de permanência, tempo de limpeza do animal e número de bolos fecais.

PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL

Método osciloscópio

PA sistólica
Frequência cardíaca

Anexo 9: Representação esquemática do aparelho utilizado para a medida de pressão arterial caudal.

Fator de transcrição gênica

(Foxo - "Forkhead box containing protein Q sub-family")

O ↑ da fosforilação da Foxo no adiposo = **OBESIDADE**

Anexo 10: Representação esquemática da possível participação do fator de transcrição Foxo 1 no TECIDO ADIPOSEO BRANCO como um dos mecanismos pelo qual a dieta hipossódica (HO) induz alterações no peso corporal. O processo de diferenciação dos adipócitos requer uma seqüência de eventos, a qual é acompanhada por mudanças características na expressão de genes. É conhecido que o aumento da fosforilação da Foxo1 nos adipócitos pode estar relacionado com o aumento da diferenciação de adipócitos e com o aumento da lipogênese, as quais podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade. A Foxo1 é sensível à ação da insulina e é regulada por algumas proteínas sinalizadoras como a Akt em tecidos alvos da ação da insulina. Este fator de transcrição é importante para mediar os efeitos da insulina e dos fatores de crescimento sobre a expressão de alguns genes e sua função depende do tipo de tecido onde ela está presente. Em condições basais e na ausência de estimulação celular a Foxo1 está presente no núcleo da célula e é sugerido que sua função no tecido adiposo seja inibir a transcrição de genes relacionados com a diferenciação de adipócitos, lipogênese e genes relacionados com o aumento da massa adiposa (Birkenkamp et al., 2003, Nakae et al., 2003). Nos animais em dieta hipossódica (HO) após um estímulo da célula adiposa com insulina houve uma ativação da proteína Akt, a qual é capaz de se deslocar até o núcleo e fosforilar a Foxo1. Em função disto, a Foxo1 migra do núcleo para o citoplasma e se ligada à proteína 14-3-3 e por isto deixa de exercer suas funções no núcleo, sugerindo que os fatores de transcrição no núcleo ora inibidos pela Foxo1 agora estão ativos e podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade.

Fator de transcrição gênica

(Foxo - "Forkhead box containing protein O sub-family")

Anexo 11: Representação esquemática da possível participação do fator de transcrição Foxo1 no FÍGADO e no MÚSCULO GASTROCNÊMIO como um dos mecanismos pelo qual a dieta hipossódica (HO) induz alterações no metabolismo de glicose. A Foxo1 é sensível à ação da insulina e é regulada por algumas proteínas sinalizadoras como a Akt. Este fator de transcrição é importante para mediar os efeitos da insulina e dos fatores de crescimento sobre a expressão de alguns genes e sua função depende do tipo de tecido onde ele está presente. Em condições basais e na ausência de estimulação celular a Foxo1 está presente no núcleo das células hepáticas e musculares. No fígado a Foxo1 participa da transcrição de genes como da glicose-6-fosfatase, a qual regula a gliconeogênese. Nas células musculares a Foxo1 ativa a transcrição de genes que aumentam a expressão da lipase lipoprotéica e aumentam a captação de ácidos graxos (Birkenkamp et al., 2003, Nakae et al., 2003). Em condições normais após a estimulação das células hepáticas e musculares com insulina é esperado um aumento da fosforilação da Foxo1 no núcleo e sua migração para o citoplasma onde ficaria temporariamente inativa. No entanto, nos animais em dieta HO após estímulo das células hepáticas e musculares com insulina houve menor fosforilação da proteína Akt e conseqüentemente uma menor fosforilação da Foxo1. Estes resultados sugerem que o fator de transcrição Foxo1 pode ainda está ativo no núcleo destas células exercendo suas funções. Este fato, como hipótese, pode ter contribuído para o aumento da síntese de glicose nos ratos em dieta HO, o qual apresentou resistência à insulina.

PUBLICAÇÕES