PATRICIA CHIMIN

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DIFERENCIAIS DE DISTINTOS TERRITÓRIOS ADIPOSOS EM RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO PROLONGADO, CONTÍNUO E EXCESSIVO COM GLICOCORTICOIDES: UM MODELO DE SÍNDROME DE CUSHING IATROGÊNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

PATRICIA CHIMIN

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DIFERENCIAIS DE DISTINTOS TERRITÓRIOS ADIPOSOS EM RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO PROLONGADO, CONTÍNUO E EXCESSIVO COM GLICOCORTICOIDES: UM MODELO DE SÍNDROME DE CUSHING IATROGÊNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Chimin, Patricia.
Carcterísticas metabólicas diferenciais de distintos territórios adiposos em ratos submetidos a tratamento prolongado, contínuo e excessivo com glicocorticoides: um modelo de Síndrome de Cushing iatrogênica / Patricia Chimin. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Bessa Lima.

Tese (Doutorado) – 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: Differential metabolic characteristics of distinct fat territories in rats submitted to a prolonged, continuous and excessive glucocorticoid treatment: a model for iatrogenic Cushing's Syndrome.

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

ICB/SBIB08/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patricia Chimin.

Título da Tese: Carcterísticas metabólicas diferenciais de distintos territórios adiposos em ratos submetidos a tratamento prolongado, contínuo e excessivo com glicocorticoides: um modelo de Síndrome de Cushing iatrogênica.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **010** nas fls. **82** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Fabio Bessa Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Resposta lipogênica dos diferentes coxins adiposos sob condição normal e em excesso de glicocorticóide** do qual participou(aram) o(s) alunos **Patrícia Chimin, Ariclécio Cunha de Oliveira, Amanda Baron Campaña, Rogério Antonio Laurato Sertié, Francisco Leonardo Torres Leal, Andressa Bolsoni Lopes, Arnaldo Henrique de Souza, André Ricardo Gomes de Proença, Natalie Carolina de Castro, Talita da Silva Mendes de Farias,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **11.03.2010,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de março de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais (Maria de Lourdes e José Carlos) que sempre estiveram ao meu lado, e me apoiaram em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa etapa concluída e por sempre trilhar meu caminho!

Agradeço também aos meus pais José Carlos e Maria de Lourdes, e meus irmãos Robson e Caio por todo o apoio e carinho; ao meu namorado por estar ao meu lado em todos os momentos (sejam eles bons ou não tão bons) e toda sua família que também sempre me trataram como uma filha.

À FAPESP (proc. 09/54058-4) e ao CNPq (proc. 476178/2010-3) pelo auxílio financeiro concedido no formato de bolsa de estudo e financiamento ao projeto;

Ao professor Fábio Bessa Lima pela orientação e pela confiança no desenvolvimento do projeto;

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, do Departamento de Fisiologia e Biofísica e da Biblioteca que sempre estavam dispostos a ajudar;

Aos companheiros de laboratório, os quais a ajuda para a confecção desse trabalho foi fundamental;

Aos docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica, com os quais tive a oportunidade de trabalhar;

Aos amigos e que fiz durante todo o período do doutorado;

Ao Curso de Verão “Praticando e Discutindo Fisiologia” do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela experiência docente, de organização e de vida que obtive.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

Chimin P. Carcterísticas metabólicas diferenciais de distintos territórios adiposos em ratos submetidos a tratamento prolongado, contínuo e excessivo com glicocorticoides: um modelo de síndrome de Cushing iatrogênica. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar um quadro experimental que apresenta excesso de glicocorticoides e verificar o efeito desse excesso de glicocorticoides sobre o metabolismo dos carboidratos no tecido adiposo branco. Vinte ratos Wistar foram usados, e após a aclimatação ao biotério, foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (CON – receberam salina 0,9%) e dexametasona (DEX – receberam 0,25 mg/kg/d de dexametasona). Ao completarem 10 semanas, microbomba osmótica foi inserida entre as escápulas dos animais, e o tratamento foi liberado ao longo de 4 semanas. Ao final do período experimental, os animais foram sacrificados, e sangue do tronco, glândulas adrenais, músculo sóleo, além das gorduras subcutânea (SC), periepididimal (PE), retroperitoneal (RP) e mesentérica (MS) foram retirados e armazenados para análise. Adipócitos foram isolados e submetidos a ensaios biológicos (oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$, incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis, em ácidos graxos de triacilgliceróis e em glicerol de triacilgliceróis). Os resultados mostraram que o tratamento foi capaz de bloquear o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, como verificado pela menor concentração de corticosterona plasmática (CON = 337,4 ± 15,2 ng/ml; DEX = 140,5 ± 10,1 ng/ml, $P < 0,05$) e atrofia das glândulas adrenais, tanto direita (CON = 0,0264 ± 0,0015 g; DEX = 0,0213 ± 0,0011 g, $P < 0,05$), quanto esquerda (CON = 0,0284 ± 0,0011 g; DEX = 0,0229 ± 0,0010 g, $P < 0,05$) no grupo DEX. Além disso, os animais tratados com dexametasona apresentaram resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e aumento nas concentrações de leptina e adiponectina. Esses animais também apresentaram adipócitos maiores (SC - CON = 42,9 ± 2,1 µm; DEX = 45,5 ± 2,0 µm; RP - CON = 49,4 ± 2,3 µm; DEX = 54,4 ± 3,9 µm; e MS - CON = 36,2 ± 3,3 µm; CS = 40,8 ± 2,6 µm; $P < 0,05$) que, juntamente com a análise de celularidade, demonstraram estar hipertrofiados. Em relação ao acúmulo de gordura, o grupo DEX apresentou maior lipogênese nos coxins RP e MS, sendo que houve maior incorporação de glicose na porção ácido graxo dos triacilgliceróis. Corroborando essa maior síntese *de novo* de ácidos graxos, a atividade máxima das enzimas envolvidas nessa via, como ácido graxo sintase; e das enzimas responsáveis pela formação de cofatores reduzidos, glicose-6-fosfato desidrogenase e enzima málica, também foram maiores no grupo DEX, principalmente no coxim MS. Essa maior resposta também foi refletida na expressão gênica dessas enzimas. Esses resultados mostram que diversos aspectos da indução iatrogênica de síndrome de Cushing em ratos foram obtidos, e que uma possível explicação para esse maior acúmulo na região visceral pode ser a maior atividade e expressão de enzimas envolvidas na formação de NADPH, ao invés da atividade de enzimas envolvidas mais diretamente na via de síntese propriamente dita.

Palavras-chave: Lipogenese. Glicocorticoides. Tecido adiposo.

ABSTRACT

Chimin P. Differential metabolic characteristics of distinct fat territories in rats submitted to a prolonged, continuous and excessive glucocorticoid treatment: a model for iatrogenic Cushing's syndrome. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The aim of the present study was to characterize an experimental condition of glucocorticoid excess and to verify the effect of this glucocorticoid excess in carbohydrate metabolism in white adipose tissue. Twenty male Wistar rats were used, and after acclimatization to vivarium conditions, they were divided at random into two groups: control (CON – received saline 0.9%) and dexamethasone (DEX – received 0.25 mg/kg/d dexamethasone). After complete 10 weeks old, an osmotic micro pump was inserted in the subcutaneous dorsal interescapular region, and the treatment was derived for 4 weeks. At the end of experimental period, animals were sacrificed, and trunk blood, adrenal glands, soleus muscle, and also subcutaneous (SC), periepididymal (PE), retroperitoneal (RP) and mesenteric (MS) fat pads were excised and stored for further analysis. Also, adipocytes were isolated and submitted to *in vitro* tests (oxidation of D-[U-^{14}C]-glucose into $^{14}CO_2$, incorporation of D-[U-^{14}C]-glucose into triacylglycerol, incorporation of D-[U-^{14}C]-glucose into fatty acids of triacylglycerol and incorporation of D-[U-^{14}C]-glucose into glycerol of triacylglycerol). The results showed that the treatment was able to block hypothalamic-pituitary-adrenal axis, as verified by lower corticosterone plasma levels (CON = 337.4 ± 15.2 ng/ml; DEX = 140.5 ± 10.1 ng/ml, $P < 0.05$) and adrenal gland atrophy, in both right (CON = 0.0264 ± 0.0015 g; DEX = 0.0213 ± 0.0011 g, $P < 0,05$), and left glands (CON = 0.0284 ± 0.0011 g; DEX = 0.0229 ± 0.0010 g, $P < 0.05$) in DEX group. Furthermore, animals treated with dexamethasone presented insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia and increased leptin and adiponectin levels. These animals also presented increased adipocytes diameters (SC - CON = 42.9 ± 2.1 µm; DEX = 45.5 ± 2.0 µm; RP - CON = 49.4 ± 2.3 µm; DEX = 54.4 ± 3.9 µm; and MS - CON = 36.2 ± 3.3 µm; CS = 40.8 ± 2.6 µm; $P < 0.05$), that together with cellularity analysis, demonstrated that these adipocytes were hypertrophied. In relation to lipid accumulation, DEX group presented increased lipogenesis in RP and MS fat pads, with increased incorporation into fatty acids of triacylglycerol. According to this increased fatty acids *de novo* synthesis, the maximal activity of enzymes involved in this pathway, like fatty acid synthase; and of enzymes that supply NAPDH for lipogenesis, glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme, were also increased in DEX group, especially in MS fat pad. This increased response was also reflected in the gene expression of these enzymes. These data show that certain aspects of the induction of iatrogenic Cushing's syndrome were obtained, and that a possible explanation for this increased lipid accumulation in visceral depots can be due to increased activity and gene expression of enzymes that supply NADPH, required for lipogenesis, instead of the increase in enzymes that participate in lipogenesis itself.

