PATRÍCIA PEREIRA NUNES

**A EXPOSIÇÃO CRÔNICA, CONTÍNUA E INVARIÁVEL DO ORGANISMO AO
CORTISOL AUMENTA O TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO ABDOMINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2015

PATRÍCIA PEREIRA NUNES

**A EXPOSIÇÃO CRÔNICA, CONTÍNUA E INVARIÁVEL DO ORGANISMO AO
CORTISOL AUMENTA O TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO ABDOMINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima

Versão original

São Paulo

2015

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

© reprodução total

Nunes, Patrícia Pereira.

A exposição crônica, contínua e invariável do organismo ao cortisol aumenta o tecido adiposo subcutâneo abdominal / Patrícia Pereira Nunes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Fabio Bessa Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do tecido adiposo.

Versão do título para o inglês: Chronic, continuous and invariable body exposure to cortisol increases abdominal subcutaneous adipose.

1. Glicocorticoides 2. Lipogênese 3. Tecido Adiposo I. Lima, Prof. Fabio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0200/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patrícia Pereira Nunes.

Título da Dissertação: A exposição crônica, contínua e invariável do organismo ao cortisol aumenta o tecido adiposo subcutâneo abdominal.

Orientador(a): Prof. Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.047/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 010/10/CEUA, datado de 11.03.10 e por solicitação da Prof. Dr. **Fabio Bessa Lima**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Patrícia Pereira Nunes** ao Projeto de Pesquisa "*Resposta lipogênica dos diferentes coxins adiposos sob condição normal e em excesso de glicocorticoide*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 02 de maio de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais (João e Ana) que não mediram esforços para que eu concluísse o ensino superior, pois se não fosse por eles, eu não teria chegado ao mestrado; e ao meu esposo (Diogo) pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aqueles que me conhecem de perto, ou que convivem diariamente comigo, sabem que o mestrado foi para mim não só a realização de um sonho antigo, como também um grande desafio profissional e pessoal. Por isso, na conclusão deste trabalho eu não poderia deixar de agradecer àqueles que de alguma forma contribuíram para sua realização.

Agradeço primeiramente ao meu Deus e Pai, que me capacitou, me sustentou e me abençoou de forma sobrenatural no decorrer deste tempo. Nunca irei me esquecer das experiências marcantes vividas com o meu Senhor, as quais sei foram instrumentos utilizados por Ele para trazer amadurecimento e me preparar para cumprir seus propósitos em minha vida;

Ao meu amado companheiro Diogo, que se tornou meu esposo no meio desse processo; quem me apoiou, me deu forças nos momentos difíceis e sempre me incentivou; que acompanhou tudo tão de perto, emprestando pacientemente seus ouvidos às inúmeras discussões e raciocínios que eu precisei conduzir comigo mesma, em voz alta. Obrigada por cada opinião, pelo seu interesse e auxílio;

Aos meus pais, João e Ana, meus exemplos de caráter, persistência e coragem. Por todo incentivo, apoio e por tanto esforço investido em meus estudos;

Aos meus sogros Celso e Ângela, pelo incentivo e por me acolherem em seu lar dando todo suporte para que eu pudesse me dedicar aos estudos;

Às minhas valiosas amigas do grupo de oração, minhas intercessoras que cobriram minha vida e também me ajudaram a permanecer de pé diante dos desafios;

Ao meu exímio professor e orientador Fábio Bessa Lima, por ser sempre acessível e tão paciente. Agradeço por cada ensino, auxílio, pelo estímulo ao meu desenvolvimento científico e por ter me dado essa oportunidade mesmo quando eu ainda não tinha experiência;

A todos os colegas de laboratório, que muito me ensinaram e cujo auxílio foi fundamental para a conclusão deste projeto. Em especial à Sandra, que me ensinou e me deu todo suporte técnico. Obrigada pelas várias horas de ajuda e pela contribuição científica;

Às queridas Luciana Belpiede e Bruna Lins, pelo apoio, companheirismo e por me ajudarem inúmeras vezes quando me senti perdida;

À Rosana Prisco do ICB-III, por pacientemente me ajudar a rever a análise estatística;

Aos integrantes da minha banca de qualificação de mestrado – Rui Curi, Carla Carvalho e Claudimara Lotfi – que contribuíram muito para o direcionamento do projeto;

A todos os professores, funcionários e colegas do Instituto de Ciências Biomédicas, do departamento de Fisiologia e Biofísica e da Biblioteca do ICB-I, que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

Finalmente, agradeço à FAPESP pelo financiamento do projeto e auxílio financeiro no formato de bolsa de estudo.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué, 1: 9)

RESUMO

NUNES, P. P. **A exposição crônica, contínua e invariável do organismo ao cortisol aumenta o tecido adiposo subcutâneo abdominal.** 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O uso crônico de glicocorticoides (GC) resulta na expansão dos tecidos adiposos da região central do corpo, embora os mecanismos envolvidos neste processo não estejam totalmente compreendidos. Os estudos encontrados na literatura utilizam doses muito alta desses hormônios. Assim, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento contínuo com GC sobre a lipogênese de diferentes coxins adiposos, utilizando doses mais próximas das concentrações fisiológicas. Foram utilizados vinte e três ratos Wistar machos com 8 semanas de vida. Eles foram mantidos em caixas individuais e alimentados com ração balanceada padrão e água *'ad libitum'*. Ao completar 10 semanas de vida os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: controle (CON, n = 13) e cortisol (CORT, n = 10), então passaram por cirurgia para implante subcutâneo de minibombas osmóticas (Alzet®), pelas quais o grupo CORT recebeu cortisol (hemisuccinato de hidrocortisona) diluído em água destilada (0,6 mg/kg/d) e o grupo CON recebeu apenas salina, com duração de 6 semanas. Durante o tratamento, a massa corporal e o consumo alimentar e hídrico dos animais foram acompanhados 1 vez por semana. No fim do período experimental, estes foram mantidos em 12 h de jejum e eutanasiados às 7 h (início de escuro ambiental). O sangue do tronco, as glândulas adrenais e os coxins adiposos subcutâneo inguinal (SC), retroperitônio (RP) e mesentérico (ME) foram colhidos e armazenados para análises posteriores. Adipócitos foram isolados para análise morfológica e a atividade máxima e expressão proteica de algumas enzimas lipogênicas e da 11 β HSD1 foram mensuradas. Os resultados mostraram que o uso contínuo de GC mesmo em baixa dose foi capaz de induzir o aumento da gordura SC abdominal, ainda que o eixo hipotálamico-hipofisário-adrenal não tenha sido alterado. Porém, não houve diferença entre os grupos para o consumo alimentar e hídrico, para a massa corporal final, ganho de massa (massa final menos massa inicial) e massa dos coxins viscerais RP e ME. Contrariando a literatura, os resultados da glicemia de jejum e do teste de tolerância oral à glicose dos grupos não apresentaram diferença significativa entre si. Houve um aumento na atividade máxima das enzimas ATP-citrato-liase (ACL) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no coxim SC do grupo CORT, além de uma redução na expressão da enzima proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e de um aumento da enzima 11 β HSD1. Conjuntamente, esses dados indicam que o tratamento realizado levou ao aumento da SC abdominal possivelmente devido à maior atividade de enzimas lipogênicas, a qual pode ter sido mediada por um aumento da concentração local de GC provocado pela expressão aumentada de 11 β HSD1.

Palavras chave: Glicocorticoides. Lipogênese. Tecido adiposo.

ABSTRACT

NUNES, P. P. **Chronic, continuous and invariable body exposure to cortisol increases abdominal subcutaneous adipose tissue.** 2015. 76 p. Master thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Chronic use of glucocorticoids (GC) results in expansion of central adipose tissues, although the mechanisms involved in this process are not fully understood. The studies found in the literature use very high doses of these hormones. Thus, this study aimed to investigate the effects of continuous treatment with GC on lipogenesis of different fat pads using doses closer to physiological concentrations. Twenty three male Wistar rats, 8 weeks old, were used. They were kept in individual cages and fed with standard balanced food and water 'ad libitum'. After completing 10 weeks of age the animals were randomly divided into 2 groups: control (CON, n = 13) and cortisol (CORT, n = 10) and then underwent surgery for subcutaneous implantation of osmotic mini-pumps (Alzet®) whereby CORT group received cortisol (hydrocortisone hemisuccinate) diluted in distilled water (0.6 mg / kg / d) and CON group received saline only, lasting for 6 weeks. During treatment, body weight, food and water consumption of the animals were observed once a week. At the end of the experimental period, they were kept fasting for 12 h and euthanized at 7 h (early dark environmental period). The trunk blood, adrenal glands, and inguinal subcutaneous (SC), retroperitoneal (RP) and mesenteric (ME) fat pads were excised and stored for later analysis. Adipocytes were isolated for morphometric analysis and maximum enzymatic activity and protein expression of some lipogenic enzymes and 11 β HSD1 were measured. The results showed that the GC continuous use even in low dose was able to induce increased abdominal SC fat, although the hypothalamic-pituitary-adrenal axis has not been altered. However, there was no difference between groups for food and water intake, final body mass, weight gain (final mass less initial mass) and visceral RP and ME fat pads mass. Contrary to the literature, the results of fasting blood glucose and oral glucose tolerance test showed no significant difference between groups. There was an increase in maximal activity of ATP-citrate lyase (ACL) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzymes on SC fat pad of CORT group, besides a reduction in the expression of AMP dependent protein kinase enzyme (AMPK) and an increase of 11 β HSD1 enzyme. Together, these data indicate that the treatment performed led to increased abdominal SC possibly due to increased activity of lipogenic enzymes, which may have been mediated by increased local concentration of GC caused by increased expression of 11 β HSD1.

Keywords: Glucocorticoids. Lipogenesis. Adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução da massa corpórea.	41
Figura 2 – Ganho de massa corporal.	42
Figura 3 – Consumo semanal de ração e água.	43
Figura 4 – Massa dos coxins adiposos.	44
Figura 5 – Massa das adrenais.	45
Figura 6 – Teste de tolerância oral à glicose.	45
Figura 7 – Glicemia de jejum.	46
Figura 8 – Lipídeos séricos.	47
Figura 9 – Corticosterona.	48
Figura 10 – Celularidade.	49
Figura 11 – Volume celular.	50
Figura 12 – Atividade enzimática.	51
Figura 13 – Expressão de proteínas.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores proteicos e não-proteicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco.....	17
Tabela 2 – Anticorpos utilizados no teste de Western Blotting	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP1	do inglês, <i>activator protein 1</i>
11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase-1
11 β HSD2	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase-2
ACBP	do inglês, <i>Acyl-CoA-binding protein</i>
ACC	acil-CoA carboxilase
ACL	ATP-citrato liase
ACS	ail-CoA sintase
ACTH	do inglês, <i>adrenocorticotropic hormone</i>
AG	ácido graxo
ATP	adenosina trifosfato
CBG	do inglês, <i>corticosteroid-binding globulin</i>
CD36	do inglês, <i>cluster of differentiation 36</i>
CETP	do inglês, <i>cholesteryl ester transfer protein</i>
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CON	controle
CORT	cortisol
CRH	do inglês, <i>corticotropin releasing hormone</i>
DGAT	diacilglicerol-fostato aciltransferase
DNL	do inglês, <i>de novo lipogenesis</i>
EPM	erro padrão da média
FABP	do inglês, <i>fatty acid binding protein</i>
FAS	do inglês, <i>fatty acid sintase</i>
FATP	do inglês, <i>fatty acid transport protein</i>
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GC	glicocorticoide (s)
GH	do inglês, <i>growth hormone</i>
GPAT	glicerol-fosfato aciltransferase
GR	receptor de glicocorticoide
GREs	do inglês, <i>glucocorticoids responsive elements</i>
HDL	do inglês, <i>high density lipoprotein</i>
HPA	do inglês, <i>hypothalamic–pituitary–adrenal axis</i>
HSL	do inglês, <i>hormone-sensitive lipase</i>
IA	intra-abdominal
IL-1	interleucina-1
IL-2	interleucina-2
IMC	índice de massa corporal
I- κ B	do inglês, <i>inhibitor of NF-κB</i>
LDL	do inglês, <i>low density lipoprotein</i>
LPL	do inglês, <i>lipoprotein lipase</i>
ME	mesentérico (a)
MGAT	monoacilglicerol-fosfato aciltransferase
MR	do inglês, <i>mineralocorticoids receptor</i>

mRNA	do inglês, <i>messenger RNA</i>
NADPH	do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NFκB	do inglês, <i>nuclear factor kappaB</i>
oGTT	do inglês, <i>oral glucose tolerance test</i>
OM	omental
PAP	fosfatase de ácido fosfatídico
PKA	do inglês, <i>protein kinase A</i>
POMC	pró-ópiomelanocortina
RP	retroperitoneal
SC	subcutâneo (a)
TAB	tecido adiposo branco
TAG	triacilglicerol
TNF-α	do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
VC	visceral
VLDL	do inglês, <i>very low density lipoproteins</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Tecido adiposo branco	16
1.2 Glicocorticoides	23
1.2.1 <i>Mecanismos responsáveis pelos efeitos rápidos dos glicocorticoides</i>	26
1.2.2 <i>Glicocorticoides interagem com as membranas celulares</i>	27
1.2.3 <i>Efeitos não-genômicos mediados pelo GR</i>	27
1.2.4 <i>Interações específicas com o receptor de glicocorticoides acoplado à membrana</i>	27
1.3 Produção local de glicocorticoides	28
1.4 Glicocorticoides e Tecido Adiposo Branco	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVO	33
3.1 Estratégias experimentais	33
4 DESENHO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS	34
4.1 Animais	34
4.2 Experimentos <i>ex vivo</i>	35
4.2.1 <i>Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica</i>	35
4.2.2 <i>Cálculo indireto da celularidade</i>	36
4.2.3 <i>Determinações bioquímicas e hormonais</i>	36
4.3 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT)	37
4.4 Análises enzimáticas	37
4.4.1 <i>Preparo das amostras para atividade de enzimas lipogênicas</i>	37
4.4.2 <i>Atividade máxima da enzima ácido graxo sintase (FAS)</i>	38
4.4.3 <i>Atividade máxima da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)</i>	38
4.4.4 <i>Atividade máxima da enzima ATP-citrato liase (ACL)</i>	38
4.4.5 <i>Atividade máxima da enzima málica (EM)</i>	39
4.5 <i>Análise da expressão de proteínas</i>	39
4.5.1 <i>Western Blotting</i>	39
4.6 <i>Tratamento estatístico dos dados</i>	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Massa corpórea	41
5.2 Consumo semanal de ração e água	42
5.3 Massa dos coxins adiposos	43
5.4 Massa das glândulas adrenais	44

5.5 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT)	45
5.6 Glicemia de jejum	46
5.7 Lipídeos séricos	46
5.8 Corticosterona	47
5.9 Celularidade	48
5.10 Volume celular	49
5.11 Atividade enzimática de enzimas envolvidas na lipogênese	50
5.12 Expressão de proteínas	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido adiposo branco

O Tecido adiposo branco (TAB) é um tipo de tecido conjuntivo constituído predominantemente por adipócitos – células que possuem capacidade de armazenar lipídeos em seu interior sob a forma de triacilgliceróis (TAG), sendo o único tipo celular capaz de realizar esse fenômeno sem prejudicar sua integridade funcional (FONSECA-ALANIZ, 2006). No adipócito maduro, os TAG ficam dentro de uma grande gota lipídica que ocupa a maior parte do citoplasma da célula, fazendo com que o núcleo e o citosol formem uma fina camada rebatida à periferia celular. Contudo, é importante mencionar que em sua formação o adipócito passa por um processo de desenvolvimento em que a célula jovem, diferentemente da célula madura, apresenta múltiplas gotículas de lipídeos em seu citoplasma. Com o amadurecimento, essas gotículas vão se fundindo para formar a gota única. Especula-se, porém, que algumas gotículas pequenas são mantidas mesmo no adipócito maduro.