Keywords: Lipogenesis. Glucocortioids. Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns dos produtos secretados pelos adipócitos..... 21

Figura 2 - Representação das vias lipogênicas no adipócito..... 25

Figura 3 - Esquema simplificado da ação dos glicocorticoides..... 30

Figura 4 - Características da síndrome de Cushing..... 32

Figura 5 - Teste de liberação da microbomba osmótica..... 40

Figura 6 - Eletroforese em gel para verificar a integridade do RNA total extraído..... 50

Figura 7 - Evolução do peso corporal dos animais ao longo das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 54

Figura 8 - Ingestão alimentar (A) e ingestão hídrica (B) ao longo das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 55

Figura 9 - A – Teste de Tolerância à Glicose oral (oGTT) (n=10); *inset*: valores de área sob a curva. **B** – Teste de Tolerância à Insulina intravenosa (ivITT) (n=5); *inset*: valores de Kitt..... 56

Figura 10- A – Curva de oGTT e área sob a curva do tempo 0 a 15 minutos (n = 10); **B –** Curva de oGTT e área sob a curva do tempo 15 a 90 minutos (n = 10)..... 57

Figura 11 - Valores de insulina plasmática ao longo do teste de oGTT (n=10); *inset*: valores de área sob a curva..... 58

Figura 12 - Peso e representação das adrenais direita e esquerda após 4 semanas de tratamento (n=10)..... 59

Figura 13 - A – Peso total dos coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento. **B** – Peso dos coxins adiposos relativo ao peso corporal dos animais (n=10)..... 61

Figura 14 - Volume dos adipócitos dos diferentes coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 61

Figura 15 - Celularidade dos diferentes coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 62

Figura 16 - Representação do tamanho dos adipócitos dos diferentes coxins nos grupos..... 63

Figura 17 - Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 64

Figura 18 - Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n=10)..... 65

Figura 19 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 66

Figura 20 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n=10)..... 67

Figura 21 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 68

Figura 22 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n=10)..... 69

Figura 23 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n=10)..... 70

Figura 24 - A incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em glicerol de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n=10)..... 71

Figura 25 - Atividade enzimática máxima no tecido subcutâneo (n=10)..... 72

Figura 26 - Atividade enzimática máxima no tecido periepididimal (n=10)..... 72

Figura 27 - Atividade enzimática máxima no tecido retroperitoneal (n=10)..... 73

Figura 28 - Atividade enzimática máxima no tecido mesentérico (n=10)..... 73

Figura 29 - Expressão gênica das enzimas lipogênicas nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n=6)..... 74

Figura 30 - Expressão gênica das enzimas G6PDH e Málica nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n=6)..... 75

Figura 31 - Expressão gênica da enzima 11β-HSD1 nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n=6)..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de kits inventariados (Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x)..... 51

Tabela 2 - Efeito de 4 semanas de tratamento com dexametasona sobre os níveis de glicose plasmática, perfil lipídico e hormônios séricos (n=10)..... 60

LISTA DE SIGLAS

11β-HSD1 - 11 β-hidroxiesteroide tipo 1

ACC - acetil-CoA carboxilase

ACS - acil-CoA sintase

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

AG - ácidos graxos

AMPK - proteína quinase ativada por AMP

CON - controle

DEX - dexametasona

DGAT - diacilglicerol-fosfato aciltransferase

FAS - ácido graxo sintase

G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase

GPAT - glicerol-fosfato aciltransferase

HDL-c - lipoproteína de alta densidade

ivITT - teste de tolerância à insulina intravenosa

LDL-c - lipoproteína de baixa densidade

LPL - lipase de lipoproteína

ME - enzima málica

MGAT - monoacilglicerol aciltransferase

MS - mesentérico

oGTT - teste de tolerância à glicose oral

PAP - fosfatase de ácido fosfatídico

PE - periepididimal

RP - retroperitoneal

SC - subcutâneo

TAB - tecido adiposo branco

TAG - triacilgliceróis

VLDL-c - lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 20
2.1 Tecido Adiposo Branco..... 20
2.2 Lipogênese..... 21
2.3 Síntese *de novo* de ácidos graxos..... 23
2.4 Distribuição do TAB..... 25
2.5 Glicocorticoides..... 27
2.6 Excesso de glicocorticoides..... 31
3 JUSTIFICATIVA..... 35
4 OBJETIVOS..... 36
4.1 Objetivo geral..... 36
4.2 Objetivos específicos..... 36
5 MATERIAL E MÉTODOS..... 37
5.1 Animais..... 37
5.2 Padronização do grupo experimental..... 37
5.2.1 Estudo Piloto 1..... 37
5.2.2 Estudo Piloto 2..... 38
5.2.3 Teste da microbomba osmótica..... 39
5.3 Procedimentos experimentais..... 40
5.4 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)..... 41
5.5 Teste de tolerância à insulina intravenosa (ivITT)..... 41
5.6 Experimentos *in vivo*..... 42
5.6.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica..... 42
5.6.2 Cálculo indireto da celularidade..... 44
5.6.3 Oxidação de D-[U-^{14}C]-glucose até $^{14}CO_2$ e teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis em adipócitos isolados..... 44
5.6.4 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis..... 45
5.6.5 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis..... 45
5.7 Determinações bioquímicas e hormonais..... 46

5.7.1 Determinação de glicose..... 46
5.7.2 Determinação de triglicérides..... 46
5.7.3 Determinação de colesterol total e suas frações (HDL-c, LDL-c e VLDL-c)..... 46
5.7.4 Determinação de insulina, leptina, adiponectina e corticosterona..... 47
5.8 Análises enzimáticas..... 47
5.8.1 Preparo das amostras para atividade de enzimas lipogênicas..... 47
5.8.2 Atividade máxima da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)..... 48
5.8.3 Atividade máxima da enzima ácido graxo sintase (FAS)..... 48
5.8.4 Atividade máxima da enzima málica (EM)..... 48
5.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo – qPCR..... 49
5.9.1 Extração de RNA total..... 49
5.9.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa..... 50
5.9.3 PCR quantitativo (real time)..... 50
5.9.4 Quantificação relativa – Método de C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)..... 52
5.9.5 Seleção de controladores endógenos (housekeeping)..... 52
5.10 Tratamento estatístico dos dados..... 52
6 RESULTADOS..... 54
6.1 Peso corporal..... 54
6.2 Ingestão alimentar e hídrica..... 54
6.3 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT) e teste de tolerância à insulina intravenosa (ivITT)..... 55
6.4 Características corporais..... 58
6.5 Determinações bioquímicas..... 59
6.6 Coxins adiposos..... 60
6.7 Testes biológicos..... 63
6.7.1 Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$..... 63
6.7.2 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis..... 65
6.7.3 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis..... 67
6.7.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis..... 69

6.8 Análises enzimáticas..... 71
6.9 q-PCR..... 73
7 DISCUSSÃO..... 77
7.1 Caracterização do modelo experimental..... 77
7.2 Respostas fisiológicas frente ao excesso de glicocorticoides..... 83
8 CONCLUSÕES..... 88
REFERÊNCIAS..... 90

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o tecido adiposo passou de um simples tecido “coadjuvante” para um órgão endócrino, com papel importante em várias funções do metabolismo. Sua função no controle da homeostase corporal é creditada, entre outras coisas, pela ampla capacidade de aumentar seu volume, dessa forma, aumentando a quantidade de triacilgliceróis (TAG) que podem ser armazenados sem que haja prejuízos para o tecido.

Por outro lado, essa mesma característica que o torna ímpar entre os órgãos corporais, também causa efeitos sistêmicos deletérios, dependendo do local onde esse acúmulo ocorre. Indivíduos que apresentam acúmulo de gordura na região mais central do corpo, chamado de gordura visceral, apresentam maior risco de desenvolverem complicações cardiovasculares, além de outras doenças associadas; enquanto que o acúmulo de gordura na região mais periférica, chamada de subcutânea, apresentam um risco menor de desenvolver essas doenças.

Além da genética, fatores hormonais também podem levar a um maior acúmulo de gordura corporal. Dentre os vários hormônios que atuam sobre o tecido adiposo, podemos citar os glicocorticoides. Os glicocorticoides são hormônios esteroides secretados pelo córtex da adrenal, e em condições de estresse, promovem, entre outros efeitos, “quebra” dos TAG liberando ácidos graxos (AG) e glicerol na circulação.

Apesar desse papel lipolítico já estabelecido, quando esse hormônio está presente em excesso, como no caso da síndrome de Cushing, ele promove acúmulo de gordura, principalmente na região central do corpo (gorduras viscerais), enquanto diminui a quantidade de gordura nas extremidades (gordura subcutânea). Além do acúmulo de gordura, na síndrome de Cushing os glicocorticoides promovem efeitos deletérios agindo sobre outros órgãos e tecidos corporais, como ossos, tecido conjuntivo, músculo, fígado, entre outros.

Ainda não se sabe ao certo como e por que os glicocorticoides causam esse efeito tão particular sobre o tecido adiposo. O que já está estabelecido é que os glicocorticoides, de alguma forma, alteram a atividade de enzimas que atuam na via lipogênica, mas até agora não há resultados conclusivos demonstrando por que e

como esse acúmulo diferenciado de gordura ocorre quando esse hormônio está presente em excesso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Adiposo Branco

Os mamíferos são capazes de estocar o excesso de energia consumida e não requisitada, como lipídeos (TAG) e carboidratos (glicogênio). Os TAG formam a reserva mais eficiente de energia com teor calórico mais de duas vezes superior por grama em comparação com carboidratos (glicogênio) ou proteínas e com menor conteúdo de água (Hillgartner et al., 1995).

Os adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) armazenam TAG em uma gota lipídica predominante, e gotículas menores, que ocupam o centro da célula, representando cerca de 85-90% da massa da célula, e desloca o citoplasma, núcleo e outras organelas para a periferia celular. Eles podem variar em tamanho, podendo alterar seu diâmetro em até 20 vezes e seu volume em centenas a milhares de vezes. Além de adipócitos, o TAB possui uma matriz conjuntiva (colágeno e fibras reticulares), fibras nervosas, estroma vascular, nodos linfáticos, células do sistema imunológico (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células-tronco com potencial de se diferenciarem em adipócitos) (Ahima, Flier, 2000).

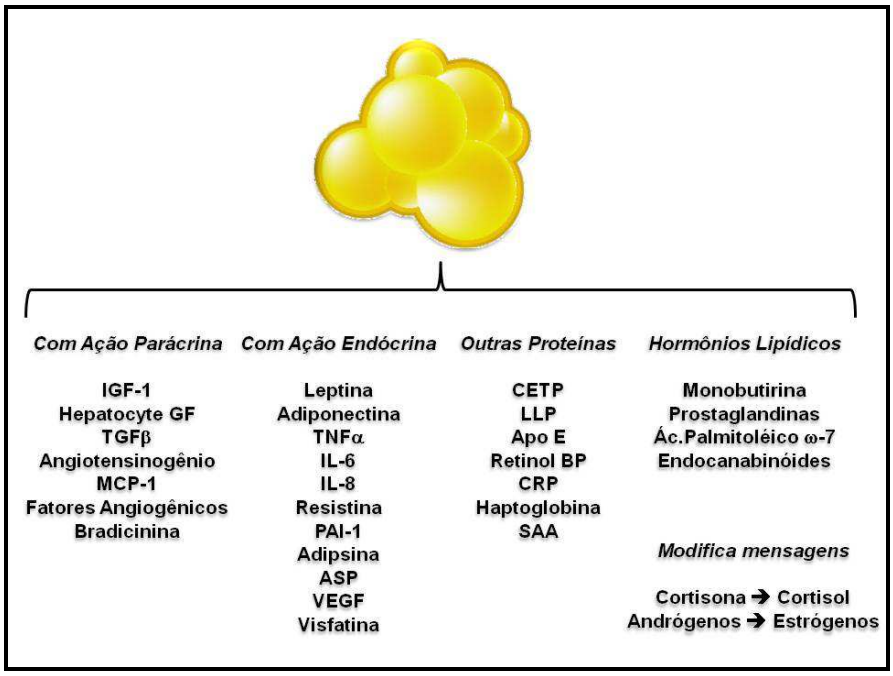
Os adipócitos possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar AG e estocar TAG durante períodos de abundância de suplemento energético e para mobilizá-los quando há déficit calórico. Nesses processos, o sistema nervoso central tem papel na regulação, via atividade neural direta, através da divisão simpática do sistema nervoso autônomo regulando a lipólise e a lipogênese (Kreier et al., 2002; Pénicaud et al., 2000).

Por um longo tempo, o adipócito foi considerado uma célula, com funções limitadas, ou seja, era considerado somente uma barreira lipídica altamente expansível capaz de garantir o estoque e a mobilização de TAG. Mais recentemente, o adipócito ganhou o *status* de uma célula endócrina com a descoberta da capacidade de produção e secreção regulada de vários produtos (ex. citocinas e outras proteínas) que estão envolvidas em ações autócrinas, parácrinas e endócrinas (Ahima, Flier, 2000; Fonseca-Alaniz et al., 2007; Trayhurn, Beattie, 2001).

Os variados produtos secretados pelo TAB, chamados adipocinas, desempenham um papel importante na homeostasia energética, modificando a

sensibilidade à insulina e a resposta imunológica e alterando o curso da doença cardiovascular (Fantuzzi, 2005; Trayhurn, Wood, 2005). Um resumo das proteínas sintetizadas e liberadas pelos adipócitos encontra-se na figura 1.

Figura 1 – Alguns dos produtos secretados pelos adipócitos.



IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina; hepatocyte GF – fator de crescimento do hepatócito; TGFβ – fator de crescimento tumoral β; MCP-1 – proteína quimiotática de monócito 1; TNFα – fator de necrose tumoral α; IL-6 – interleucina 6; IL-8 – interleucina 8; PAI-1 – inibidor do ativador do plasminogênio-1; ASP – proteína estimuladora de ascilação; VEGF – fator de crescimento vascular endotelial; CETP – proteína de transferência do éster de colesterol; LLP – lipase lipoproteica; ApoE – apolipoproteína E; CRP – proteína C reativa; SAA – amilase sérica A.

2.2 Lipogênese

A lipogênese é a síntese de AGs esterificados que formam os TAG. O acúmulo de lipídeos no TAB depende da captação dos AGs circulantes provenientes da hidrólise enzimática do TAG que estão contidos nos quilomícrons e nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), realizada pela lipase de lipoproteínas (LPL) extracelular. Adicionalmente também há a síntese *de novo* de AG (também chamada de lipogênese *de novo*), que reflete a síntese de AGs a partir de substratos não lipídicos. O processo de síntese *de novo* de AG será abordado com mais detalhe no próximo tópico.