Além dos adipócitos, o TAB apresenta ainda macrófagos, leucócitos, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, fibroblastos e células-tronco indiferenciadas (entre elas, os pré-adipócitos que darão origem aos adipócitos jovens) (AHIMA; FLIER, 2000). Os adipócitos brancos maduros são muitas vezes maiores que as demais células do tecido, tendo um tamanho médio de 90-100 μm e podendo alterar acentuadamente seu tamanho conforme a quantidade de TAG acumulado (FONSECA-ALANIZ, 2006).

O TAB é atualmente reconhecido como um órgão endócrino devido à sua capacidade de secretar proteínas que desempenham efeitos biológicos, denominadas adipocinas (AHIMA, 2006; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2009; LYON; LAW; HSUEH, 2003). Inúmeros compostos ativos produzidos e secretados no tecido adiposo já foram identificados e a lista continua a crescer. Alguns deles, assim como seus efeitos biológicos, estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Fatores proteicos e não-proteicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco

SUBSTÂNCIA	PRINCIPAIS EFEITOS BIOLÓGICOS
Leptina	Sinaliza o SNC sobre os estoques corporais de energia
Adponectina	Aumenta a sensibilidade à insulina, é antiinflamatório e atenua a progressão da aterosclerose
Resistina	Aumenta a resistência à insulina
TNF- α	Lipolítico, aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina
Interleucina-6	Pró-inflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina
Adipsina	Ativa a via alternativa de complemento
ASP	Estimula a síntese de triacilgliceróis no TAB
Angiotensinogênio	Precursor da angiotensina II, envolvido na regulação da pressão arterial
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise
Fator tecidual	Iniciador da cascata de coagulação
VEGF	Estimula a proliferação vascular (angiogênese) no TAB
Visfatina	Insulinomimético produzido predominantemente pela gordura visceral
Monobutirina*	Vasodilatador e indutor de neoformação vascular
TGF- β	Regula uma série de processos no TAB, entre os quais proliferação de pré-adipócitos, diferenciação, desenvolvimento e apoptose de adipócitos
IGF-1	Estimula proliferação e diferenciação de adipócitos
HGF	Estimula diferenciação e desenvolvimento de adipócitos
MIF	Imunorregulador com atuação parácrina no TAB
LPL†	Enzima estimuladora da hidrólise de TAG de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL)
CETP†	Transfere ésteres de colesterol entre lipoproteínas
Apo-E†	Componente proteico das lipoproteínas, especialmente VLDL
Prostaglandinas*	Reguladores de diversos processos celulares, atuam na inflamação, coagulação sanguínea, ovulação e secreção ácida gástrica
Estrógenos*	Produzido pela ação da aromatase, sendo a principal fonte estrogênica em homens e em mulheres após a menopausa
Glicocorticóides*	Gerado pela ação da 11-hidroxiesteróide desidrogenase, tipo I, que transforma cortisona em cortisol no TAB
Apelina	Ações biológicas ainda não muito claras, relacionadas ao controle dos estoques energéticos corporais

ASP = proteína estimulante de acilação; **CETP** = proteína de transferência de ésteres de colesterol; **HGF** = fator de crescimento de hepatócito; **IGF1** = fator de crescimento insulina-símile-1; **LPL** = lipase lipoprotéica; **MIF** = fator de inibição de migração de macrófagos; **PAI-1** = inibidor de ativação do plasminogênio-1; **SNC** = sistema nervoso central; **TAB** = tecido adiposo branco; **TAG** = triacilgliceróis; **TGF- β** = fator transformador de crescimento- β ; **TNF- α** = fator de necrose tumoral- α ; **VEGF** = fator de crescimento endotelial vascular; **VLDL** = lipoproteína de densidade muito baixa. * Substâncias não-proteicas. † Proteínas sem ação hormonal.

Adaptado de Fonseca-Alaniz, 2007.

Dentre todas as adipocinas identificadas no TAB, grande enfoque tem sido dado, em especial, aos efeitos da leptina e da adiponectina. A leptina é expressa, além do TAB, em diversos outros tecidos, tendo sido identificada no epitélio mamário, na mucosa do fundo gástrico, nos músculos esqueléticos, na placenta e na adeno-hipófise. No entanto, sua produção parece estar diretamente relacionada à massa de tecido adiposo, sendo este o local de maior produção (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Esta adipocina funciona como um “sensor” de energia no organismo tendo um importante papel na regulação do balanço energético, pois estimula a expressão de neuropeptídeos que induzem a inibição da ingestão alimentar (pró-ópio-melanocortina e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina) em neurônios parvo-celulares do núcleo arqueado hipotalâmico; também estimula neurônios do núcleo paraventricular aumentando o tônus simpático para aumentar o gasto energético total e, por fim, em outra população de neurônios do núcleo arqueado, ela inibe a expressão do neuropeptídeo Y e peptídeo *agouti*, que aumentam a ingestão alimentar e diminuem o gasto energético (SCHWARTZ et al., 2000). Além da atuação no controle do gasto energético, a leptina exerce inúmeras outras funções como modulação da reprodução, resposta imune, angiogênese, osteogênese, além do controle da pressão arterial, dentre outros (FRUHBEEK et al., 2001).

A adiponectina é uma proteína expressa exclusivamente em adipócitos diferenciados, sendo a citocina mais abundante produzida no TAB. Ao contrário da maioria das demais adipocinas, ela age como fator protetor para o organismo devido aos efeitos que lhe são atribuídos, dentre os quais destacam-se o aumento da sensibilidade à insulina e a proteção contra doenças cardiovasculares. Esses efeitos resultam da sua característica anti-inflamatória, pois a adiponectina diminui a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e NF κ B), além de diminuir a quimiotaxia a macrófagos e a sinalização inflamatória no endotélio (LYON; LAW; HSUEH, 2003). Embora produzida pelo TAB, há uma correlação negativa entre o grau de obesidade e níveis circulantes de adiponectina, assim como a redução de peso leva ao aumento de sua concentração sérica, demonstrando que o tecido adiposo disfuncional perde a capacidade de sintetizá-la satisfatoriamente. Nessa condição, os baixos níveis dessa proteína é um dos fatores que predis põem a resistência à insulina e hiperinsulinemia (revisado por FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Apesar do foco atual no seu papel endócrino, o TAB é classicamente conhecido por suas funções de proteção mecânica, deslizamento de vísceras e feixes musculares, isolamento térmico, além do seu importante papel regulatório no metabolismo energético. Ele possui todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para o estoque e liberação de substratos de alta energia, dependendo do contexto fisiológico.

Em momentos de aumento da demanda energética, como no jejum ou exercício físico, os TAG são catabolizados a ácidos graxos livres e glicerol, que são liberados na circulação para utilização do organismo como fonte de energia. A esse processo dá-se o nome de lipólise. A lipólise é estimulada por hormônios catabólicos e pela ação direta do sistema nervoso simpático sobre os receptores β -adrenérgicos na membrana do adipócito. O estímulo β -adrenérgico resulta no aumento do AMP-cíclico intracelular com consequente ativação da proteína quinase A (PKA). Esta, por sua vez, ativa a enzima lipase hormônio-sensível (HSL), mediante fosforilação em serina, a qual irá clivar o TAG para liberação de seus substratos. No entanto, no adipócito a gota lipídica fica envolvida por proteínas denominadas perilipinas e, para que os lipídeos sejam acessados pela HSL, as perilipinas precisam ser deslocadas da superfície da gota, dando espaço para a enzima acessar os TAG. Para que esse deslocamento ocorra, as perilipinas precisam ser fosforiladas e esse efeito também é mediado pela PKA, de modo semelhante à HSL.

Inversamente, quando a oferta de alimentos é abundante e o nível de esforço físico é baixo, o excesso de energia é estocado no tecido adiposo sob a forma de TAG dentro da gota lipídica. Esta ação promove uma expansão da gota, consequentemente aumentando o volume da célula, o que se traduz em uma das principais atividades metabólicas do TAB, que é a lipogênese.

Classicamente, a lipogênese é descrita como o processo de síntese de lipídeos e abrange a incorporação, o armazenamento e/ou a biossíntese dos mesmos. Cada um desses processos requer mecanismos moleculares diferentes, conforme brevemente descrito a seguir.

A **incorporação** de ácidos graxos (AG) em TAG no tecido adiposo depende, em parte, da captação dessas moléculas que estão dentro dos quilomícrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Nesse caso, a enzima lipase de

lipoproteínas (LPL), presente no lúmen endotelial de capilares que circundam os adipócitos, hidrolisa os triglicerídeos contidos nesses carreadores, liberando os ácidos graxos para serem captados pelo adipócito. No entanto, devido à presença de carboxila na molécula do AG, e por esta ser uma estrutura polar, a difusão do mesmo pelas membranas dos adipócitos não é um processo simples, pois o composto teria que atravessar a região apolar da bicamada lipídica da membrana celular. Portanto, a captação se dá em maior proporção por difusão facilitada mediada por transportadores (FONSECA-ALANIZ et. al., 2006). Dentre eles estão a CD36, a FATP (proteína transportadora de ácido graxo livre) e a FABP (proteína ligadora de AG). A CD36 se liga ao AG e o apresenta à FATP que, como a CD36 é uma proteína integral da membrana e atua como um facilitador da difusão. Já no citosol, que é um meio aquoso, o AG se liga à FABP e esta o transporta para ser acilado com uma coenzima A. A acilação é mediada por outra proteína, a acilCoA sintase (ACS) e, então, a molécula de acilCoA recém gerada é levada pela ACBP (proteína ligadora de acilCoA) para os locais de esterificação com glicerol-3-fosfato para formar o TAG.

Uma vez dentro do adipócito, os AG precisarão ser esterificados antes de serem **armazenados** sob a forma de TAG (ZECHNER et al., 2000). Diversas enzimas estão envolvidas no processo de esterificação, como a ACS citada acima, a glicerol-fosfato aciltransferase (GPAT), a monoacilglicerol-fosfato aciltransferase (MGAT), a fosfatase de ácido fosfatídico (PAP) e a diacilglicerol-fosfato aciltransferase (DGAT). Para estudar os mecanismos envolvidos no aumento de depósitos de gordura, seria interessante analisar a atividade e/ou expressão de enzimas da esterificação.

Ainda, o TAB é capaz de **sintetizar** componentes da molécula de TAG a partir da oferta de acetil-CoA proveniente da metabolização de substratos não lipídicos, como glicose (principalmente) e aminoácidos. A esta via lipogênica dá-se o nome de lipogênese *de novo* (DNL), a qual envolve a ação das enzimas: ATP-citrato liase (ACL), ácido graxo sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e enzima málica (ME) (HELLERSTEIN, 1999), sendo as duas últimas responsáveis pelo fornecimento de NADPH, cofator necessário ao funcionamento da FAS e formação dos ácidos graxos. A DNL é ativada, principalmente, quando há grande oferta de glicose em momentos de baixo gasto de energia. Assim, a hiperativação da via glicolítica na mitocôndria do adipócito, concomitante com a necessidade diminuída da formação de ATP, resulta no aumento

da concentração de acetil-CoA dentro da organela. O acetil-CoA não pode transpor a membrana mitocondrial, portanto ele é complexado com oxaloacetato para formar citrato, pela ação da enzima citrato sintase. O citrato, por sua vez, pode atravessar a membrana mitocondrial com a ajuda de um transportador específico. Assim, parte do citrato passa para o citoplasma e sofre a ação da ACL, gerando novamente acetil-CoA. Pela ação da ACC, o acetil-CoA recebe mais uma molécula de carbono formando malonil-CoA. Este último produto entra em uma complexa via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima FAS, que culmina na formação das moléculas de acilCoA. Estas serão esterificadas ao glicerol-3-fosfato disponível, completando a biossíntese de TAG.

Tradicionalmente, porém, a DNL tem sido considerada como uma via que contribui minimamente para a formação dos TAG do tecido adiposo, sendo a maioria dos ácidos graxos da molécula provenientes da gordura ingerida na dieta. Até cerca de dez anos atrás, faltavam estudos *in vivo* examinando a DNL no TAB devido a questões metodológicas (STRAWFORD et al., 2004). No entanto, um estudo utilizando administração prolongada (5-9 semanas) de água deuterada sugeriu que aproximadamente 20% dos TAG recém-depositados no TAB eram derivados da DNL em indivíduos não obesos (STRAWFORD et al., 2004). Sendo assim, são necessários mais estudos analisando a relação dessa via com o acúmulo de TAG no tecido adiposo, o que este trabalho se propôs a fazer.

Normalmente, há um estado de equilíbrio dinâmico (*steady state*) entre a lipogênese e a lipólise no TAB, porém pequenos desvios nesse equilíbrio podem gerar tanto um acúmulo excessivo de lipídeos – que resulta na expansão do tecido – quanto uma depleção exacerbada do mesmo em estados predominantemente catabólicos. A depender do contexto fisiológico, dentre os importantes reguladores desse fluxo de energia dentro dos adipócitos estão as citocinas pró e anti-inflamatórias, a insulina, os esteroides sexuais, a progesterona, as catecolaminas, o GH, os glicocorticoides, dentre outros (PECKETT et al., 2011). A ação dos glicocorticoides sobre o tecido adiposo (foco deste estudo) será discutida mais adiante.

No que diz respeito à localização do TAB, este distribui-se amplamente ao longo de diferentes áreas do organismo, sendo os depósitos adiposos subdivididos entre subcutâneo (SC) e intraabdominal (IA). Entende-se por tecido SC os depósitos encontrados imediatamente sob a pele e por IA aqueles alojados na cavidade

abdominal. Uma compartimentalização mais minuciosa do TAB nos permite separar, ainda, o depósito IA entre gordura visceral (VC) (que envolve ou mesmo se infiltra em órgãos e estruturas internas) e retroperitoneal (RP). A gordura VC é representada pelos depósitos mesentérico (MS) – o qual envolve os intestinos – e pelo omental (OM) que se localiza próximo ao omento maior e se projeta a partir da curvatura maior do estômago até a parte proximal do duodeno. Já a gordura RP localiza-se dorsalmente no tronco e se estende ao longo da fronteira dorsal dos intestinos e da superfície ventral dos rins (WAJCHENBERG, 2000).

No entanto, quando se fala de acúmulo de gordura central ou abdominal a gordura SC dessa região também deve ser considerada (Märin et al., 1992), pois estudos demonstram que esse depósito adiposo se difere, metabolicamente, daquele localizado em regiões periféricas e, assim como o VC, também pode estar aumentado na obesidade e contribuir para a resistência à insulina (ABATE et al., 1995; GOODPASTER et al., 1997; TANKO et al., 2004; WAJCHENBERG, 2000).

Vague, em 1956, já evidenciava a existência de diferentes padrões de distribuição da adiposidade corporal. Desde então sabemos que os riscos de comorbidades cardiovasculares associadas à obesidade estão mais relacionados a essa distribuição do que à quantidade de gordura total do organismo, sendo que o acúmulo de gordura na região superior do corpo (VC ou central) é mais deletéria do que o acúmulo na região gluteofemoral (SC) (HUNTER et al., 1994; VAGUE, 1956; WILLIAMS et al., 1996). Isso se deve às inúmeras diferenças entre ambos tipos de tecido, como: o tipo de adipócitos, a função endócrina, a atividade lipolítica, a resposta à insulina e a outros hormônios, a densidade de determinados receptores hormonais, dentre outras.

O tecido adiposo VC, por exemplo, é mais irrigado e mais innervado (por isso é mais metabolicamente ativo), apresenta adipócitos maiores – que são mais resistentes à insulina, mais lipolíticos e têm maior capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias – além de apresentar maior densidade dos receptores β -adrenérgicos, de glicocorticoides e de androgênios. Por outro lado, a gordura SC apresenta adipócitos menores – que possuem maior capacidade de diferenciação, são mais sensíveis à insulina e ávidos por captar AG e glicerol – possui maior densidade de receptores para estrogênio e maior capacidade de secretar leptina e adiponectina (revisado por IBRAHIM, 2010). Dentre outros aspectos, estas diferenças contribuem

para o conceito de que o tecido SC tem um efeito mais protetor para o organismo, enquanto o VC (quando disfuncional) contribui mais efetivamente para o desenvolvimento da síndrome metabólica. É necessário ter em mente essas diferenças entre os distintos depósitos adiposos quando se tem a intenção de estudar os efeitos de determinados tratamentos sobre o metabolismo do TAB, uma vez que cada um poderá responder de forma diferente a tais intervenções e, no final, irão configurar um quadro que pode erroneamente ser confundido com uma resposta única do tecido adiposo como um todo.

1.2 Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GC) são hormônios esteroides secretados pelo córtex das glândulas adrenais, cuja secreção basal ocorre em ritmo circadiano e está sob influência de um sistema de controle neuroendócrino por *feedback* – o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA). As duas glândulas adrenais humanas, cada uma pesando apenas quatro gramas aproximadamente, estão localizadas acima do polo superior de cada rim, no espaço retroperitoneal. Além dos GC, elas produzem aldosterona, androgênios, adrenalina e noradrenalina. Cada glândula adrenal é composta por uma medula interna e um córtex externo. O córtex produz dois hormônios esteroides principais – cortisol e aldosterona – além de alguns esteroides androgênicos, enquanto a adrenalina e noradrenalina são produzidas na medula. O córtex adrenal pode ser dividido ainda em três camadas celulares distintas: a zona glomerulosa, sendo esta a mais externa e responsável pela síntese de aldosterona; a zona fasciculada, intermediária, onde o cortisol é preferencialmente produzido; e a reticular, que está próxima à junção medular e é responsável pela produção dos esteroides androgênicos, além de uma menor proporção de cortisol que, nessa camada, parece ser convertido aos androgênios (BARRETT, 2012).

A ativação do eixo HPA se inicia com a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) por neurônios hipotalâmicos. O CRH se liga ao seu respectivo receptor na hipófise e estimula a transcrição do gene da pró-ópiomelanocortina (POMC) resultando na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, estimula a síntese e secreção dos GC nas adrenais. Por fim, os próprios GC

controlam a regulação da atividade basal do eixo HPA, pois eles se ligam a receptores no hipotálamo e na hipófise levando à redução da liberação de CRH e ACTH. Deste modo, a alça de *feedback* é completada (GAGNER; DROUIN 1985, 1987; MALKOSKI et al., 1999; RABER, 1998).

Em humanos, o glicocorticoide mais abundante é o cortisol, enquanto nos roedores é a corticosterona. Há um pico de liberação de cortisol em humanos que ocorre no início da manhã, com uma meia-vida de 1 a 2 horas. Em roedores esse pico ocorre no início da noite (momento que eles acordam por serem animais noturnos), com meia-vida de 15 a 30 minutos (MITSUGI; KIMURA, 1985). Ambos hormônios circulam no plasma de forma livre, ligados à albumina ou, principalmente, a uma proteína transportadora – a globulina ligadora de corticosteroide (CBG) ou transcortina. Cerca de 90% do hormônio circula ligado à CBG e aproximadamente 7% ligado à albumina, assim, apenas uma pequena quantidade do total plasmático circula de forma livre, sendo esta a forma que consegue transpor a membrana celular (sem necessitar de um transportador) e alcançar seu alvo a fim de realizar os seus efeitos.

Em níveis fisiológicos, os GC são tidos como hormônios catabólicos por atuarem na obtenção de substratos (glicose, glicerol, ácidos graxos livres e aminoácidos) para manutenção da glicemia e mobilização de energia em condições estressantes, visando suprir o aumento da demanda energética nessas situações (PECKETT et al., 2011). Sendo assim, como o próprio nome sugere, a função primordial dos GC é disponibilizar glicose para o sangue. Sua habilidade em aumentar a concentração sérica de glicose deriva principalmente do seu estímulo ao aumento da mobilização de aminoácidos das proteínas de vários tecidos, além de aumentar a habilidade do fígado em converter esses aminoácidos em glicose pela ativação da gliconeogênese (BARRETT, 2012).

Além da ação sobre a glicemia, os GC apresentam ainda numerosas funções essenciais para a sobrevivência, incluindo potente atividade imunossupressora e anti-inflamatória, efeitos no metabolismo de proteínas e lipídeos, efeitos no sistema nervoso central que resultam em alterações comportamentais, importantes ações sobre o metabolismo ósseo e do cálcio, além de exercer influência sobre a pressão arterial e o balanço hídrico. Ainda, em condições basais, eles apresentam um efeito permissivo sobre o metabolismo de outros hormônios (como glucagon, catecolaminas e, em algumas circunstâncias, o GH), preparando as células para a ação dos mesmos

(MACFARLANE et al., 2009).

Os efeitos dos GC podem ser classificados entre efeitos genômicos e não-genômicos (ADCOCK; LANE, 2003; ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002; BUTTGEREIT; SCHEFFOLD, 2002; BUTTGEREIT et al., 2004, 2005; PRATT, 1998; WIKSTROM, 2003). Os efeitos genômicos são mediados, principalmente, pelo receptor citossólico de glicocorticoides alfa (GR), enquanto os não-genômicos são subdivididos entre três mecanismos de ação: efeitos não-genômicos mediados pelo próprio GR; efeitos não-genômicos inespecíficos (por exemplo interações físico-químicas com a membrana plasmática quando há altas concentrações de GC); e efeitos que acredita-se serem mediados por receptores de GC aderidos à membrana (BUTTGEREIT; SCHEFFOLD, 2002; SPIES et al., 2006), os quais ainda não estão totalmente esclarecidos.

O GR é um membro da família de receptores de hormônios esteroides localizados no citoplasma das células, sob a forma de um complexo multiprotéico contendo várias proteínas acopladas, como as chaperonas *heat-shock proteins* (Hsp) 90 e 70, dentre outras (ALMAWI, MELEMEDJIAN, 2002; PRATT, 1998; WIKSTROM, 2003). Essas proteínas estão ligadas aos GR com o objetivo de mantê-los inativos. Quando o hormônio se liga ao receptor, forma-se o complexo GC/GR ativo e então as chaperonas se dissociam deixando o receptor livre. Nesta forma, o GC/GR é translocado para o núcleo (o que leva cerca de vinte minutos), se dimeriza e se liga a sítios específicos de ligação no DNA – os elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs) (ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002).

A ligação do complexo hormônio/receptor a elementos responsivos positivos do DNA resulta na indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias e de proteínas regulatórias que são importantes para o metabolismo (como as enzimas envolvidas na gliconeogênese) fazendo com que os GC exerçam diferentes efeitos em nível celular, tecidual, de órgãos e do organismo. Este processo mediado por GRE's positivos é denominado "transativação", o qual acredita-se ser responsável por inúmeros efeitos colaterais dos glicocorticoides (STAHN et al., 2007).

Por outro lado, a transcrição de genes pode ser inibida pela ligação direta do complexo GC/GR a GRE's negativos, como ocorre na supressão de genes inflamatórios como a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-2 (IL-2) (BEATO, 1989; FALKENSTEIN et al., 2000), ou pela interação desse complexo com fatores de

transcrição envolvidos na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios, como o fator nuclear-kappaB (NF-κB) e a proteína ativadora-1 (AP1) (REILY et al., 2006). A esse processo dá-se o nome de “transrepressão” que caracteriza o efeito anti-inflamatório e imunossupressor dos GC. Dessa forma, os GC inibem a translocação nuclear e a função de diversos fatores de transcrição pró-inflamatórios. Os mecanismos propostos para tal atuação são: **1)** impedimento da ligação do fator de transcrição a sequências específicas do DNA a partir da interação direta proteína-proteína; **2)** indução da síntese de I-κB (um inibidor do NF-κB) causada pela interação entre seu GRE específico e o complexo GC/GR; **3)** competição por coativadores nucleares entre GC/GR e os fatores de transcrição.

Mais de trinta minutos são necessários para que ocorra a sequência de eventos: ativação do GR, transporte do complexo receptor para o núcleo, ligação aos GRE's das regiões promotoras de genes alvo e iniciação dos processos transcricionais e traducionais que levam à síntese de novas proteínas. Geralmente leva-se horas ou dias até que se perceba alguma alteração em nível celular, tecidual ou sistêmico (STAHN et al., 2007). No entanto, alguns GC com efeitos anti-inflamatórios, imunossupressivos e antialérgicos exercem seus efeitos muito rapidamente para serem explicados pelo mecanismo de ação genômico clássico (BUTTGEREIT; SCHEFFOLD, 2002; CATO et al., 2002; CROXTALL et al., 2000; FALKENSTEIN et al., 2000; HAFEZI-MOGHADAM et al., 2002). Nos últimos anos, diversos estudos foram conduzidos com o intuito de desvendar os mecanismos responsáveis pela rápida ação desses GRs e serão brevemente descritos a seguir.

1.2.1 Mecanismos responsáveis pelos efeitos rápidos dos glicocorticoides

Conforme citado anteriormente, três diferentes mecanismos não-genômicos têm sido propostos para explicar a rápida ação dos glicocorticoides:

- interações inespecíficas dos GC com membranas celulares;
- efeitos não-genômicos mediados pelo GR;
- interações específicas com receptores de glicocorticoides acoplado à membrana.

1.2.2 Glicocorticoides interagem com as membranas celulares

Os GC parecem apresentar efeitos rápidos sobre as membranas biológicas, especialmente a plasmática e a mitocondrial. Em altas concentrações, moléculas de GC se interpõem dentro das membranas plasmáticas e interferem nas suas propriedades físico-químicas, por exemplo alterando o ciclo de cálcio e sódio através da membrana plasmática de células imunes. Isso poderia contribuir para uma rápida imunossupressão e uma subsequente redução do processo inflamatório (BUTTGEREIT; SCHEFFOLD, 2002).

Ainda, ao se interpor nas membranas mitocondriais ocorre vazamento de prótons, resultando na diminuição da produção de ATP e consequentemente na alteração das atividades de células imunológicas que são dependentes de ATP, suprimindo mais uma vez as ações do sistema imune.

1.2.3 Efeitos não-genômicos mediados pelo GR

Conforme mencionado, após a ligação do hormônio ao GR, o receptor se dissocia do complexo multiproteico que o envolve. A liberação de moléculas de sinalização desse complexo parece ser responsável por efeitos rápidos dos GC (CROXTALL et al., 2000). Além disso, a liberação de ácido araquidônico (um mediador de reações inflamatórias) a partir de fosfolípidios associados à membrana celular é controlada por diversos mediadores e pode ser inibida por glicocorticoides por um mecanismo dependente de GR, porém independente de transcrição (CROXTALL et al., 2000). Esses dados indicam que o GR não é apenas um importante regulador de transcrição gênica, mas também está envolvido em efeitos rápidos não-genômicos, induzidos por GC (STAHN et al., 2007).

1.2.4 Interações específicas com o receptor de glicocorticoides acoplado à membrana

Presume-se que o receptor de glicocorticoides acoplado à membrana não é

apenas um GR inalterado que foi transportado à superfície celular, mas uma variante do mesmo produzido por um *splicing* diferencial ou por uma modificação pós-traducional (BARTHOLOME et al., 2004). No entanto, sua origem, função e mecanismo de ação ainda não estão claramente definidos, embora especula-se que parte das ações rápidas dos GC seja mediada por esses receptores de membrana, independente de ativação genômica.

1.3 Produção local de glicocorticoides

Além da produção adrenal, o cortisol (em humanos) e a corticosterona (em roedores) são convertidos à sua forma ativa pela enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase-1 (11 β -HSD1) a partir de seus precursores – cortisona e 11-desoxicorticosterona – respectivamente (SECKL; WALKER, 2001).

Esta enzima é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático, com uma orientação luminal do seu sítio ativo (MZIAUT et al., 1999; ODERMATT et al., 1999; OZOLS, 1995). Ela é encontrada no córtex adrenal e em vários outros tecidos: fígado, rim, tecido adiposo, pele, entre outros. A 11 β HSD apresenta duas isoformas: a 11 β HSD tipo 1, que converte cortisona (inativa) em cortisol ativo, e a 11 β HSD tipo 2, que catalisa o processo inverso (AGARWAL, 2003; ESPÍNOLA-ANTUNES; KATER, 2007). As duas estão presentes em quantidades diferentes nos vários tecidos. Por exemplo, a 11 β HSD2, dependente do cofator NAD⁺ é amplamente expressa em tecidos alvo dos mineralocorticoides como o rim, cólon e glândulas sudoríparas, onde inativa o cortisol para proteger a sua ligação ao receptor de mineralocorticoide e deixá-lo livre para a aldosterona, enquanto a 11 β HSD1 é bastante expressa no fígado e no tecido adiposo branco, em especial em depósitos viscerais (ESPÍNOLA-ANTUNES; KATER, 2007) e é dependente de NADPH (AGARWAL, 2003).

A capacidade das 11 β HSDs de interconverter as formas ativa e inativa dos GC representa um passo regulatório adicional e afinado, anterior à ação dos mesmos nos diversos tecidos. Sendo assim, a maior atividade da isoforma tipo 1 aumentaria a concentração intracelular de cortisol (resultando num “prolongamento” da meia-vida do hormônio), podendo amplificar suas ações no tecido local, enquanto a inativação

mediada pela enzima tipo 2 poderia reduzir as ações do mesmo. Extensas pesquisas têm sido conduzidas para investigar o papel da 11 β HSD1 em regenerar GC ativo e a sua ligação com doenças metabólicas. Sua relação com o tecido adiposo será discutida adiante.

1.4 Glicocorticoides e Tecido Adiposo Branco

Os GC promovem diversos efeitos sobre o tecido adiposo branco: atuam como reguladores do metabolismo, diferenciação, e função endócrina dos adipócitos (LEE et al., 2012), além de evitar uma resposta inflamatória exacerbada do tecido na obesidade (PATSOURIS et al., 2009). Eles são, ainda, necessários para a indução de genes lipogênicos, para a regulação da lipólise (PECKETT et al., 2011) e para a manutenção de genes adipogênicos em cultura de adipócitos (LEE et al., 2011).