Após os AGs entrarem nos adipócitos, a esterificação é necessária para estocá-los em forma de TAG (Zechner et al., 2000). Para isso, algumas enzimas estão envolvidas, como por exemplo, a acil-CoA sintase (ACS), a glicerol-fosfato aciltransferase (GPAT), a monoacilglicerol-fosfato aciltransferase (MGAT), a fosfatase de ácido fosfatídico (PAP) e a diacilglicerol-fosfato aciltransferase (DGAT).

Outras enzimas, como a AG sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e enzima málica (ME) são importantes para a síntese local de AGs a partir de acetil-CoA (Hellerstein, 1999).

A lipogênese é altamente influenciada por fatores como a dieta e o jejum. A quantidade e a composição da dieta também influenciam o processo de lipogênese, sendo que dietas ricas em carboidratos a estimulam (tanto no fígado quanto no tecido adiposo), enquanto que dietas ricas em gorduras reduzem a síntese *de novo* de AG e o jejum reduz e a lipogênese no tecido adiposo (Wong, Sul, 2010). Essas alterações são relacionadas, entre outros, com o aumento (dietas ricas em carboidratos) e diminuição (jejum e dietas ricas em gorduras) da expressão e atividade da enzima LPL (Voshol et al., 2009).

Palou et al. (2010) identificaram o padrão de expressão gênica de enzimas lipogênicas (LPL, ACC, FAS e GPAT) em resposta a diferentes períodos de jejum (4, 8 e 24 horas) e após realimentação (8 horas de jejum e realimentação por 3 horas). Os autores verificaram que a expressão gênica das enzimas lipogênicas diminuiu logo após o período de jejum, sendo que o depósito retroperitoneal o que apresentou resposta mais rápida. Mesmo após 3 horas de realimentação, a expressão gênica dessas enzimas não retornou aos níveis “normais”, sendo que a enzima FAS foi estatisticamente menor quando comparado com o valor de jejum de 8 horas nas gorduras subcutânea e retroperitoneal; além da enzima LPL também ter sido menor na gordura mesentérica.

Estudos adicionais mostram diferença na resposta lipogênica em adipócitos de indivíduos magros e obesos. Swierczynski et al. (2003) compararam a atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase em adipócitos obtidos da região subcutânea de indivíduos obesos e magros. Eles encontraram que a atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (que catalisa a formação do esqueleto de carbono do glicerol a partir da di-hidroxiacetona-fosfato), que formam os TAG, foi aproximadamente 2x maior em adipócitos de indivíduos obesos. Também

verificaram uma correlação inversa entre a atividade das enzimas FAS e ATP-citrato liase (ACL) e o índice de massa corporal. Semelhantemente, Ortega et al. (2009) verificaram que indivíduos obesos apresentam reduzida expressão gênica das principais enzimas da via de síntese *de novo* de AG (representadas pela FAS e ACC) no tecido adiposo visceral, sugerindo que este processo metabólico, pelo menos ao nível da expressão gênica, é menos responsiva na obesidade.

2.3 Síntese *de novo* de ácidos graxos

Síntese *de novo* de AG é a que se dá a partir de substratos não lipídicos, principalmente carboidratos. Ela pode ocorrer tanto no fígado quanto no tecido adiposo, e a sua importância e a respectiva contribuição do fígado e do tecido adiposo varia entre espécies (Lau et al., 2005). Estudos indicam que ela é menos ativa no tecido adiposo de humanos quando comparado com o fígado por grama de tecido (Aarsland et al., 1997; Diraison et al., 2002). Além disso, há controvérsia em relação à capacidade lipogênica entre ratos e humanos, sendo que, de acordo com Letexier et al. (2003), essa via é mais ativa em ratos. Já outros autores apontam que a diferença na capacidade lipogênica entre ratos e humanos se dá pela composição da dieta consumida, isto é, quando a composição da dieta é similar entre humanos e ratos, essa diferença desaparece (Swierczynski et al., 2000).

Os níveis de glicose sanguínea agem diretamente sobre a capacidade lipogênica estimulando a produção de acetil-CoA através da glicólise promovendo a síntese de AGs. Esse acetil-CoA formado é condensado com o oxaloacetato proveniente do ciclo de Krebs na mitocôndria formando citrato, que, quando em excesso, é transportado para o citosol e após uma série de reações acaba favorecendo a formação dos AGs (Haugen, Drevon, 2007). Também a glicose aumenta a síntese de enzimas lipogênicas por estimular alguns fatores de transcrição gênicos (SREBP, por exemplo) (Coleman, Lee, 2004). Finalmente, a glicose estimula a secreção de insulina e inibição da liberação de glucagon pelo pâncreas (promovendo a captação de mais glicose pelo músculo, fígado e tecido adiposo) (Girard et al., 1994). Esse último fator corrobora com o estudo de Assimacopoulos-Jeannet et al. (1995) que verificaram que a hiperinsulinemia favorece a lipogênese no TAB.

Nesse processo metabólico, as enzimas que fazem parte da glicólise podem ser incorporadas ao processo de lipogênese. Dessa forma, a enzima piruvato desidrogenase (localizada na mitocôndria, e responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA) fornece substrato (acetil-CoA) provindo da quebra da glicose para a formação de AG.

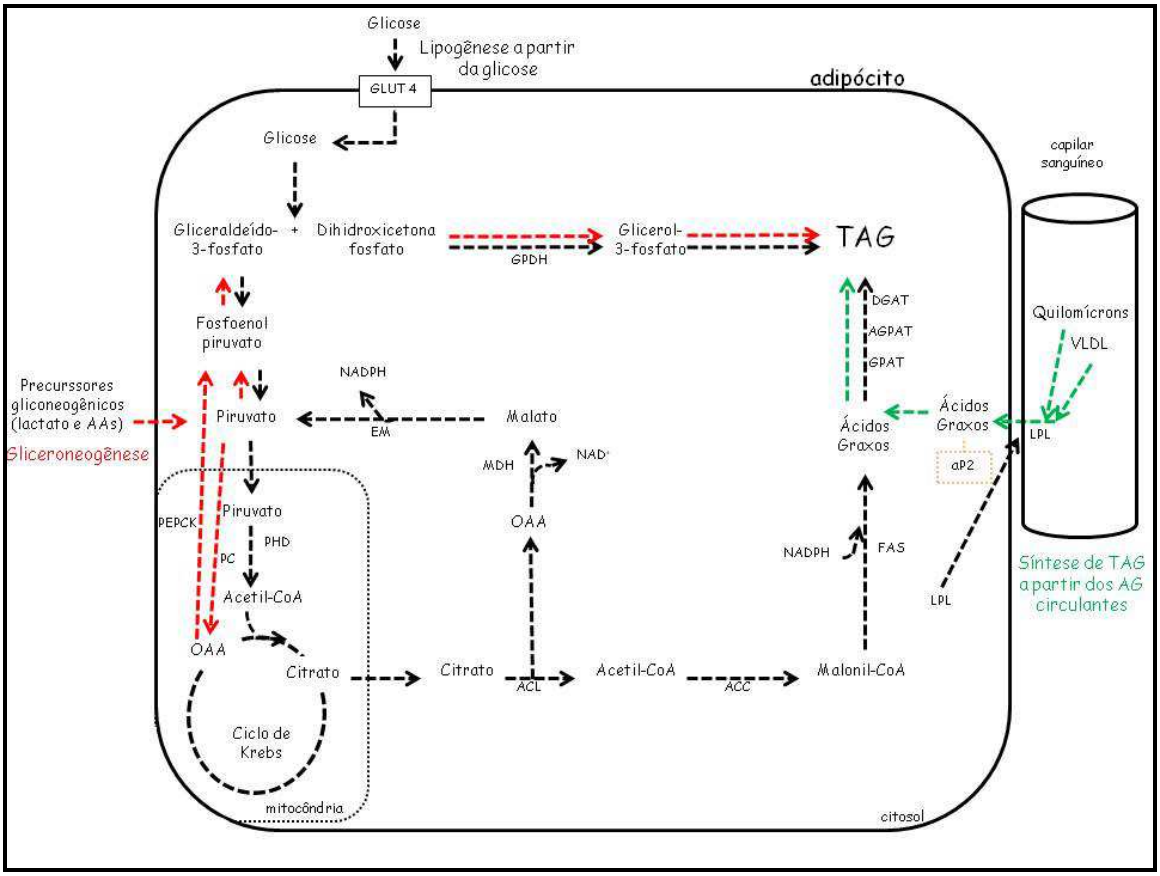
Ademais, o acetil-CoA reage com oxaloacetato na presença da enzima citrato sintase, formando citrato. Este é exportado da mitocôndria para o citosol, onde é clivado pela enzima ACL em acetil-CoA e oxaloacetato (Ballard, Hanson, 1967). O acetil-CoA é então carboxilado em malonil-CoA pela enzima ACC, enquanto que o oxaloacetato é reduzido pela enzima malato desidrogenase em malato. Sucessivas unidades de carbono são adicionadas a molécula de malonil-CoA por ação da enzima FAS, formando AGs que serão substratos para a formação de TAG. Essa última reação é estritamente dependente do cofator reduzido NADPH.