Apesar do efeito dos GC na indução da lipólise estar bem documentado (BAXTER; FORSHAM, 1972; SLAVIN et al., 1994; VILLENA et al., 2004), sua ação resultante na degradação ou estocagem de gordura é complexa e parece depender do contexto fisiológico, além da concentração e duração do tratamento.

A influência dos GC no acúmulo de gordura foi claramente demonstrada por estudos prévios que revelaram uma prevenção da obesidade em ratos Zucker após adrenalectomia, sendo esta revertida após reposição com corticosterona (FREEDMAN et al., 1986). Em humanos, o excesso de cortisol em nível sistêmico resulta num aumento de duas a cinco vezes do tecido adiposo central, especialmente o visceral, em pacientes com Síndrome de Cushing (GEER et al., 2014; ROCKALL et al., 2003; WAJCHENBERG et al., 1995). Rosmond et al. (1998) observaram que indivíduos sob estresse crônico (com cortisol circulante aumentado) são mais propensos ao aumento da gordura visceral. Segundo os autores, uma possível explicação seria o fato de o cortisol e a insulina sinergicamente aumentarem a atividade da LPL, sendo as consequências mais observadas no tecido visceral devido à maior celularidade, inervação e fluxo sanguíneo deste tecido em relação ao tecido subcutâneo. Além disso, a densidade de GR também é maior no TAB visceral, favorecendo uma maior atuação dos GC nessa região (BJORNTORP, 1996).

Apesar dessa associação do excesso de GC com o aumento do TAB, alguns

trabalhos mostram níveis de cortisol sistêmico normais ou até reduzidos em indivíduos obesos, apesar de observarem uma hipersensibilidade e/ou hiperativação do eixo HPA (LJUNG et al., 1996; STRAIN et al., 1982). Essa contradição parece ocorrer devido a taxa aumentada do *clearance* metabólico do hormônio, conforme observado por análise de cortisol livre na urina (MÅRIN et al., 1992). Contudo, embora essas afirmações venham se repetindo na literatura, um estudo recente mostrou que a concentração sérica de cortisol pode variar com o grau de obesidade. Schorr et al. (2015) estudaram a relação entre diferentes medidas de cortisol, o índice de massa corporal (IMC) e adiposidade. Os resultados do grupo mostraram uma relação em forma de “U” entre a concentração de cortisol no sangue e o IMC, onde casos de baixo peso ou obesidade extremos estão associados com maior ativação do eixo HPA, com consequente elevação do cortisol sérico, enquanto os casos de obesidade classe I (moderada) apresentaram as menores concentrações do hormônio. Os autores ainda associaram a ativação do eixo com o excesso de adiposidade (considerando tanto a massa adiposa visceral quanto massa total). Esses dados evidenciam a complexidade dos efeitos dos GC no TAB e os autores levantam as questões: a hipercortisolemia (observada nos extremos de IMC) contribui para a adiposidade quando há excesso de consumo calórico, ou o estresse causado pelo excesso de tecido adiposo que leva à ativação do eixo? Ou, ainda, a relação entre hipercortisolemia e adiposidade é bidirecional? Ao avaliar essas questões, ainda há de se considerar que o TAB é rico em 11 β HSD1 e o aumento da concentração de cortisol dentro do adipócito (ocasionado por uma maior atividade dessa enzima) também está associado à obesidade (ENGELI et al., 2004; LEE et al., 2008; RASK et al., 2002; TANKO et al., 2004).

Hughes et al. (2010) verificaram que a taxa de rotatividade de GC no tecido adiposo é baixa e possivelmente não é afetada por flutuações agudas do cortisol circulante. Isso indica que a produção local desses hormônios parece ter maior importância para o contexto fisiológico. Ademais, camundongos *knockout* para 11 β HSD1 não desenvolvem obesidade, hiperglicemia e dislipidemia quando alimentados com dieta rica em gordura (KERSHAW et al., 2005; KOTELEVTSOV et al., 1997; MORTON et al., 2004), enquanto a super expressão da mesma enzima resulta em obesidade acompanhada de síndrome metabólica (MASUZAKI et al., 2001). Todas essas evidências juntas salientam sua influência no aumento do TAB.

Tanto a super expressão quanto a inativação da 11 β HSD1 afetam preferencialmente o TAB intra-abdominal de ratos, especialmente a gordura mesentérica (MASUZAKI et al., 2001; MORTON et al., 2004). De maneira geral, a maior densidade de GR neste depósito (Lee et al., 2013b) o torna mais responsivo aos GC do que o subcutâneo, o que supostamente explicaria o acúmulo preferencial de gordura nessa região do corpo quando ocorre excesso crônico de GC. Estudos demonstraram que a expressão de mRNA do GR é de duas a quatro vezes maior no tecido adiposo omental do que no subcutâneo (PEDERSEN et al., 1994; REBUFFE-SCRIVE et al., 1990; VEILLEUX et al., 2010). No entanto, Lee et al. (2013a) afirmam que somente a abundância do receptor talvez não explique totalmente as diferenças da ação dos GC observadas nesses depósitos. Segundo os autores, essas diferenças também dependem da biologia do receptor (como os níveis das isoformas transcricionais e traducionais do GR), dos níveis de expressão do receptor de mineralocorticoides (MR) e dos padrões de interação do próprio GR.

Neste contexto, este trabalho visou caracterizar um modelo de exposição crônica, contínua e invariável ao cortisol, em dose supra fisiológica, porém não farmacológica, para investigar as implicações desse padrão de exposição do organismo ao GC sobre o acúmulo de lipídeos nos depósitos adiposos centrais. Uma vez estabelecido o quadro, objetivou-se verificar possíveis alterações moleculares das enzimas LPL, 11 β HSD1, ACL, FAS, ME, G6PDH, GPAT e DGAT, além da análise morfométrica dos depósitos adiposos viscerais (RP e ME) e subcutâneo inguinal (SC), este último sendo considerado abdominal.

2 JUSTIFICATIVA

Os glicocorticoides são amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e alergias. Nessas condições, frequentemente se faz necessário o uso desses hormônios de maneira crônica, o que geralmente resulta no aumento de gordura nas regiões centrais do corpo, principalmente nos depósitos viscerais, ocasionando diversas complicações à saúde de indivíduos submetidos a tais tratamentos.

Apesar da literatura ser consistente quanto a ação aguda desses hormônios sobre o catabolismo lipídico, pouco se sabe acerca das razões da contraditória redistribuição de gordura que ocorre na vigência de um estímulo crônico dos mesmos. Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos que busquem investigar as possíveis causas dessas alterações observadas no tecido adiposo. Ainda, os estudos conduzidos até então se concentram na utilização de altas doses de glicocorticoides. Por esse motivo, não sabemos o que modestas perturbações do padrão de exposição do organismo a esses hormônios poderiam provocar no tecido adiposo, por exemplo, quando doses mais baixas dos mesmos são utilizadas de maneira constante, prolongada e invariável ao longo do tempo.

3 OBJETIVO

Analisar os efeitos da exposição crônica do tecido adiposo branco ao cortisol administrado de forma contínua e invariável, utilizando doses mais próximas das concentrações fisiológicas.

3.1 Estratégias experimentais

Avaliar:

- repercussão sobre o eixo HPA;
- interferências no padrão de ingestão alimentar e na massa corpórea;
- tolerância à glicose;
- alteração de massa de diferentes coxins adiposos;
- efeitos sobre a atividade de enzimas lipogênicas;
- reflexos sobre a expressão proteica de enzimas lipogênicas e da 11 β HSD1.

4 DESENHO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS

4.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 010/10). Foram utilizados 23 ratos Wistar machos com 10 semanas de vida fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação em caixas individuais (1 rato/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada (22 ± 2 °C), ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas (fase clara iniciada às 19 h – ciclo invertido) e exaustão de amônia controlada. Os animais receberam ração balanceada padrão Nuvital® (Nuvital SA, Colombo, PR, Brasil) e água '*ad libitum*'. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: controle (CON, n = 13) e cortisol (CORT, n = 10). O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Porém, após completarem 10 semanas de vida, os animais passaram por um procedimento cirúrgico em que foram inseridas, subcutaneamente entre as escápulas, minibombas osmóticas (Alzet®, Cupertino, CA, Estados Unidos) contendo salina 0,9%. Já os animais CORT receberam as minibombas contendo cortisol (hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium salt – Sigma Aldrich Co®, São Paulo, SP, Brasil) diluído em água destilada (0,6 mg/kg/dia ou 0,18 mg/dia) (adaptado de RAFACHO et al., 2008). Após 6 semanas, todos os animais foram eutanasiados.

A minibomba osmótica possui um volume total de 200 µl, sendo que no presente modelo experimental foi capaz de liberar uma dose de 7,5 µg de cortisol por hora ao longo de 6 semanas, de acordo com o fabricante. A minibomba foi usada com o intuito de quebrar a ritmicidade diária da liberação de corticosterona pelas adrenais dos animais e de manter constantes os níveis circulantes de glicocorticoides. Durante todo o período experimental, os animais de ambos os grupos foram pesados uma vez por semana para acompanhamento. O consumo alimentar e hídrico (animais alimentados, aferidos 3 horas após início da fase escuro ambiental) também foram acompanhados 1 vez por semana.

4.2 Experimentos *ex vivo*

Após as 6 semanas de tratamento, os grupos CON e CORT, foram mantidos em 12 h de jejum e foram eutanasiados às 7 h (início de escuro ambiental). Esse horário foi definido considerando o ritmo de liberação de corticosterona no animal.

Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Tiopentax®, São Paulo, SP, Brasil) (3%, 5 mg/100 g pc, ip) e então decapitados. Sangue do tronco foi coletado e, posteriormente, foi realizada a laparotomia mediana para retirada dos tecidos adiposos: subcutâneo (SC), retroperitoneal (RP) e mesentérico (ME). As glândulas adrenais foram retiradas, limpadas das gorduras que as envolvem, pesadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer – 80 °C.

Fragmentos das gorduras SC, RP e ME foram retirados para isolamento dos adipócitos e amostras foram armazenadas em freezer – 80 °C. Os adipócitos isolados foram, ainda, analisados em microscópio óptico, fotografados e submetidos a análises conforme descrito abaixo.

4.2.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfológica

Os adipócitos foram isolados através de digestão do tecido por collagenase (RODBELL, 1964), com algumas modificações: os coxins adiposos SC, RP e ME foram retirados, picados em finos fragmentos e incubados em 4 ml de tampão digestivo (DMEM/HEPES 20 mM/BSA 4%, collagenase I [Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA] - 1,5 mg/ml, pH 7,40) por cerca de 45 minutos a 37 °C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm).

Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavadas por três vezes com 25 ml de tampão EHB (sais de EARLE/HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) e mantido a 37 °C.

Para análise morfológica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 100x) acoplado à câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 – MOTIC®). Foi utilizado o programa Motic-Images Plus 2.0® para medição da área transversal celular, da qual se obtém o raio celular médio. Em cada análise foram medidas 50 células. A partir do diâmetro celular médio e, admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$(a) V = [(\pi/6) \times D^3]/1000, \quad (b) N = (\text{lipócrito} \times 10^7) / V$$

Onde: **D** é o diâmetro médio de 50 adipócitos (μm), **N** é o número de células e **V** é o volume celular médio (FINE, DI GIROLAMO, 1997). A divisão por 1000 na primeira equação visa expressar o volume em picolitros.

4.2.2 Cálculo indireto da celularidade

O cálculo indireto da celularidade dos coxins adiposos foi realizado mediante a divisão da massa total do coxim pela massa média dos adipócitos do mesmo. A massa do adipócito foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$d = m/v$$

em que **d** é a densidade média de um adipócito (0,91 g/mL), **m** a massa do adipócito (em pg [10^{-9} mg]) e **v** o volume médio do adipócito (em pL [10^{-9} mL]).

4.2.3 Determinações bioquímicas e hormonais

A concentração sérica de glicose foi realizada utilizando o kit Glicose HK Liquiform (Labtest, ref. 85-2/100, Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração de corticosterona foi determinada usando o kit ELISA comercial específico para rato (kit IBL International, referência RE52061), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Os dados de triglicérides foram obtidos utilizando-se o kit Triglicérides Liquiform (Labtest, ref. 87-2/100), e a determinação do colesterol total foi realizada utilizando-se o kit Colesterol Liquiform, Labtest, ref. 76-2/100, enquanto para o HDL-c

usamos o kit HDL LE, Labtest, ref. 98-80. As concentrações de LDL-c e VLDL-c foram calculadas através da equação de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972). O soro para estas determinações havia sido previamente acondicionado em freezer – 80 °C no dia do sacrifício dos animais.

4.3 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT)

Uma semana antes da eutanásia, os animais de ambos os grupos, em jejum prévio de 12 horas, foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (teste começando às 7 h, início da fase escuro ambiental no ciclo invertido). Antes da administração de glicose, foi coletado sangue da calda dos animais para a mensuração da glicemia no tempo 0. Em seguida, houve a administração de glicose (75 mg/100 g pc) por gavagem, e novas coletas sanguíneas foram realizadas nos tempos 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos. O sangue foi analisado em glicosímetro (One Touch Ultra®, Johnson & Johnson®, São Paulo, SP, Brasil).

4.4 Análises enzimáticas

4.4.1 Preparo das amostras para atividade de enzimas lipogênicas

As amostras de TAB SC, RP e ME (aproximadamente 0,3 g), foram suspensas em tampão de extração (na proporção de 1:3 peso/volume para a gordura SC, e 1:1 peso/volume para as gorduras RP e ME) contendo sacarose (250 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), leupeptina (50 µM) e aprotinina (5 µM), pH 7,4. O material, mantido em gelo, foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucerne, Suíça) e centrifugado a 20.000 g a 4 °C. Após a centrifugação, o infranadante livre de gordura (*fat cake free*) foi utilizado para a determinação da atividade enzimática máxima. Para todas as enzimas, a absorbância foi monitorada a 340 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 6,22. As proteínas foram quantificadas pelo kit de ensaio proteico BCA® (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em µmol/min/coxim (g de tecido).

4.4.2 Atividade máxima da enzima ácido graxo sintase (FAS)

A atividade da FAS foi determinada segundo Bazin e Ferré (2001), como medida da oxidação (consumo) total de NADPH. Para a reação enzimática 30 µl de amostra foram adicionados ao tampão de ensaio (volume de 260 µl por poço) que consiste de KH₂PO₄ (100 mM), acetilCoA (100 µM) e NADPH (200 µM), pH 6,5. A reação foi iniciada com a adição de 10 µl de malonil-CoA (600 µM) e KH₂PO₄ ao extrato enzimático, sendo acompanhada por 10 minutos de leitura à 37 °C.

4.4.3 Atividade máxima da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi determinada segundo Bergmeyer et al. (1974), como medida indireta da atividade enzimática da G6PDH, pela produção total de NADPH pela via das pentoses-fosfato. Para a reação enzimática, 15 µl de amostra foram adicionados a 270 µl de tampão de ensaio contendo Tris-HCL (8,6 mM), MgCL₂ 6H₂O (6,9 mM), NADP (0,4 mM) e Triton X-100 (0,05%, v/v), pH 7,6. A reação foi iniciada com a adição de 15 µl de glicose-6-fosfato (1,2 mM) ao extrato enzimático, com monitoramento da absorbância a 340 nm por 10 minutos a 25°C.