Esse NADPH necessário para a síntese de AGs pode ser sintetizado por duas vias no citoplasma. O mesmo oxaloacetato formado a partir a clivagem do citrato pode ser reduzido a malato pela enzima citosólica NAD-malato desidrogenase. O malato, por sua vez, sofre descarboxilação oxidativa a piruvato e CO_2, simultaneamente gerando NADPH a partir de $NADP^+$ em uma reação catalisada pela EM (Wise, Ball, 1964). O piruvato pode entrar novamente na mitocôndria, onde se combina com CO_2 para formar oxaloacetato (em uma reação catalisada pela enzima piruvato carboxilase), dessa forma, completando um ciclo.

O cofator também pode ser formado a partir da primeira reação da via das pentoses fosfato, que tem como principal função produzir NADPH e ribose-5-fosfato. Nessa via, a glicose-6-fosfato é oxidada pela enzima G6PDH, formando CO_2, NADPH e frutose.

Na figura 2 estão resumidas as vias lipogênicas.

Figura 2 – Representação das vias lipogênicas no adipócito.



Setas pretas: lipogênese a partir da glicose; setas vermelhas: gliceroneogênese; setas verdes: síntese de TAG a partir de AG circulantes. ACC – acetil-CoA carboxilase; ACL – ATP-citrato liase; AGPAT – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase; aP2 – proteína ligadora de ácidos graxos; DGAT – diacilglicerol aciltransferase; EM – enzima málica; FAS – ácido graxo sintase; GPAT – glicerol-3-fosfato aciltransferase; GPDH – glicerol fosfato desidrogenase; LPL – lipase de lipoproteína; MDH – malato desidrogenase; OAA – oxaloacetato; PC – piruvato carboxilase; PDH – piruvato desidrogenase; PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade.

2.4 Distribuição do TAB

O TAB está distribuído em diversos depósitos anatômicos. O tamanho desses depósitos é altamente variável, alcançando desde 5 a 60% do peso corporal total. O tecido adiposo subcutâneo estoca cerca de 80% de toda a gordura corporal, enquanto que a gordura visceral representa entre 10 a 20% da gordura corporal em homens e 5 a 10% da gordura corporal em mulheres (Smith et al., 2001).

A distribuição de gordura corporal parece ser influenciada pela idade, raça, condição metabólica e gênero (Lee et al., 2012). Em relação ao gênero, já se sabe que homens apresentam uma distribuição de gordura na parte mais central do corpo, classicamente classificada como obesidade androide; enquanto que mulheres

apresentam acúmulo de gordura mais na periferia do corpo, classificada como obesidade ginoide. Vários estudos têm demonstrado que a distribuição do tecido adiposo possui importância clínica, sendo que a adiposidade central, especialmente a obesidade visceral, é mais deletéria, e é correlacionada com risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares; enquanto que o acúmulo de gordura mais subcutâneo (periférico) pode ser protetor (Bjorntorp, 1991; Karastergious et al., 2012).

Diferenças regionais também são vistas na morfologia e na função do tecido adiposo. Os vários depósitos adiposos diferem, entre outras coisas, na histologia, características metabólicas e produtos secretados (Fonseca-Alaniz et al., 2007; Ibrahim, 2010). Um exemplo disso pode ser visto no trabalho de Palou et al. (2009) que verificaram que o tamanho dos adipócitos de ratos adultos era diferente dependendo do coxim adiposo estudado, sendo que adipócitos retroperitoneais eram maiores em comparação com os adipócitos mesentérico e subcutâneo. Outros autores também já verificaram essa diferença no tamanho dos adipócitos nos diferentes depósitos adiposos (Deveaud et al., 2004; Drolet et al., 2008).

A forma com que o tecido adiposo cresce também varia e é dependente do depósito. Esse crescimento de novos adipócitos pode ocorrer pela formação de novas células (hiperplasia), assim como pelo aumento do tamanho (hipertrofia) dos adipócitos já existentes. Esse processo pôde ser observado no estudo de Drolet et al. (2008), em que foi verificado que em mulheres obesas, a hiperplasia era predominante no depósito subcutâneo, enquanto que a hipertrofia era observada tanto no depósito subcutâneo quanto no omental. Essa diferença no crescimento nos diversos depósitos pode favorecer o acúmulo de gordura e o agravamento de condições patológicas (Weyer et al., 2000).

Respostas metabólicas também diferem em relação a localização corporal. Diversos pesquisadores já demonstraram que há diferença na resposta lipolítica entre os coxins, sendo que os depósitos subcutâneos tem uma menor atividade lipolítica quando comparado aos depósitos viscerais (Arner, 1995; Lafontan, Berlan, 2003). Essa diferença na resposta lipolítica pode ser devido a quantidade de receptores, não só beta adrenérgicos, mas também de vários outros hormônios.

Como indicado acima, a quantidade de receptores hormonais também varia de acordo com o depósito estudado. Wajchenberg et al. (2002) e Lafontan e Berlan

(2003) em suas revisões, relataram uma imensa quantidade de receptores hormonais presentes nos adipócitos, além de classificarem a quantidade relativa entre os depósitos subcutâneo e visceral. Dentre os hormônios que atuam sobre o tecido adiposo podemos citar a insulina (um dos principais), glucagon, hormônios sexuais (testosterona, androgênio, progesterona, prolactina), hormônio do crescimento, catecolaminas e glicocorticoides. Esse último em particular, possui efeitos ímpares sobre o tecido adiposo tanto quando na escassez, quanto em excesso.

2.5 Glicocorticoides

Os glicocorticoides endógenos são hormônios esteroides secretados pelo córtex adrenal sob influência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que constitui um componente integral de resposta ao estresse. Além do seu papel no crescimento e desenvolvimento, os glicocorticoides têm efeitos multi-sistêmicos que são essenciais para a sobrevivência em tempos de estresse, influenciando a pressão sanguínea, balanço hídrico, função imune e metabolismo energético celular (Macfarlane et al., 2009).

Há diferenças na quantidade, meia-vida e ritmo circadiano desses esteroides, com os picos ocorrendo no início do período de atividade espontânea. Em humanos, o glicocorticoide mais abundante é o cortisol, com uma meia-vida de 1-2 horas e pico de liberação no início da manhã (Van Cauter et al., 1996), enquanto que no rato, o esteroide mais abundante é a corticosterona, com meia-vida de 15-30 minutos e pico no início da noite (Mitsugi, Kimura, 1985).

O cortisol e a corticosterona são convertidos para sua forma ativa na presença da enzima 11β-hidroxiesteroide desidrogenase (11β-HSD) (Seckl, Walker, 2001). Essa enzima é co-localizada com os receptores de glicocorticoides, e está presente, além do córtex da adrenal, em vários outros tecidos corporais, como por exemplo, fígado, rim, tecido adiposo (tanto subcutâneo quanto mesentérico), entre outros. A 11β-HSD apresenta 2 isoformas, sendo uma redutase (11β-HSD tipo 1), que converte 11-desoxicortisona inativa em cortisol, e uma desidrogenase (11β-HSD tipo 2), que catalisa o processo inverso (Agarwal, 2003; Espínola-Antunes, Kater, 2007). As duas isoformas estão presentes em quantidades diferentes nos vários

tecidos, por exemplo, a 11β-HSD2 está presente em grandes concentrações no rim, onde inativa o cortisol e dessa forma “protege” os receptores de mineralocorticoides da ligação dos glicocorticoides. Já a isoforma 11β-HSD1 está presente em grandes concentrações no tecido adiposo, mais especificamente, no depósito visceral (Espínola-Antunes, Kater, 2007).