4.4.4 Atividade máxima da enzima ATP-citrato liase (ACL)

A atividade da enzima ACL foi determinada segundo Bazin e Ferré (2001). Para a determinação dessa enzima, 15 µl de amostra foram adicionados a 270 µl de tampão de ensaio contendo Tris-HCL (200 mM), MgCL₂ 6H₂O (20 mM), citrato de potássio (20 mM), DTT (1 mM), malato desidrogenase (1 U/mL), CoA (0,5 mM) e NADP (0,2 mM). A reação foi iniciada com a adição de 15 µl da solução de ATP (60 mM), Tris-HCL (200 mM) e MgCL₂ 6H₂O (20 mM) ao extrato enzimático e acompanhada por 10 minutos a 37 °C.

4.4.5 Atividade máxima da enzima málica (EM)

A atividade da EM foi determinada segundo método descrito por Bazin e Ferré (2001). Para medir a atividade dessa enzima, 15 µl de amostra foram adicionados a 270 µl de tampão de ensaio contendo Tris-HCL (200 mM), MgCL₂ 6H₂O (20 mM) e NADP (0,2 mM), pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de 15 µl da solução de malato (100 mM), Tris-HCL (200 mM) e MgCL₂ 6H₂O (20 mM), pH 7,4 ao extrato enzimático e acompanhada por 10 minutos a 37 °C.

4.5 Análise da expressão de proteínas

4.5.1 Western Blotting

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas em tampão gelado (Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,45) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml), em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucerne, Suíça).

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo proteico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad*) e foram tratados com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT e 50 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (denominado extrato total) (SDS-PAGE (10%). Em cada gel houve um marcador de peso molecular padrão com valores pré-estabelecidos. O SDS-PAGE foi submetido a 30 volts até que as amostras passassem pelo gel de empilhamento e depois a 120 volts por cerca de 2 a 3 horas. A seguir, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os anticorpos utilizados estão discriminados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados no teste de Western Blotting

Anticorpo Primário	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
Glicerol Fostato Acil Transferase	GPAM (L-16)	sc-161674
Diaciglicerol Acil Transferase	DGAT2 (H-70)	sc-66859
11 β -Hidroxiesteroide Desidrogenase 1	11 β -HSD1 (H-100)	sc-20175
Lipase de Lipoproteína	LPL (H-53)	sc-32885
Receptor de Colágeno tipo 1	CD36 (H-300)	sc-9154
Adenosina Monofosfato Proteína Quinase	AMPK α	#2532
α -tubulina	A11126	236-10501
Anticorpo Secundário		
Goat anti-mouse IgG (H + L)	---	115-035-003
Goat anti-rabbit IgG (H + L)	---	111-035-003

Fontes: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Jackson ImmunoResearch, Inc; Thermo Scientific.

4.6 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados dos protocolos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) empregando-se o programa Stat Grafic Centurion XVI®. Para as comparações entre os grupos, foi utilizado teste t-Student, com exceção da análise de atividade enzimática, para a qual foi utilizado Mann-Whitney. As variáveis Massa Corporal (g), Ingestão Alimentar (g) e Ingestão de Água (g) foram analisadas empregando-se ANOVA dois fatores: Grupo (Controle e Cortisol) e Semanas (Semana 2 até Semana 6) como fator de medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. A variável oGTT (mg/dL) foi analisada empregando-se ANOVA dois fatores: Grupo (Controle e Cortisol) e Tempo (0', 5', 10', 20', 30', 60' e 90'), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O grau de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Massa corpórea

A massa corpórea dos animais foi mensurada semanalmente durante todo o período experimental. Os resultados dessa análise demonstram que os animais de ambos os grupos iniciaram o período de observação com massas corporais similares e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à sua evolução ao longo do período (**Figura 1**). O mesmo foi observado para o ganho de massa (massa corpórea ao final do período de tratamento menos a massa inicial), conforme observado na figura 2.

Figura 1 – Evolução da massa corpórea. Os pontos representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=5, CORT n=8). Valores expressos em gramas. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Análise: ANOVA dois fatores seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 2 – Ganho de massa corporal. A massa inicial dos animais foi subtraída da massa ao final do tratamento para se obter o valor do ganho de massa no período. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=5, CORT n=8). Valores expressos em gramas. Não houve diferença significativa de ganho de massa entre ambos os grupos ($P < 0,05$). Análise: Teste `t` de Student.

5.2 Consumo semanal de ração e água

O consumo de ração e água foram acompanhados semanalmente. Apesar de apresentarem oscilações ao longo do período observado, estas não se mostraram significativamente diferentes em ambos parâmetros dentre os grupos (**Figura 3**).

Figura 3 – Consumo semanal de ração e água. Os pontos representam as médias $\pm$ EPM do consumo dos grupos nas respectivas semanas (CON n=5, CORT n=8). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,01$). Valores expressos em gramas (g). S = semana. Análise: ANOVA dois fatores seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

5.3 Massa dos coxins adiposos

As massas dos coxins SC, RP e ME foram analisadas e os dados se referem à massa relativa (g de tecido por 100 gramas de massa corporal), dos animais em ambos os grupos. Apesar dos grupos não terem apresentado diferença significativa entre si para o ganho de massa corporal e ingestão alimentar, houve, para o grupo CORT, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON para a massa do coxins SC, não havendo essa diferença nos demais coxins (**Figura 4**).

Figura 4 – Massa dos coxins adiposos. Massa dos coxins subcutâneo (SC), retroperitoneal (RP) e mesentérico (ME). Medida expressa em gramas de tecido (g) por 100 gramas (g) de massa corporal. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). (*) = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Análise: Teste `t` de Student.

5.4 Massa das glândulas adrenais

Após a eutanásia dos animais, as glândulas adrenais foram coletadas e pesadas a fim de verificarmos se haveria uma indicação de atrofia destas nos animais tratados, sugerindo uma possível inibição do eixo HPA. As massas das glândulas foram analisadas para cada 100 gramas de massa corporal dos animais e mostraram não haver diferença entre os grupos (**Figura 5**).

Figura 5 – Massa das adrenais. Medida expressa em gramas (g) de tecido por 100 gramas (g) de massa corporal. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). Não houve diferença entre CON e CORT ($P < 0,05$). Análise: Teste 't' de Student.

5.5 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT)

A fim de verificar se os animais apresentavam intolerância à glicose, na última semana antes do sacrifício, os animais foram submetidos ao teste oGTT. Conforme podemos analisar na **Figura 6**, a resposta glicêmica que se segue à carga oral de glicose não apresenta diferença entre os grupos. As curvas foram superponíveis.

Figura 6 – Teste de tolerância oral à glicose. A glicemia foi medida nos tempos 0 e 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos após administração de glicose por gavagem (75mg/100 g/mc). Medidas expressas em mg/dL. Os pontos representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). Não houve diferença entre os grupos ($P < 0,05$). Análise: ANOVA dois fatores seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

5.6 Glicemia de jejum

A concentração sérica de glicose em jejum, medida a partir do sangue colhido do tronco do animal no momento da eutanásia, demonstra que não houve diferença entre os grupos para a glicemia (**Figura 7**).

Figura 7 – Glicemia de jejum. Análise realizada em jejum de 12 horas. Medidas expressas em mg/dL. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=7). Não houve diferença entre os grupos ($P < 0,05$). Análise: Teste 't' de Student.

5.7 Lipídeos séricos

A concentração sérica de triglicérides, colesterol total e frações foram analisadas a partir do sangue coletado do tronco no dia da eutanásia. Houve um aumento significativo de triglicérides, HDL e VLDL, além de diminuição de LDL no grupo CORT, embora essa diferença não tenha sido observada para o colesterol total (**Figura 8**).

Figura 8 – Lipídeos séricos. Análise realizada em jejum de 12 horas no início da fase escuro ambiental. Medidas expressas em mg/dL. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). Houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides ($P < 0,05$). Não houve diferença para o parâmetro colesterol total. Análise: Teste t de Student.

5.8 Corticosterona

A concentração de corticosterona também foi medida a partir do sangue coletado no momento da eutanásia. Também não houve diferença significativa entre ambos grupos para esse parâmetro (**Figura 9**).

Figura 9 – Corticosterona. Análise realizada em jejum de 12 horas no início da fase escuro ambiental. Medidas expressas em µg/dL. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Análise: Teste `t` de Student.

5.9 Celularidade

A celularidade (número de células por coxim) foi analisada considerando a massa total do respectivo coxim adiposo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre CON e CORT para nenhum dos coxins analisados (**Figura 10**).

Figura 10 – Celularidade. Número médio de células dos coxins adiposos subcutâneo (SC), retroperitoneal (RP) e mesentérico (ME), relativo a massa total do coxim. Medida expressa em milhões de células por coxim. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=7, CORT n=8). Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos coxins ($P < 0,05$). Análise: Teste `t` de Student.

5.10 Volume celular

O volume celular médio foi determinado a partir da medição de 50 células de cada tecido. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhum dos coxins analisados (**Figura 11**).

Figura 11 – Volume celular. Volume médio das células dos coxins adiposos subcutâneo (SC), retroperitoneal (RP) e mesentérico (ME), considerando o volume médio de uma unidade de célula. Medida expressa em picolitros (pL). As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=7, CORT n=8). Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos coxins ($P < 0,05$). Análise: Teste t de Student.

5.11 Atividade enzimática de enzimas envolvidas na lipogênese

O efeito do tratamento crônico com cortisol na dose 0,6 mg/kg/dia sobre a atividade enzimática das enzimas envolvidas na lipogênese *de novo* (ACL, FAS, G6PDH e Málica) do coxim SC é apresentado na **Figura 12**. Houve diferença significativa entre os grupos para as enzimas ACL e G6PDH, quando a análise foi feita em relação à massa total do coxim. Como não houve alteração da massa dos demais coxins, estes não foram apresentados nesta análise.

Figura 12 – Atividade enzimática. Atividade enzimática máxima das enzimas ACL, FAS, málica e G6PDH no coxim subcutâneo (SC). Medida expressa em $\mu\text{mol/min/coxim}$. As barras representam as médias $\pm$ EPM dos grupos (CON n=11, CORT n=8). O grupo CORT apresentou maior atividade das enzimas ACL e G6PDH ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos na atividade das enzimas FAS e málica. ACL = enzima ATP-citrato liase; FAS = enzima ácido graxo sintase; G6PDH = enzima glicerol-6-fosfato desidrogenase. Análise: Mann-Whitney.

5.12 Expressão de proteínas

A análise da expressão de proteínas envolvidas em lipogênese e da enzima 11 β HSD1 foi restringida ao coxim SC, uma vez que este foi o único coxim a apresentar um aumento significativo de massa e considerando a complexidade do método utilizado para esta análise (*Western Blotting*). Neste coxim, foi observado um aumento significativo no conteúdo de 11 β HSD1 e uma redução significativa das enzimas AMPK e DGAT no grupo CORT. Não houve diferença significativa entre os grupos para as demais proteínas analisadas (LPL, CD36 e GPAT) (**Figura 13**).

Figura 13 – Expressão de proteínas. Expressão das proteínas LPL, CD36, DGAT, GPAT, AMPK e 11βHSD1 no coxim subcutâneo (SC), utilizando α-tubulina como *housekeeping*. Medida expressa em unidades arbitrárias (u.a.). As barras representam as médias ± EPM dos grupos (CON n=7, CORT n=7). O grupo CORT apresentou maior expressão de 11βHSD1 (P=0,03) e menor expressão de DGAT (P=0,02), e AMPK (P=0,002), não havendo diferença entre os grupos para as demais proteínas. LPL = lipase de lipoproteínas; CD36 = grupamento de diferenciação 36; DGAT = enzima diacilglicerol aciltransferase; GPAT = glicerolfosfato aciltransferase; AMPK = proteína quinase dependente de AMP; 11βHSD1 = 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase 1. Análise: Teste “t” de Student.

6 DISCUSSÃO

A literatura é bem consistente quanto aos efeitos do excesso crônico de GC sobre a redistribuição centrípeta do TAB, embora os mecanismos envolvidos em tal alteração ainda não estejam totalmente elucidados. Na maioria dos trabalhos reportados esses efeitos estão vinculados à administração de doses muito altas de GC. Conforme exposto por Lee et al. (2013a) em sua abrangente revisão, faltam trabalhos que busquem investigar os efeitos de alterações modestas do padrão de exposição do organismo aos GC. Neste contexto, este estudo foi o primeiro a analisar os efeitos da exposição crônica, contínua e invariável ao cortisol na lipogênese de diferentes depósitos de TAB, utilizando uma dose do hormônio pouco acima das concentrações fisiológicas. Para caracterização do modelo, foi utilizada uma minibomba osmótica (Alzet®) que liberou 0,6 mg/kg/dia (ou 0,18 mg/dia) de cortisol, ao longo de seis semanas.

A droga escolhida foi o cortisol hemisuccinato de hidrocortisona (*hydrocortisone-21 hemisuccinate sodium salt* – Sigma Aldrich Co), devido outros trabalhos mencionarem sua utilização satisfatória para o aumento da concentração de glicocorticoide circulante em ratos (PACAK et al., 2002, 1995; SZEMEREDI et al., 1988, 1989). Outro motivo para a escolha deste foi a intenção inicial de verificar possíveis alterações na expressão do receptor MR (dados não mostrados) e, considerando que a dexametasona (comumente utilizada) não se liga a esse receptor (DEVENPORT et al., 1989), o cortisol se mostrou uma melhor opção. Poderíamos também ter optado pela corticosterona (principal GC produzido pelo rato), mas como este seria um dos parâmetros a ser analisado para determinação da inibição do eixo HPA, a opção precisou ser descartada pois, se esta fosse administrada externamente, aquela produzida pelo animal não poderia ser mensurada. Conjuntamente, esses dados justificam a escolha da droga utilizada neste trabalho.

Os resultados da concentração de corticosterona sérica e da massa relativa das adrenais dos animais CORT demonstram que a dose de GC aplicada não foi suficiente para provocar a inibição do eixo HPA, uma vez que não houve diferença entre os grupos para tais parâmetros. Isso significa que o eixo HPA dos animais CORT teria se mantido responsivo aos estímulos externos e internos de ativação. Apesar

disso, o tratamento afetou o ritmo circadiano de exposição do organismo ao GC por reduzir o grau de variação das concentrações plasmáticas do hormônio (AUVINEN et al., 2013), já que a natureza da bomba utilizada permitiu uma infusão contínua e invariável de cortisol pelo período proposto.

Diferentemente do que ocorre com humanos, há relatos na literatura tanto de perda de massa corpórea (BAREL et al., 2010) quanto de redução do ganho de massa (BAREL et al., 2010; CAMPBELL et al., 2011) de roedores tratados com glicocorticoides. Em nosso estudo nenhum desses dados foram confirmados e a ausência de perda de massa corpórea corrobora os resultados do trabalho de Chimin et al., 2014, porém difere quanto à redução do ganho de massa (massa final menos massa inicial), uma vez que os resultados da autora mostram que os animais que receberam GC tiveram uma redução no ganho de massa corporal. A julgar pela característica do gráfico de ganho de massa, é possível especular que se o período experimental de nosso estudo se prolongasse ou se o N fosse maior, poderíamos notar essa diferença no ganho de massa dos animais CORT. No entanto, vale lembrar que a dose de GC utilizada nos estudos citados é consideravelmente maior do que a utilizada por nós, sugerindo que alterações na evolução da massa corporal em vigência de GC são dose-dependentes.

A ingestão alimentar também se manteve homogênea entre os grupos apesar da literatura afirmar que esta é influenciada por GC. Alguns trabalhos demonstram que estes hormônios aumentam a expressão do gene *ob*, o que resulta na liberação de leptina e indução da saciedade, diminuindo a ingestão alimentar (BRADLEY; CHEATHAM, 1999; DALLMAN et al., 2003; DE VOS et al., 1995; MURAKAMI et al., 1995). Outros referem aumento da ingestão alimentar devido a ativação de núcleos hipotalâmicos que resultam na liberação do neurotransmissor orexígeno neuropeptídeo Y (BELL et al., 2000; LEIBOWITZ et al., 1984). Esses resultados divergentes podem ser atribuídos a diferentes formas de tratamento, sendo algumas intervenções agudas e outras crônicas. Mais uma vez, esses trabalhos reportam a utilização de doses de GC muito superiores àquela utilizada em nosso estudo. Desse modo podemos supor que as alterações na ingestão alimentar também dependem, pelo menos em parte, da dose de GC a que os animais e indivíduos são expostos. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o uso crônico de GC em baixas doses não provoca as alterações alimentares referidas no excesso dos mesmos em ratos.

Uma vez que não houve diferença no padrão alimentar dentre os grupos, excluimos a análise da leptina dos nossos dados, já que esse seria um parâmetro interessante para discutir, principalmente, alterações no consumo alimentar.

O uso crônico de GC promove aumento dos tecidos adiposos da região central do corpo em detrimento à periferia (DALLMAN et al., 2003; MACFARLANE et al., 2009). Ao analisar a massa relativa destes depósitos, o coxim subcutâneo (região inguinal, considerada como depósito central no rato) dos animais CORT se mostrou maior em relação ao controle. Para os demais coxins analisados (viscerais) os grupos não apresentaram diferença entre si, sugerindo que a intervenção farmacológica aplicada nesse estudo não foi capaz de provocar alterações que alcançassem todos os diferentes depósitos adiposos da região central do corpo. No entanto, é importante reforçar: nossos resultados indicam que a exposição crônica a doses de GC pouco acima dos valores fisiológicos é suficiente para aumentar a gordura subcutânea abdominal.

A gordura SC possui adipócitos menores quando comparada aos depósitos viscerais. Adipócitos menores são mais sensíveis à ação da insulina e mais ávidos pela captação de lipídeos, sendo que a última característica é ainda mais pronunciada em adipócitos da SC abdominal quando comparada aos da região gluteofemoral (IBRAHIM, 2010). Assim, o acúmulo de lipídeos na SC funciona como um sistema “tamponante” fisiológico, onde o excesso de ácidos graxos livres e glicerol circulantes são estocados para evitar maiores desordens metabólicas pela deposição em outros tecidos (IBRAHIM, 2010). É sabido que no excesso crônico de GC (síndrome de Cushing) ocorre uma redistribuição centrípeta do TAB, onde a gordura subcutânea periférica é diminuída e a visceral é aumentada (WAJCHENBERG et al., 1995). Porém, como vimos, a gordura SC abdominal apresenta características diferentes da SC periférica, estando também aumentada na síndrome de Cushing assim como a gordura visceral. Rebuffé-Scrive et al. (1988) atribuem esse aumento à maior atividade da enzima LPL.

Já foi demonstrado que os GC aumentam a produção e secreção de TAG e VLDL no fígado mediante diminuição da lipólise hepática (ARNALDI et al., 2003, 2010; DOLINSKY et al., 2004). Considerando que o grupo CORT apresentou um aumento significativo de triglicérides circulantes, assim como das VLDLs que são responsáveis pelo transporte dos mesmos, podemos aventar que a característica da gordura SC

abdominal de captar mais lipídeos, somado ao aumento destes na circulação, pode ter contribuído para o aumento observado no tecido. Ainda que a enzima LPL – que está envolvida na captação dos TAG – dos mesmos animais não teve sua expressão aumentada, houve uma tendência ao aumento desta ($P=0,056$). Também não houve aumento da expressão da proteína CD36, que “colabora” com a LPL na captação de AG. Ainda assim, podemos especular que talvez o conteúdo dessas proteínas no tecido fosse suficiente para efetuar a captação dos lipídeos, mesmo que às custas de maior atividade das mesmas, já que os GC aumentam a atividade da LPL (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1988). Para confirmar essa hipótese, no entanto, seria necessário buscar um método de avaliar a atividade dessas proteínas.

Curiosamente o grupo CORT mostrou uma diminuição na expressão da enzima DGAT. Por se tratar de uma enzima responsável por um dos passos da esterificação dos ácidos graxos em glicerol, ao constatar o aumento de TAG circulante a diminuição no conteúdo dessa enzima parece incoerente. Seria, então, aconselhável a realização de mais estudos para confirmação desse dado.

Também já foi demonstrado que os GC interferem na atividade de enzimas envolvidas na lipogênese (DIAMANT; SHAFRIR, 1975; VOLPE; MARASA, 1975; WANG et al., 2004). Nossos resultados do teste de atividade enzimática mostraram um aumento na cinética das enzimas lipogênicas ACL e G6PDH no grupo CORT, corroborando estudo prévio do nosso grupo (CHIMIN et al., 2014). Paralelamente, houve uma diminuição significativa da expressão da enzima AMPK nos mesmos animais, assemelhando-se a trabalhos que revelaram que os GC diminuem a atividade da AMPK no TAB de humanos (KOLA et al., 2008), de roedores e de adipócitos humanos *in vitro* (CHRIST-CRAIN et al., 2008). A ativação da AMPK no tecido adiposo inibe a lipogênese e estimula a oxidação lipídica, enquanto sua inativação libera a via lipogênica aumentando da estocagem de lipídeos em adipócitos. Conjuntamente, a diminuição da AMPK e o aumento da atividade das enzimas ACL e G6PDH observados em nosso estudo indicam que a via da lipogênese *de novo* estaria mais ativa nos animais CORT, sugerindo uma explicação adicional para o aumento da SC.

Colaborando com essa ideia, nossos dados mostram que não houve aumento de peso dos animais CORT, apesar do aumento da gordura SC. Isso sugere que houve redução de algum outro tecido, possivelmente de massa magra, uma vez que

o catabolismo proteico é um dos efeitos do uso crônico de GC (DALLMAN et al., 2003; MACFARLANE et al., 2009). Reforça essa hipótese a constatação de que não houve alterações nos outros depósitos adiposos. Assim, a lipogênese poderia ser favorecida uma vez que o catabolismo proteico eleva os aminoácidos circulantes, disponibilizando-os para síntese hepática de glicose. Esta, poderia ser utilizada pelas enzimas da via de lipogênese *de novo* (que estão aumentadas) para a formação de ácidos graxos nos adipócitos, aumentando o volume das células. Para comprovar tal hipótese um estudo do conteúdo de massa magra desses animais seria necessário.

As duas hipóteses dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no aumento da SC apresentadas acima, podem ser respaldadas pelos efeitos conhecidos do GC no fígado, o qual será brevemente discutido a seguir, embora este órgão não tenha sido objeto de nosso estudo. Inicialmente, o cortisol pode ter cumprido seu papel clássico de aumentar a lipólise, disponibilizando ácidos graxos na circulação. O aumento da captação destes no fígado (mantida pela infusão contínua do cortisol) poderia levar ao acúmulo dos mesmos com consequente ativação de proteínas serina-quinase (JNK e IKK- β) que resultam em resistência à insulina nos hepatócitos (TILG; MOSCHEN, 2008). Além disso, é sabido que o GC aumenta a expressão gênica de enzimas da gliconeogênese hepática (fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose 6-fosfatase) (ARNALDI et al., 2010). Conjuntamente essas alterações provocariam um aumento da glicose disponível no sangue que seria amplamente captada pelos adipócitos da SC abdominal, mediante a sensibilidade à insulina preservada neste tecido. Assim, o aumento observado na atividade de enzimas da DNL poderia propiciar maior conversão da glicose captada em ácidos graxos, resultando em maior acúmulo de lipídeos nesse tecido e proporcionando seu crescimento. Ainda, essa alteração do metabolismo lipídico instalada no fígado seria um fator adicional ao efeito direto dos GC no aumento da produção de TAG e VLDL, dados estes que foram previamente discutidos.

A dislipidemia tem sido apontada como uma das consequências do uso crônico de doses excessivas de GC, embora o papel causativo desses hormônios, especialmente em animais, não tenha sido totalmente comprovado e os resultados encontrados na literatura sejam controversos (AUVINEN et al., 2013). Em nosso modelo, além do aumento já mencionado em VLDL e TAG, observamos um aumento da HDL e uma diminuição da LDL no grupo CORT. No entanto, o colesterol total não

sofreu alterações pelo tratamento, assim como foi observado nos trabalhos de Auvinen et al. (2013) e Kumari et al. (2003) realizados em camundongos. O aumento da HDL corrobora o trabalho de Wang et al. (2012), no qual indivíduos saudáveis receberam baixas doses de dexametasona, diariamente, por três semanas e tiveram um aumento dessa lipoproteína. O mesmo foi observado em indivíduos com mais de 60 anos expostos a GC exógenos (CHOI; SEEGER, 2005). Esses resultados podem ser explicados pelo efeito dos GC na redução da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). A CETP é uma proteína plasmática responsável pela transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas, provocando redução da concentração de HDL-colesterol circulante. Como os GC reduzem a atividade da CETP (BEENTJES et al., 2000), o tratamento com esses hormônios culmina no aumento da concentração plasmática da HDL e esta pode ser uma explicação para o resultado encontrado em nosso estudo. Por outro lado, a redução da LDL observada no grupo CORT contradiz a maioria dos trabalhos com uso crônico de GC. Considerando as afirmações acima a respeito da CETP e da HDL em vigência de GC e o fato do colesterol total não ter sofrido alterações, podemos especular que a redução da LDL se atribui a uma modificação no perfil das lipoproteínas. Contudo, a inconsistência da literatura em relação aos GC e dislipidemia, principalmente em modelos animais, demanda mais estudos para que os motivos das alterações encontradas possam ser satisfatoriamente explicados.

O tecido adiposo cresce quando novos adipócitos são formados aumentando o número de células do tecido (hiperplasia), ou quando as células pré-existent aumentam seu volume (hipertrofia) (DROLET et al., 2008). A análise de celularidade mostrou que não houve diferença no número de células entre os grupos para nenhum coxim, indicando que o aumento observado no tecido SC do grupo CORT não foi por hiperplasia. Por outro lado, o volume celular do coxim SC aumentou 27,6% em relação ao controle. Paralelamente, a diferença entre a massa do coxim SC dos animais CORT e do grupo CON representa 26,8%. Ainda que a diferença no volume celular não tenha sido estatisticamente significativa, podemos inferir que o aumento da SC pode ter ocorrido por hipertrofia dos adipócitos, pois o volume celular expressou um percentual de crescimento semelhante ao aumento da massa do tecido. Além disso, as hipóteses discutidas acima sobre os mecanismos de deposição de lipídeos nos adipócitos que possivelmente possam ter ocorrido, apontam para a hipertrofia dos

mesmos. No entanto, vale a pena mencionar que Geer et al. (2014) afirmam que o acúmulo de tecido adiposo envolve não apenas hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, mas também a expansão da matriz extracelular e células não adiposas, como as do estroma vascular, células endoteliais, monócitos e macrófagos. Mas o papel dos GCs na regulação desses componentes não-adipocitários em relação ao aumento da massa do TAB ainda não foi investigado e representa uma importante área para pesquisas futuras.

O tratamento prolongado com GC é classicamente referido como causador de intolerância à glicose e resistência sistêmica à insulina, sendo essa característica tempo e dose-dependente (ANGELINI et al., 2010; RAFACHO et al., 2008; SEVERINO et al., 2002). Contraditoriamente, os dados da glicemia de jejum e do teste de tolerância oral à glicose realizados no final do nosso período experimental demonstram resultados praticamente iguais para ambos os grupos, sugerindo que o tratamento não foi suficiente para induzir o quadro de intolerância à glicose. Baseado nos estudos mencionados, podemos especular que essa insuficiência seja atribuída à moderada dose utilizada do hormônio. Ainda, estudos revelam diferenças na captação de glicose estimulada por GC entre tecidos adiposos viscerais e o subcutâneo (GEER et al., 2014, LUNDGREN et al., 2004), sendo que no último a captação é mantida. Um estudo *in vivo* realizado em humanos que receberam hidrocortisona *overnight* resultou em resistência à insulina sistêmica mas aumentou a ação da mesma no tecido adiposo subcutâneo (HAZLEHURST et al., 2013). Assim, a hipótese de que a SC abdominal poderia estar captando mais glicose é reforçada, e podemos supor que esse tecido esteja contribuindo para evitar a intolerância à glicose sistêmica. Talvez, se o período experimental se prolongasse, o aumento progressivo dos adipócitos poderia atingir o estágio em que eles se tornam disfuncionais e perdem capacidade de clarear a glicose satisfatoriamente. Aí sim uma das consequências poderia ser uma resistência global à insulina e intolerância à glicose.

Em nosso modelo experimental, houve um aumento na expressão da enzima 11 β HSD1 na SC do grupo CORT. Esse aumento pode ser resultado de um estímulo direto do cortisol, ocasionado pela oferta constante do hormônio, pois há diversos elementos responsivos aos GC na região promotora do gene humano da 11 β HSD1, demonstrando que este estimula a expressão da enzima. Ainda, parece que o controle da expressão e atividade desta em adipócitos maduros está sujeita a um *feedback*

positivo dose-dependente mediado pelo cortisol (BUJALSKA et al., 1999).

Conforme previamente mencionado, apenas pequenas frações do cortisol ativo (ou corticosterona no rato) circulam na forma livre, enquanto cerca de 50% da forma inativa (cortisona) circula ligada a proteínas. Portanto, uma fração maior do hormônio inativo fica disponível para células periféricas que são alvo de GC e expressam a enzima 11 β HSD1, como o tecido adiposo. A atividade desta enzima no TAB está aumentada em modelos animais de obesidade (LIVINGSTONE et al., 2000) e já foi demonstrado que sua atividade (RASK et al., 2002) e os níveis de RNAm (GOEDECKE et al., 2006; KANNISTO et al., 2004, LINDSAY et al., 2003; PAULMYER-LACROIX et al., 2002; WAKE et al., 2003) estão aumentados no tecido adiposo SC de humanos obesos. Camundongos que super expressavam essa enzima seletivamente em adipócitos desenvolveram hiperfagia, adiposidade visceral, hiperglicemia e resistência à insulina, apesar de apresentarem GC circulante normal (MASUZAKI et al., 2001; MORTON et al., 2004). Contrariamente, camundongos *knockout* para 11 β HSD1 no TAB apresentaram melhor sensibilidade hepática à insulina e resistência a hiperglicemia e obesidade induzida por dieta lipídica (KOTELEVTSSEV et al., 1997). Esses dados indicam que essa enzima desempenha um papel importante no aumento do tecido adiposo, o qual parece se sobressair aos efeitos do hormônio ativo circulante. Por outro lado, seu impacto na ação dos GC parece se restringir a tipos celulares específicos, pois o aumento da expressão desta especificamente no fígado não causou obesidade e resultou em alterações metabólicas moderadas (PATERSON et al., 2004).