A atividade da enzima 11β-HSD1 é modulada pela presença de cofatores reduzidos, como por exemplo, o NADPH. Esse NADPH é produzido, entre outras, a partir da reação catalizada pela EM na via de síntese *de novo* de AG e pela G6PDH nas primeiras reações da via das pentoses fosfato (Agarwal, 2003).

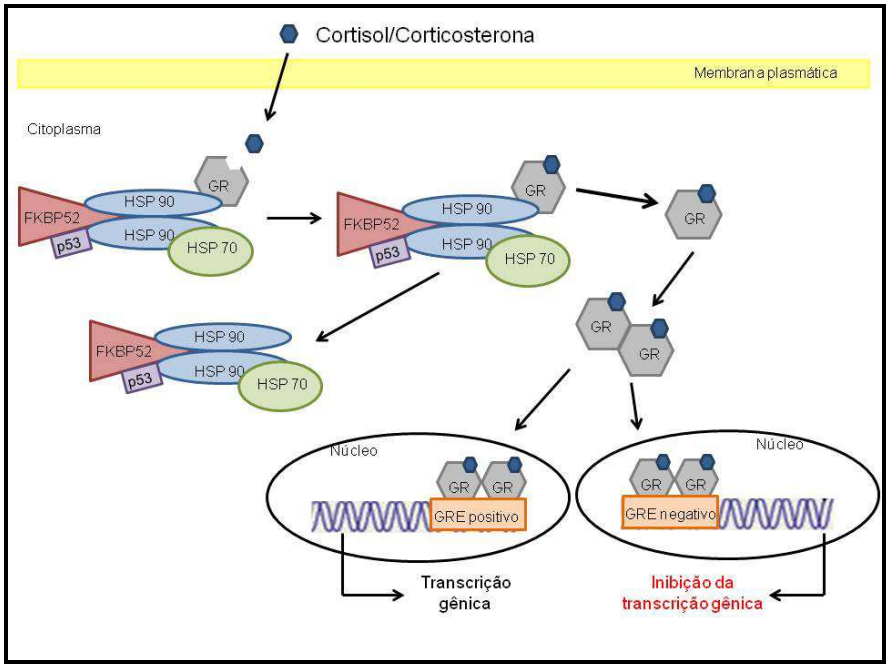
O cortisol e a corticosterona circulam no plasma sob duas formas, livre ou ligado a uma globulina ligadora de corticosteroide (que corresponde a 80% do total). Juntas essas formas correspondem ao nível total de cortisol e corticosterona. Quando ligada a globulina, o glicocorticoide não consegue transpor a membrana plasmática, o que restringe o acesso do glicocorticoide às células-alvo, e regulam sua biodisponibilidade e o *clearence* metabólico. Já foi mostrado que em ratos Zucker obesos, a capacidade de ligação da globulina ligadora de corticosteroide é menor em comparação aos ratos magros, sugerindo uma ação aumentada dos glicocorticoides no tecido adiposo de obesos (Grasa et al., 1998).

Por serem lipofílicos, os glicocorticoides conseguem atravessar a membrana plasmática quando estão no estado livre. Uma vez dentro da célula, eles promovem seus múltiplos efeitos através da ativação do receptor intracelular de glicocorticoide situado no citoplasma (Rose et al., 2010). O receptor de glicocorticoide é parte de uma grande família de fatores de transcrição ativada por ligante. O receptor de glicocorticoide é um complexo multimérico, consistindo em um receptor polipeptídeo, um complexo proteico formado por chaperonas *heat shock protein* 90 e 70 (HSP90 e HSP70), uma molécula de p23 e um domínio repetido tetratricopeptídeo (TRP). O dímero HSP90 liga-se diretamente ao domínio de ligação do receptor, sendo essa associação necessária para a ligação do hormônio, assim como para a translocação do receptor para o núcleo. A molécula p23 está envolvida na estabilidade conformacional da ligação do hormônio e liga-se exclusivamente a HSP90. Os TPR estão ligados com o receptor através do dímero HSP90, mas ainda não se sabe ao certo qual o papel dessas proteínas TPR na regulação da atividade do receptor (Heitzer et al., 2007). Já foi identificado também um receptor de glicocorticoide

localizado na membrana (especificamente nas membranas plasmática e mitocondrial), sendo que esse não é apenas a translocação do receptor citoplasmático para a membrana, mas sim uma nova variante de receptor. Esses poderiam ser responsáveis pela resposta em curto prazo dos glicocorticoides (Stahn et al., 2007).

A formação do complexo receptor/hormônio resulta em dissociação das chaperonas do receptor de glicocorticoides. Esse complexo é então translocado para o núcleo da célula, onde se liga a regiões específicas chamadas de elementos responsivos aos glicocorticoides. Esses elementos responsivos aos glicocorticoides podem ser positivos ou negativos. Quando a ligação é em um elemento positivo, o resultado é a síntese de proteínas e a transcrição de genes, porém quando o elemento é negativo, os glicocorticoides inibem a transcrição gênica (Stahn et al., 2007). Além disso, as respostas dos glicocorticoides podem ser divididas em 2 tipos: direta (o receptor ativado diretamente leva a transcrição de genes-alvo, interagindo com suas regiões regulatórias); ou indireta (requer síntese de proteínas *de novo*, por exemplo, fatores de transcrição e cofatores, que são regulados pelos glicocorticoides, os quais podem ativar a transcrição de genes-alvo) (Schoneveld et al., 2004). Recentemente, foi descrito na literatura que os glicocorticoides também podem possuir alguns receptores na membrana plasmática, os quais seriam responsáveis por alguns dos seus efeitos rápidos nas células (Stahn et al., 2007). Uma visão resumida da sinalização e ação dos glicocorticoides pode ser vista na figura 3.

Figura 3 – Esquema simplificado da ação dos glicocorticoides.



FKBP52 – proteína de ligação FK52; HSP90 – *heat shock protein* 90; HSP70 – *heat shock protein* 70; GR – receptor de glicocorticoide; GRE – elemento responsivo ao glicocorticoide.
Fonte: Adaptado de Ogias (2009).

Os receptores de glicocorticoides estão envolvidos na regulação e distribuição da gordura corporal mostrando variação regional na sua densidade, com maiores concentrações na gordura visceral (Sjögren et al., 1994).

Também os glicocorticoides estão intimamente envolvidos na regulação da homeostase da glicose e do metabolismo lipídico. Lee et al. (2011) verificaram que os glicocorticoides (representado pela dexametasona) adicionado com a insulina em cultura de células primárias de tecido adiposo humano, promovem a regulação de vários tipos de genes nos diferentes depósitos de gordura (omental e subcutâneo), sendo que alguns genes são comumente regulados enquanto que outros são específicos ao depósito.

Os glicocorticoides também são conhecidos por alterar o metabolismo da glicose principalmente pela indução de resistência à insulina tanto em humanos quanto em animais (Dimitriadis et al., 1997; Willi et al., 2002), assim como já foi mostrado que eles também pioram o transporte de glicose e o metabolismo em tecidos periféricos (Dimitriadis et al., 1997; Rafacho et al., 2008), estimulam a gliconeogênese e aumentam a liberação de glicose hepática (Asensio et al., 2004).

Outros estudos indicam que os glicocorticoides estimulam a lipólise através de ação sobre a lipase hormônio sensível (Djurhuus et al., 2002; Slavin et al., 1994) e os AGLs resultantes devem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina (Gao et al., 2004). Esse efeito é consistente com seu papel de “hormônio do estresse”, mobilizando AGLs para a β-oxidação.

Gounarides et al. (2008) investigaram a relação dos glicocorticoides sobre o metabolismo lipídico de camundongos obesos resistentes à insulina. Eles encontraram aumento no peso dos animais e no consumo alimentar, sendo que esses valores retornaram aos valores basais após a cessação do tratamento com dexametasona. Além disso, um resultado interessante foi o acúmulo intramiocelular de lipídeos. No músculo tibial anterior dos animais tratados com dexametasona foi encontrada maior inclusão lipídica, sendo que o tamanho da gota lipídica foi maior que nos animais controles. Outro dado curioso foi a correlação encontrada entre os valores de inclusão lipídica intramiocelular e a gordura visceral ($r = 0,76$), indicando que os glicocorticoides podem promover trocas entre o tecido adiposo e o músculo esquelético.

Os glicocorticoides são hormônios importantes para a homeostase corporal e participam de muitos processos no organismo, porém em condições onde ocorre sua falta ou excesso, complicações clínicas ainda não tão bem compreendidas se estabelecem.

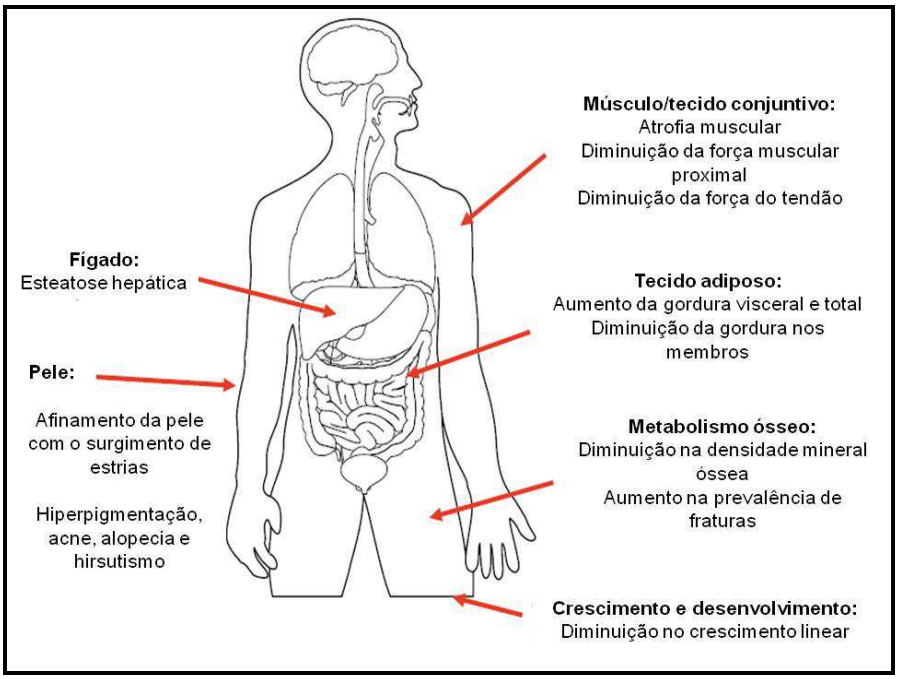
2.6 Excesso de Glicocorticoides

O excesso de glicocorticoides, seja endógeno ou exógeno, por tempo prolongado leva ao quadro da Doença de Cushing e síndrome de Cushing, respectivamente. A Doença de Cushing é caracterizada, entre outras, pela produção exacerbada de ACTH pelo tumor hipofisário, e é responsável por cerca de 70% dos casos de Doença de Cushing. É mais frequente em mulheres com idade entre 25-45 anos, com uma incidência de aproximadamente 5 a 25 casos por milhão de pessoas por ano (National Adrenal Diseases Foundation, 2012). Já a síndrome de Cushing é um distúrbio endócrino causado pela exposição crônica aos glicocorticoides devido ao uso prolongado de medicamentos que possuem glicocorticoides sintéticos (como hidrocortisona, prednisona e dexametasona, por exemplo), usados para tratar

doenças inflamatórias, entre outras. Essa forma é extremamente comum, porém ao retirar o medicamento contendo glicocorticoides, a pessoa recupera-se dos efeitos causados. Estima-se que entre 10 a 15 pessoas por milhão por ano sejam afetadas por essa síndrome (Cushing's Support & Research Foundation, 2012).

Indivíduos com síndrome de Cushing apresentam um fenótipo peculiar. Entre as características apresentadas, observa-se atrofia muscular, surgimento de estrias avermelhadas, diminuição no crescimento, esteatose hepática, entre outros, sendo a característica mais marcante o acúmulo diferenciado de gordura na região mais central do corpo. O acúmulo de gordura diferenciado também leva ao aumento de gordura na face, sendo chamado de face em "lua cheia", e na região dorsal e supraescapular, formando a chamada "corcova de búfalo" (Fernandez-Rodriguez et al., 2009). Apesar de essas características serem bem estabelecidas, ainda não se sabe ao certo por que esses tecidos especificamente são afetados pelo excesso de glicocorticoides. Na figura 4 estão representadas algumas das principais características da síndrome de Cushing.

Figura 4 – Características da síndrome de Cushing.



Fonte: Adaptado de Fernandez-Rodriguez et al. (2009).

Além das características já citadas acima, hipertensão, intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertrigliceridemia são também alguns dos sinais e sintomas

desenvolvidos devido ao excesso de glicocorticoides. Contudo, nem todas as pessoas apresentam todos esses sintomas. Chanson e Salenave (2010) em uma revisão de literatura demonstraram que a obesidade e o ganho de peso estavam presentes em 95% dos pacientes, enquanto que hipertensão em 75% e intolerância a glicose em 60% dos pacientes. Além disso, somente 20% dos pacientes apresentam concentrações elevadas de triglicérides e 36% deles baixos níveis de HDL-c.

Os glicocorticoides também regulam outros processos no tecido adiposo. Quando presente em excesso, como no caso da síndrome de Cushing, os glicocorticoides induzem a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, e o acúmulo de gordura nas diferentes regiões adiposas e no fígado (Bujalska et al., 2002; Macfarlane et al., 2009). Além do acúmulo diferenciado, Rebuffé-Scrive et al. (1988) verificaram que na síndrome de Cushing, o diâmetro dos adipócitos viscerais encontram-se hipertrofiados.

Poucos estudos se propuseram verificar os efeitos dos glicocorticoides sobre a lipogênese no tecido adiposo (Galton, Wilson, 1972; Wilson, Galton, 1972), ou então tentaram identificar alteração na atividade das enzimas envolvidas na lipogênese em resposta aos glicocorticoides (Diamant, Shafrir, 1975); sendo que esses poucos estudos são muito antigos e não identificaram os fatores críticos para a diferença no acúmulo de gordura nos diferentes coxins adiposos. Além de estudos antigos, outro ponto crítico no estudo da lipogênese em resposta aos glicocorticoides, é que a maioria dos estudos realizados até então investigaram a lipogênese hepática (Cai et al., 2011; Postic, Girard, 2008; Rockall et al., 2003).

Estudos mais recentes que se propuseram a estudar a reposta da lipogênese sob condição de excesso de glicocorticoide foram feitos em cultura de células. Campbell et al. (2011) analisando a lipogênese em cultura de células 3T3-L1 (com incubação de 48 horas com 1 µM de corticosterona) não encontraram diferença significante na incorporação de glicose em lipídeos, porém verificaram maior adipogênese. Já Gathercole et al. (2011) verificaram que a alta dose de dexametasona (500 nM) diminuiu a lipogênese basal (caracterizada pela incorporação de acetato marcado nas células), enquanto que baixa dose do glicocorticoide (5 nM) melhorou a resposta lipogênica tanto na linhagem Chub-S7 quanto em cultura primária de adipócitos da região subcutânea. Esses resultados

conflitantes podem ser atribuídos as diferentes doses empregadas e protocolos usados.

Apesar de muitos estudos focarem o papel da enzima 11β-HSD1 no acúmulo de gordura visceral promovida pelo excesso de glicocorticoides (Bujalska et al., 2002; Espínola-Antunes, Kater, 2007; Paulsen et al., 2007), alguns buscaram investigar outros fatores envolvidos na regulação energética da célula, entre eles, a AMPK (proteína quinase ativada por AMP). Recentemente, Christ-Crain et al. (2008) verificaram que a AMPK estava envolvida em muitas mudanças metabólicas observadas na síndrome de Cushing. Usando modelo animal, esses autores verificaram que a AMPK atua de uma maneira tecido-específica, o que explicou o aumento do apetite, a obesidade visceral e a dislipidemia. Em particular, os glicocorticoides inibiram a atividade da AMPK no tecido adiposo visceral levando a um aumento da lipogênese e da estocagem de gordura, enquanto que, no fígado, sua atividade foi aumentada. A partir desses resultados, os autores propuseram que a AMPK pode ser um novo mecanismo que poderia explicar algumas mudanças características no excesso de glicocorticoides. Em humanos, os glicocorticoides também inibiram a atividade da AMPK no tecido adiposo, mais uma vez sugerindo que a deposição de gordura visceral pode ser explicada por esse mecanismo (Kola et al., 2008).