O trabalho de Dube e colaboradores (2015) foi importante por demonstrar que o aumento da enzima dentro do adipócito realmente resulta no aumento de GC local. Eles realizaram um estudo por micro diálise, que possibilitava mensurar a produção local de cortisol mediada pela ação da enzima 11 β HSD1 no tecido SC abdominal e periférico (pernas) de indivíduos magros não diabéticos, obesos não diabéticos e obesos com diabetes tipo 2. Os autores mostraram que há diferenças regionais na ação da 11 β HSD1 entre as gorduras SC, sendo que a SC periférica não apresentou atividade detectável da enzima em nenhum dos três grupos analisados, enquanto na SC abdominal a enzima se mostrou substancialmente mais ativa, especialmente no grupo de obesos com diabetes tipo 2, resultando no aumento de cortisol dentro do tecido.

Baseado nessas informações, podemos inferir que a exposição contínua do tecido adiposo ao GC, proporcionado pelo nosso modelo experimental, influenciou o aumento da expressão da enzima 11 β HSD1 neste tecido que, por sua vez, aumentou a concentração local de corticosterona, ampliando a meia vida e os efeitos do hormônio. Esse processo pode ter mediado as alterações observadas no que diz respeito à lipogênese e ao aumento da SC abdominal. Nossa hipótese é reforçada pelo trabalho previamente mencionado de Masuzaki et al. (2001), onde camundongos transgênicos super expressavam 11 β HSD1 em adipócitos. Os autores observaram que a exposição dos adipócitos ao GC sintetizado localmente pela ação desta enzima resultou no acúmulo de lipídeos e aumento no tamanho das células.

Ainda, há uma consideração a fazer a respeito do aumento da atividade da enzima G6PDH e o aumento da expressão da 11 β HSD1. A G6PDH é a primeira enzima envolvida na via das pentoses fosfato. Essa via é responsável pela síntese de pentoses fosfato para a biossíntese de DNA e RNA e para a geração intracelular do agente redutor NADPH para vias que necessitam deste como cofator essencial, como é o caso da síntese de ácidos graxos e da enzima 11 β HSD1. Na maioria dos órgãos e tipos celulares analisados até agora, a 11 β HSD1 é co-expressa com a G6PDH (GOMEZ-SANCHEZ et al., 2008). Bujalska et al. (1999) investigaram se haveria diferença na atividade da G6PDH do TAB omental (visceral) comparado ao subcutâneo, com o intuito de verificar se a disponibilidade do cofator seria um fator limitante que explicaria a expressão de 11 β HSD1 em ambos tecidos. Essa diferença não foi encontrada. Embora os resultados dos autores sugiram que a disponibilidade de NADPH não seja limitante para a expressão da enzima, ela parece o ser para sua atividade *in vivo* (ODERMATT; KLUSONOVA, 2015). Em nosso estudo observamos tanto um aumento da expressão da 11 β HSD1 quanto da atividade da G6PDH na SC dos animais que receberam cortisol. Mediante as afirmações dos trabalhos supracitados, podemos inferir que um maior fornecimento de NADPH mediado pela atividade aumentada da G6PDH poderia estar contribuindo com a atividade da 11 β HSD1 para o aumento de cortisol dentro do tecido, intensificando suas ações sobre a lipogênese, conforme já discutido.

Para finalizar, voltamos a pontuar o comentário de Lee et al. (2013a) em seu trabalho de revisão, no qual mencionam que a maioria dos estudos com glicocorticoides envolve doses muito altas desses hormônios, o que não fornece uma

visão de como o metabolismo poderia ser afetado por variações fisiológicas ou apenas supra fisiológicas (porém não farmacológicas) ao longo do dia. Ainda, os autores comentam que são necessários estudos que investiguem como as variações no padrão de secreção do cortisol poderiam afetar a deposição regional de tecido adiposo e sua função. Em nosso estudo, os animais CORT receberam uma infusão de cerca de 7,5 µg/dL de cortisol por hora. Essa dose de GC estaria mais próxima das concentrações normais do animal do que qualquer outro estudo de nosso conhecimento. Somado a esse fato, a infusão constante ocasionada pela natureza da bomba utilizada compõe conjuntamente situações semelhantes às mencionadas pela autora: **1)** houve uma oferta **supra fisiológica porém não-farmacológica** de GC (pois a dose utilizada aproxima-se daquela liberada naturalmente pelas adrenais dos animais); **2)** esta oferta foi mantida pela **constância da liberação** do cortisol pela bomba – o que ocasionou uma variação do padrão de exposição pulsátil e circadiano do organismo ao hormônio. Assim, pudemos observar como tais alterações hormonais afetaram a deposição regional de tecido adiposo: houve um aumento da deposição de gordura no depósito subcutâneo abdominal.

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados observados podemos concluir que a utilização de GC mesmo em doses moderadas, somada a uma variação do padrão circadiano de exposição do organismo ao hormônio, aumenta a deposição de gordura no depósito subcutâneo abdominal de ratos. A diminuição da expressão da enzima AMPK e o aumento da atividade de enzimas da lipogênese *de novo* indicam que a expansão do tecido envolve exacerbação da via lipogênica na formação de lipídeos. Outro mecanismo que poderia ser somado, é um possível aumento da captação de lipídeos circulantes mediante aumento da concentração de triglicérides sérico.

Finalmente, esses efeitos poderiam ser resultado do aumento da concentração local de GC mediante expressão aumentada da enzima 11 β HSD1, o que é reforçado pelo aumento da atividade da G6PDH e possivelmente do cofator NADPH. Esta hipótese, contudo, requer mais estudos para ser confirmada.

REFERÊNCIAS*

ABATE, N.; GARG, A.; PESHOCK, R. M.; STRAY-GUNDERSEN, J.; GRUNDY, S. M. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 88-98, 1995.

ADCOCK, I. M.; LANE, S. J. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. **J. Endocrinol.**, v. 178, p. 347–355, 2003.

AGARWAL, A. K. Cortisol metabolism and visceral obesity: role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme and reduced co-factor NADPH. **Endocr. Res.**, v. 4, p. 411-418, 2003.

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity** (Silver Spring)., v. 5, p. 242S-249S, 2006.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 8, p. 327-332, 2000.

ALMAWI, W. Y.; MELEMEDJIAN, O. K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, p. 9–15, 2002.

ANGELINI, N.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 87, n.2, p. 184-191, 2010.

ARNALDI, G.; ANGELI, A.; ATKINSON, A. B.; BERTAGNA, X.; CAVAGNINI F.; CHROUSOS, G. P.; FAVA, G. A.; FINDLING, J. W.; GAILLARD, R. C.; GROSSMAN, A. B.; KOLA, B.; LACROIX, A.; MANCINI, T.; MANTERO, F.; NEWELL-PRICE, J.; NIEMAN, L. K.; SONINO, N.; VANCE, M. L.; GIUSTINA, A.; BOSCARO, M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 5593–5602, 2003.

ARNALDI, G.; SCANDALI, V. M.; TREMENTINO, L.; CARDINALETTI, M.; APPOLLONI, G.; BOSCARO, M. Pathophysiology of Dyslipidemia in Cushing's Syndrome. **Neuroendocrinology**, v. 92, n. 1, p. 86–90, 2010.

ATANASOV, A. G.; NASHEV, L. G.; SCHWEIZER, R. A.; FRICK, C.; ODERMATT, A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase, **FEBS Lett.**, v. 571, p. 129–133, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUVINEN, H. E.; WANG, Y.; PRINCEN, H.; ROMIJN, J. A.; HAVEKES, L. M.; SMIT, J. W.; MEIJER, O. C.; BIERMASZ, N. R.; RENSEN, P. C.; PEREIRA, A. M. Both Transient and Continuous Corticosterone Excess Inhibit Atherosclerotic Plaque Formation in APOE*3-Leiden.CETP Mice. **PLoS One**, v. 22; 8, n. 5, e63882, 2013.

BANHEGYI, G.; BENEDETTI, A.; FULCERI, R.; SENESI, S. Cooperativity between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 27017–27021, 2004.

BAREL, M.; PEREZ, O. A. B.; GIOZZET, V. A.; RAFACHI, R.; BOSQUEIRO, J. R.; AMARAL, S. L. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 5, p. 999-1007, 2010.

BARRET, E. J. The adrenal gland. In: BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. Medical physiology. 2th ed. Philadelphia: **Saunders Elsevier**, 2012. p. 1057-1073.

BARTHOLOME, B.; SPIES, C. M.; GABER, T.; SCHUCHMANN, S.; BERKI, T.; KUNKEL, D.; BIENERT, M.; RADBRUCH, A.; BURMESTER, G. R.; LAUSTER, R.; SCHEFFOLD, A.; BUTTGEREIT, F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and upregulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. **FASEB J.**, v. 18, p. 70–80, 2004.

BAXTER, J. D.; FORSHAM, P. H. Tissue effects of glucocorticoids. **Am. J. of Medicine**, v. 53, p. 573–589, 1972.

BAZIN, R.; FERRÉ, P. Assays of lipogenic enzymes. **Methods Mol. Biol.**, v. 155, p. 121-127, 2001.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell.**, v. 56, p. 335–344, 1989.

BEENTJES, J. A.; VAN TOL, A.; SLUITER, W. J.; DULLAART R. P. Decreased plasma cholesterol esterification and cholesteryl ester transfer in hypopituitary patients on glucocorticoid replacement therapy. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 60, n. 3, p. 189-98, 2000.

BELL, M. E.; BHATNAGAR, S.; LIANG, J.; SORIANO, L.; NAGY, T. R.; DALLMAN, M. F. Voluntary sucrose ingestion, like corticosterone replacement, prevents the metabolic deficits of adrenalectomy. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, p. 461–470, 2000.

BELL, M. E.; BHATNAGAR, S.; AKANA, S. F.; CHOI, S.; DALLMAN, M. F. Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 17, p. 6707-6713, 2000.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; SCHMIDT, F.; STORK, H. Methods of enzymatic analysis. 2th ed. Orlando, FL: **Academic Press**, 1974. 4 v.

BJÖRNTORP, P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 20, p. 291–302, 1996.

BRADLEY, R. L.; CHEATHAM, B. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 272-278, 1999.

BUJALSKA, I. J.; KUMAR, S.; HEWISON, M.; STEWART, P. M. Differentiation of Adipose Stromal Cells: The Roles of Glucocorticoids and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 3188-3196, 1999.

BUTTGEREIT F.; STRAUB, R. H.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. R. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. **Arthritis Rheum.**, v. 50, p. 3408–3417, 2004.

BUTTGEREIT, F.; SAAG, K. G.; CUTOLO, M.; DA SILVA, J. A.; BIJLSMA, J. W. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 34, p. 14–21, 2005.

BUTTGEREIT, F.; SCHEFFOLD, A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. **Steroids**, v. 67, p. 529–534, 2002.

CAMPBELL, J. E.; PECKETT, A. J.; D'SOUZA, A. M.; HAWKE, T. J.; RIDDELL, M. C. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 1, p. C198-C209, 2011.

CATO, A. C.; NESTL, A.; MINK, S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Sci. STKE**, v. 138, re9, 2002.

CHIMIN, P.; FARIAS, T. DA S.; TORRES-LEAL, F. L.; BOLSONI-LOPES, A.; CAMPAÑA, A. B.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F. B. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 211, n. 2, p. 409-420, 2014.

CHOI, H. K.; SEEGER, J. D. Glucocorticoid use and serum lipid levels in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis Rheum.**, v. 53, n. 4, p. 528–535, 2005.

CHRIST-CRAIN, M.; KOLA, B.; LOLLI, F.; FEKETE, C.; SEBOEK, D.; WITTMANN, G.; FELTRIN, D.; IGREJA, S. C.; AJODHA, S.; HARVEY-WHITE, J.; KUNOS, G.; MULLER, B.; PRALONG, F.; AUBERT, G.; ARNALDI, G.; GIACCHETTI, G.; BOSCARO, M.; GROSSMAN, A. B.; KORBONITS, M. AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. **FASEB J.**, v. 22, p. 1672–1683, 2008.

CROXTALL, J. D.; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R. J. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 289–298, 2000.

DALLMAN, M. F.; PECORARO, N.; AKANA, S. F.; LA FLEUR, S. E.; GOMEZ, F.; HOUSHYAR, H.; BELL, M. E.; BHATNAGAR, S.; LAUGERO, K. D.; MANALO, S. Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11696–11701, 2003.

DE VOS, P.; SALADIN, R.; AUWERX, J.; STAELS, B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. **J. Biol. Chem.**, v. 27, p. 15958-15961, 1995.

DEVENPORT, L.; KNEHANS, A.; SUNDSTROM, A.; THOMAS, T. Corticosterone's dual metabolic actions. **Life Sci.**, v. 45, n. 15, p. 1389-1396, 1989.

DIAMANT, S.; SHAFRIR, E. Modulation of the activity of insulin-dependent enzymes of lipogenesis by glucocorticoids. **Eur. J. Biochem.**, v. 53, n. 2, p. 541-546, 1975.

DOLINSKY, V. W.; DOUGLAS, D. N.; LEHNER, R.; VANCE, D. E. Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. **Biochem J.**, v. 378, n. 3, p. 967–974, 2004.

DROLET, R.; RICHARD, C.; SNIDERMAN, A. D.; MAILLOUX, J.; FORTIER, M.; HUOT, C.; RHÉAUME, C.; TCHERNOF, A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissue in women. **Int. J. Obes. (Lond)**, v. 32, n. 2, p. 283-291, 2008.

DUBE, S.; NORBY, B. J.; PATTAN, V.; CARTER, R. E.; BASU, A.; BASU, R. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 activity in subcutaneous adipose tissue in humans: implications in obesity and diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 100, n. 1, p.E70-76, 2015.

ENGELI, S.; BÖHNKE, J.; FELDPAUSCH, M.; GORZELNIAK, K.; HEINTZE, U.; JANKE, J.; LUFT, F. C.; SHARMA, A. M. Regulation of 11 β -HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. **Obes. Res.**, v. 1, p. 9–17, 2004.

FALKENSTEIN, E.; NORMAN, A. W.; WEHLING, M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 2072–2075, 2000.

FINE, J. B.; DI GIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 9, p. 764-768, 1997.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 85, n. 5, p. 192-203, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 216-29, 2006.

FREEDMAN, M. R.; HORWITZ, B. A.; STERN, J. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. **Am J Physiol.**, v. 4, n. 2, p. R595-607, 1986.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 6, p. 499-502, 1972.

FRUHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, J.; BURREL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.**, v. 280, p. E 827-847, 2001.

GAGNER, J. P.; DROUIN, J. Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 1, p. 25–32, 1985.

GEER, E. B.; ISLAM J.; BUETTNER, C. Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 43, n. 1, p. 75–102, 2014.

GOEDECKE, J. H.; WAKE, D. J.; LEVITT, N. S.; LAMBERT, E. V.; COLLINS, M. R.; MORTON, N. M.; ANDREW, R.; SECKL, J. R.; WALKER, B. R. Glucocorticoid metabolism within superficial subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with features of the metabolic syndrome in South African women. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 65, p. 81–87, 2006.

GOMEZ-SANCHEZ, E. P.; ROMERO, D. G.; DE RODRIGUEZ, A. F.; WARDEN, M. P.; KROZOWSKI, Z.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11b-hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. **Endocrinology**, v. 149, p. 525–533, 2008.

GOODPASTER, B. H.; THAETE, F. L.; SIMONEAU, J. A.; KELLEY, D. E. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. **Diabetes**, v. 46, p. 1579-1585, 1997.

GUTIERREZ, D. A.; PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Curr Diab Rep.**, v. 1, p. 26-32, 2009.

HAFEZI-MOGHADAM, A.; SIMONCINI, T.; YANG, Z.; LIMBOURG, F. P.; PLUMIER, J.; REBSAMEN, M. C.; HSIEH, C. M.; CHUI, D. S.; THOMAS, K. L.; PROROCK, A. J.; LAUBACH, V. E.; MOSKOWITZ, M. A.; FRENCH, B. A.; LEY K.; LIAO, J. K. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nat. Med.**, v. 8, p. 473–479, 2002.

HAZLEHURST, J. M.; GATHERCOLE, L. L.; NASIRI, M.; ARMSTRONG, M. J.; BORROWS, S.; YU, J.; WAGENMAKERS, A. J.; STEWART, P. M.; TOMLINSON, J. W. Glucocorticoids fail to cause insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue in vivo. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 4, p. 1631–1640, 2013.

HELLERSTEIN, M. K. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. S53-65, 1999.

HUGHES, K. A.; REYNOLDS, R. M.; ANDREW, R.; CRITCHLEY, H. O.; WALKER, B. R. Glucocorticoids turn over slowly in human adipose tissue in vivo. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, p. 4696–4702, 2010.

HUNTER, G. R.; SNYDER, S. W.; KEKES-SZABO, T.; NICHOLSON, C.; BERLAND, I. Intra-abdominal adipose tissue variables associated with risk of possessing elevated blood lipids and blood pressure. **Obes. Res.**, v. 2, p. 563–569, 1994.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obes. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

KANNISTO, K.; PIETILAINEN, K. H.; EHRENBORG, E.; RISSANEN, A.; KAPRIO, J.; HAMSTEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 4414–4421, 2004.

KERSHAW, E. E.; MORTON, N. M.; DHILLON, H.; RAMAGE, L.; SECKL, J. R.; FLIER, J. S. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 4, p. 1023-1031, 2005.

KOLA, B.; CHRIST-CRAIN, M.; LOLLI, F.; ARNALDI, G.; GIACCHETTI, M. B.; GROSSMAN, A. B.; KORBONITS, M. Changes in adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 12, p. 4969-4973, 2008.

KOTELEVTSSEV, Y.; HOLMES, M. C.; BURCHELL A.; HOUSTON, P. M.; SCHMOLL, D.; JAMIESON, P.; BEST, R.; BROWN, R.; EDWARDS, C. R.; SECKL, J. R.; MULLINS, J. J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 14924 –14929, 1997.

KUMARI M, GRAHAME-CLARKE C, SHANKS N, MARMOT M, LIGHTMAN S, VALLANCE P. Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. **Stress**, v. 6, p. 297–299, 2003.

LEE, M. J.; FRIED, S. K.; MUNDT, S. S.; WANG, Y.; SULLIVAN, S.; STEFANNI, A.; DAUGHERTY, B. L.; HERMANOWSKI-VOSATKA, A. Depot-specific regulation of the conversion of cortisone to cortisol in human adipose tissue. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, p. 1178–1185, 2008.

LEE, M. J.; PRAMYOTHIN, P.; KARASTERGIOU, K.; FRIED, S. K. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. **Biochim Biophys Acta.**, v. 3, p. 473-481, 2013.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S.K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Mol. Aspects Med.** v. 34, n. 1, p. 1–11, 2012.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Mol Aspects Med.**, v. 1, p. 1-11, 2013.

LEE, M.J.; GONG, D. W.; BURKEY, B. F.; FRIED, S. K. Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 3, p.E571-580, 2011.

LEIBOWITZ, S. F.; ROLAND, C. R.; HOR, L.; SQHILLARI, V. Noradrenergic feeding elicited via the paraventricular nucleus is dependent upon circulating corticosterone. **Physiol. Behav.**, v. 32, p. 857-864, 1984.

LINDSAY, R. S.; WAKE, D. J.; NAIR, S.; BUNT, J.; LIVINGSTONE, D. E.; PERMANA, P. A.; TATARANNI, P. A.; WALKER, B. R. Subcutaneous adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 2738–2744, 2003.

LIVINGSTONE, D. E.; JONES, G. C.; SMITH, K.; JAMIESON, P. M.; ANDREW, R.; KENYON, C. J.; WALKER, B. R. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 560–563, 2000.

LJUNG, T.; ANDERSSON, B.; BENGTSSON, B. A.; BJÖRNTORP, P.; MARIN, P. Inhibition of cortisol secretion by dexamethasone in relation to body fat distribution: a dose–response study. **Obes. Res.**, v. 4, p. 277–282, 1996.

LUNDGREN, M.; BUREN, J.; RUGE, T.; MYRNÄS, T.; ERIKSSON, J. W. Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p.2989–2997, 2004.

LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, v. 144, p. 2195-2200, 2003.

MACFARLANE, D. P.; FORBES, S.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. **J. Endocrinol.**, v. 2, p. 189-204, 2009.

MALKOSKI, S. P.; DORIN, R. I. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. **Mol. Endocrinol.**, v. 10, p. 1629–1644, 1999.

MÄRIN, P.; ANDERSSON, B.; OTTOSSON, M.; OLBE, L.; CHOWDHURY, B.; KVIST, H.; HOLM, G.; SJÖSTRÖM, L.; BJÖRNTORP, P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. **Metabolism**, v. 41, p. 1242–1248, 1992.

MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; MORTON, N. M.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R.; FLIER, J. S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v. 294, n. 5549, p.2166-2170, 2001.

MITSUGI, N.; KIMURA, F. Simultaneous determination of blood levels of corticosterona and growth hormone in the male rat: relation to sleep-wake-fulness cycle. **Neuroendocrinology**, v. 2, p. 125-130, 1985.

MORTON, N. M.; PATERSON, J. M.; MASUZAKI, H.; HOLMES, M. C.; STAELS, B.; FIEVET, C.; WALKER, B. R.; FLIER, J. S.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. **Diabetes**, v. 53, p. 931–938, 2004.

MURAKAMI, T.; IIDA, M.; SHIMA, K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 3. p. 1260-1267, 1995.

MZIAUT, H.; KORZA, G.; HAND, A. R.; GERARD, C.; OZOLS, J. Targeting proteins to the lumen of endoplasmic reticulum using N-terminal domains of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase and the 50 kDa esterase, **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 14122–14129, 1999.

ODERMATT, A.; ARNOLD, P.; STAUFFER, A.; FREY, B. M.; FREY, F. J. The N-terminal anchor sequences of 11b-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 28762–28770, 1999.

ODERMATT, A.; KLUSONOVA, P. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1: Regeneration of active glucocorticoids is only part of the story. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 151, p. 85-92, 2015.

OZOLS, J. Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11b-hydroxysteroid dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 2305–2312, 1995.

PACAK, K.; PALKOVITS, M.; KVETNANSKY, R.; MATERN, P.; HART, C.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology*, v. 11, p. 4814-4819, 1995.

PACAK, K.; TJURMINA, O.; PALKOVITS, M.; GOLDSTEIN, D. S.; KOCH, C. A.; HOFF, T.; CHROUSOS, G. P. Chronic hypercortisolemia inhibits dopamine synthesis and turnover in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. **Neuroendocrinology**, v. 76, n. 3, p. 148-157, 2002.

PATERSON, J. M.; MORTON, N. M.; FIEVET, C.; KENYON, C. J.; HOLMES, M. C.; STAELS, B.; SECKL, J. R.; MULLINS, J. J. Metabolic syndrome without obesity: hepatic overexpression of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 7088–7093, 2004.

PATSOURIS, D.; NEELS, J. G.; FAN, W.; LI, P.P.; NGUYEN, M. T.; OLEFSKY, J. M. Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. **J. Biol. Chem.**, v. 45, p. 31223-31235, 2009.

PAULMYER-LACROIX, O.; BOULLU, S.; OLIVER, C.; ALESSI, M. C.; GRINO, M. Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxy-steroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 2701–2705, 2002.

PECKETT, A. J; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, v. 11, p. 1500-1510, 2011.

PEDERSEN, S. B.; JONLER, M.; RICHELSEN, B. Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, p. 1354–1359, 1994.

PRATT, W. B. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 217, p. 420–434, 1998.

RABER, J. Detrimental effects of chronic hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. **Mol. Neurobiol.**, v. 1, p. 1–22, 1998.

RAFACHO, A.; GIOZZET, V. A. G.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 3, p. 284-293, 2008.

RASK, E.; WALKER, B. R.; SODERBERG, S.; LIVINGSTONE, D. E.; ELIASSON, M.; JOHNSON, O.; ANDREW, R.; OLSSON, T. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 87, p. 3330–3336, 2002.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; BRONNEGARD, M.; NILSSON, A.; ELDH, J.; GUSTAFSSON, J. A.; BJÖRNTORP, P. Steroid hormone receptors in human adipose tissues. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 5, p. 1215–1219, 1990.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; KROTKIEWSKI, M.; ELFVERSON, J.; BJÖRNTORP, P. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome, **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 67, p. 1122–1128, 1988.

REILY, M. M.; PANTOJA, C.; HU, X.; CHINENOV, Y.; ROGATSKY, I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. **EMBO J.**, v. 25, p. 108–117, 2006.

ROCKALL, A. G.; SOHAIB, S. A.; EVANS, D.; KALTSAS, G.; ISIDORI, A. M.; MONSON, J. P.; BESSER, G. M.; GROSSMAN, A. B.; REZNEK, R. H. Computed tomography assessment of fat distribution in male and female patients with Cushing's syndrome. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 149, p. 561–567, 2003.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J Biol Chem.**, v. 239, p. 375-80, 1964.

ROSMOND, R.; DALLMAN, M. F.; BJÖRNTORP, P. Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 1853–1859, 1998.

SCHORR, M.; LAWSON, E. A.; DICHTER, L. E.; KLIBANSKI, A.; MILLER, K. K. Cortisol Measures Across the Weight Spectrum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 100, n. 9, p. 3313-3321, 2015.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTER, D. JR.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.
SECKL, J. R.; WALKER, B. R. Minireview: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 - a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. **Endocrinology**, v. 4, p. 1371-1376, 2001.

SEVERINO, C.; BRIZZI, P.; SOLINAS, A.; SECCHI, G.; MAIOLI, M.; TONOLO, G. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 2, p. E367-E373, 2002.

SLAVIN, B. G.; ONG, J. M.; KERN, P. A. Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 1535–1541. 1994.

SPIES, C. M.; SCHAUMANN, D. H.; BERKI, T.; MAYER, K.; JAKSTADT, M.; HUSCHER, D.; WUNDER, C.; BURMESTER, G. R.; RADBRUCH, A.; LAUSTER, R.; SCHEFFOLD, A.; BUTTGEREIT, F. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 65, p. 1139–1146, 2006.

STAHN, C.; LÖWENBERG, M.; HOMMES, D. W.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 275, p. 71-78, 2007.

STRAIN, G. W.; ZUMOFF, B.; KREAM, J.; STRAIN, J. J.; LEVIN, J.; FUKUSHIMA, D. Sex difference in the influence of obesity on the 24 hr mean plasma concentration of cortisol. **Metabolism**, v. 31, p. 209–212, 1982.

STRAWFORD, A.; ANTELO, F.; CHRISTIANSEN, M.; HELLERSTEIN, M. K. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H₂O. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 4, p. E577-588, 2004.

SZEMEREDI, K., ZUKOWSKA-GROJEC, Z., BAGDY, G., FEKETE, M. I., KOPIN, I. J. Opposite effects of chronic cortisol treatment on pre- and postsynaptic actions of clonidine in pithed rats. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 35-43, 1989.

SZEMEREDI, K.; BAGDY, G.; STULL, R.; CALOGERO, A. E.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D.S. Sympathoadrenomedullary inhibition by chronic glucocorticoid treatment in conscious rats. **Endocrinology**, v. 5, p. 2585-2590, 1988.

TANKO, L. B.; BRUUN, J. M.; ALEXANDERSEN, P.; BAGGER, Y. Z.; RICHELSEN, B.; CHRISTIANSEN, C.; LARSEN, P. J. Novel associations between bioavailable estradiol and adipokines in elderly women with different phenotypes of obesity: implications for atherogenesis. **Circulation**, v. 110, n. 15, p. 2246-2252, 2004.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 19, p. 371–379, 2008.

VAGUE, J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1956.

VEILLEUX, A.; LABERGE, P. Y.; MORENCY, J.; NOËL, S.; LUU-THE, V.; TCHERNOF A. Expression of genes related to glucocorticoid action in human subcutaneous and omental adipose tissue. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 1-3, p. 28-34, 2010.

VILLENA, J. A.; ROY, S.; SARKADI-NAGY, E.; KIM, K. H.; SUL, H. S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 47066–47075, 2004.

VOLPE, J. J.; MARASA, J. C. Hormonal regulation of fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthesis in mammalian adipose tissue and liver. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 380, n. 3, p. 454-472, 1975.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WAJCHENBERG, B. L.; BOSCO, A.; MARONE, M. M.; LEVIN, S.; ROCHA, M.; LERÁRIO, A. C.; NERY, M.; GOLDMAN, J.; LIBERMAN, B. Estimation of body fat and lean tissue distribution by dual energy X-ray absorptiometry and abdominal body fat evaluation by computed tomography in Cushing's disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, n. 9, p. 2791-2794, 1995.

WAKE, D. J.; RASK, E.; LIVINGSTONE, D. E.; SODERBERG, S.; OLSSON, T.; WALKER, B. R. Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 3983–3988, 2003.

WANG, X.; MAGKOS, F.; PATTERSON, B. W.; REEDS, D. N.; KAMPELMAN, J.; MITTENDORFER, B. Low-dose dexamethasone administration for 3 weeks favorably affects plasma HDL concentration and composition but does not affect very low-density lipoprotein kinetics. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 167, n. 2, p. 217-23, 2012.

WANG, Y.; JONES VOY, B.; URS, S.; KIM, S.; SOLTANI-BEJNOOD, M.; QUIGLEY, N.; HEO, Y. R.; STANDRIDGE, M.; ANDERSEN, B.; DHAR, M.; JOSHI, R.; WORTMAN, P.; TAYLOR, J. W.; CHUN, J.; LEUZE, M.; CLAYCOMBE, K.; SAXTON, A. M.; MOUSTAID-MOUSSA, N. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. **J. Nutr.**, v. 134, n. 5, p. 1032-1038, 2004.

WIKSTROM, A. C. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. **J. Endocrinol.**, v. 178, p. 331–337, 2003.

WILLIAMS, M. J.; HUNTER, G. R.; KEKES-SZABO, T.; TREUTH, M. S.; SNYDER, S.; BERLAND, L.; BLAUDEAU, T. Intra-abdominal adipose tissue cutpoints related to elevated cardiovascular risk in women. **Int. J. Obes.**, v. 20, p. 613–617, 1996.

ZECHNER, R.; STRAUSS, J.; FRANK, S.; WAGNER, E.; HOFMANN, W.; KRATKY, D.; HIDDEN, M.; LEVAK-FRANK, S. The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 4, p. S53-56, 2000.