Os glicocorticoides são importantes determinantes do metabolismo lipídico, tanto em animais quanto em humanos. Enquanto seu papel na lipólise (promovendo “quebra” de TAG) em condições de estresse está bem estabelecido, ainda não se sabe ao certo como ele age para promover o acúmulo de gordura (principalmente visceral) quando presente em excesso, como no caso da síndrome de Cushing.

3 JUSTIFICATIVA

Para estocar e liberar AGs, o TAB realiza uma variedade de processos químicos regulados por inervação simpática, hormônios e enzimas.

Entre os hormônios reguladores, o cortisol, um glicocorticoide liberado pelo córtex adrenal, tem papel importante induzindo a lipólise. Porém, em situações em que há excesso desse hormônio, uma condição clínica chamada síndrome de Cushing se estabelece.

Nessa condição, uma das características é o aumento do TAB na região central do corpo. Os estudos que tentaram identificar os fatores responsáveis por esse acúmulo diferenciado do TAB indicaram que os receptores de glicocorticoides, a atividade das enzimas LPL e 11β-HSD1 sejam alguns deles, porém esses fatores ainda não foram totalmente estabelecidos.

Contudo, a literatura ainda é inconsistente em relação aos efeitos dos glicocorticoides sobre o TAB, e os estudos realizados até então enfatizaram papel dos glicocorticoides sobre a lipólise. Porém, eles possuem papel importante sobre outros processos como, por exemplo, a diferenciação dos adipócitos, assim também como devem influenciar a lipogênese, seja alterando a atividade de enzimas da via lipogênica, ou a transcrição de genes relacionados a ela.

Uma vez que a lipogênese promove a estocagem de TAG, torna-se necessário investigar se as atividades enzimáticas envolvidas nesse processo sofrem algum tipo de alteração em resposta ao excesso de glicocorticoides. Além disso, a localização dos coxins adiposos pode apresentar respostas enzimáticas diferenciadas, assim como responsividade de receptores modificada e alteração em resposta a alguns hormônios. A determinação desses fatores poderia trazer um melhor entendimento sobre esse acúmulo central de TAB, e dessa forma, promover melhor entendimento sobre uma das características desenvolvidas durante o quadro clínico de excesso de glicocorticoides, a saber, síndrome de Cushing.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o grupo experimental que apresenta excesso de glicocorticoides e verificar o efeito desse excesso de glicocorticoides sobre o metabolismo dos carboidratos no tecido adiposo branco.

4.2 Objetivos específicos

Verificar as respostas induzidas pelo excesso de glicocorticoides sobre:

- Ingestão alimentar e hídrica;

- Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina;

- Alterações corporais;

- Perfil lipídico plasmático (triglicérides, colesterol total, VLDL-c, LDL-c, HDL-c);

- Perfil hormonal (corticosterona, insulina, leptina, adiponectina);

- Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ nos coxins adiposos subcutâneo, periepididimal, retroperitoneal e mesentérico;

- Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em TAG, e nas porções ácido graxo e glicerol de TAG nos coxins adiposos subcutâneo, periepididimal, retroperitoneal e mesentérico;

- Atividade máxima das enzimas lipogênicas (FAS, EM, G6PDH) nos coxins adiposos subcutâneo, periepididimal, retroperitoneal e mesentérico,

- Expressão gênica das enzimas lipogênicas (ACL, ACC, FAS, G6PDH) e enzima envolvida na ativação de corticosterona (11β-HSD1) nos coxins adiposos subcutâneo e mesentérico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e passaram por aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo n° 010 na folha 82 do livro 02).

Foram utilizados 42 ratos Wistar (8 semanas de idade) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (46x24x20 cm) sendo mantido 1 animal/caixa, sob condições de temperatura ambiental controlada de 25±2 °C, ciclo escuro/claro 12/12 h (período claro iniciando às 6 h) e exaustão de amônia controlada. Os animais receberam ração balanceada padrão Nuvilab® (Nuvital SA, Colombo, PR, Brasil), com composição seguindo as recomendações do *National Research Council* e *National Institute of Health-USA* para alimentos de ratos de laboratório e água *ad libitum*.

5.2 Padronização do grupo experimental

5.2.1 Estudo Piloto 1

Os animais, a partir da chegada ao biotério, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: controle (CON, n = 5) e dexametasona (DEX, n = 5).

- Grupo CON: o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após completarem 10 semanas de vida, os animais passaram por um procedimento cirúrgico em que foi inserido, subcutaneamente entre as escápulas, microbombas osmóticas (Alzet®, Cupertino, CA, Estados Unidos) contendo uma quantidade de veículo (salina 0,9%). Após 4 semanas, esses animais foram eutanasiados.

- Grupo DEX: esse grupo representou o excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing). Após 10 semanas de vida, esses animais passaram por um procedimento cirúrgico, em que foi inserido, subcutaneamente entre as escápulas, microbomba osmóticas (Alzet®) contendo dexametasona (Sigma-Aldrich Co®, São

Paulo, SP, Brasil) diluída em salina (concentração de dexametasona de 25 mg/ml, e dose de 0,1 mg/kg/d) (adaptado de Rafacho et al., 2008).

A microbomba osmótica possuía um volume total de 100 µl, sendo liberada uma dose de 0,11 µl por hora ao longo das 4 semanas. A microbomba osmótica foi usada com o intuito de quebrar a ritmicidade diária da liberação de corticosterona e de promover aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides.

Durante o tratamento, os animais de ambos os grupos foram pesados uma vez por semana para acompanhamento. O consumo alimentar e hídrico também foram acompanhados 1 vez por semana.

Após a análise dos resultados obtidos a partir desse grupo experimental, o quadro esperado não foi atingido, fazendo surgir dúvidas sobre a dose utilizada e sobre a eficácia da microbomba osmótica. Decidiu-se então tentar outra forma de indução e outra dose de dexametasona.

5.2.2 Estudo Piloto 2

Nesse estudo, foram utilizados 12 ratos Wistar que também foram distribuídos aleatoriamente nos mesmos dois grupos anteriormente citados: controle (CON, n = 6) e dexametasona (DEX, n = 6).

- Grupo CON: o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após completarem 10 semanas de vida, os animais foram submetidos a injeções subcutâneas semanais, contendo uma quantidade de veículo (salina 0,9%). Após 4 semanas, esses animais foram eutanasiados.

- Grupo DEX: após 10 semanas de vida, esses animais foram submetidos ao mesmo processo que o grupo controle (injeções subcutâneas semanais), porém recebendo uma dose de 75 µg/kg de peso corporal (pc) de dexametasona (Decadronal®, Aché® Laboratórios Farmacêuticos S.A, Guarulhos, SP, Brasil) diluída em salina. A dose de cada animal foi ajustada semanalmente em relação ao peso corporal.

O medicamento Decadronal® apresenta em sua composição a dexametasona na forma de acetato, caracterizando-se como uma solução de depósito e de atuação prolongada, porém com início imediato. A partir dessas características, esperava-se

que sua aplicação semanal fosse suficiente para quebrar a ritmicidade diária da liberação de corticosterona.

A dose de 75 µg/kg pc foi estipulada a partir do trabalho de Cole et al. (2000), em que os autores verificaram que com a administração de 50 µg/kg pc de dexametasona em ratos, já é possível bloquear a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse de contenção em 80%. A partir daí, acreditava-se que a dose administrada fosse suficiente para caracterizar o quadro iatrogênico desejado.

Mais uma vez, após a análise dos resultados obtidos, o quadro esperado não foi conseguido, apresentando resultados inconsistentes, assemelhando-se mais com o quadro de diabetes. Após esse segundo grupo experimental, optou-se pelo uso da microbomba osmótica mais uma vez, porém ainda havia dúvida sobre sua eficácia.

5.2.3 Teste da microbomba osmótica

Para testar a eficácia da microbomba osmótica, três tubos com diferentes condições foram usados:

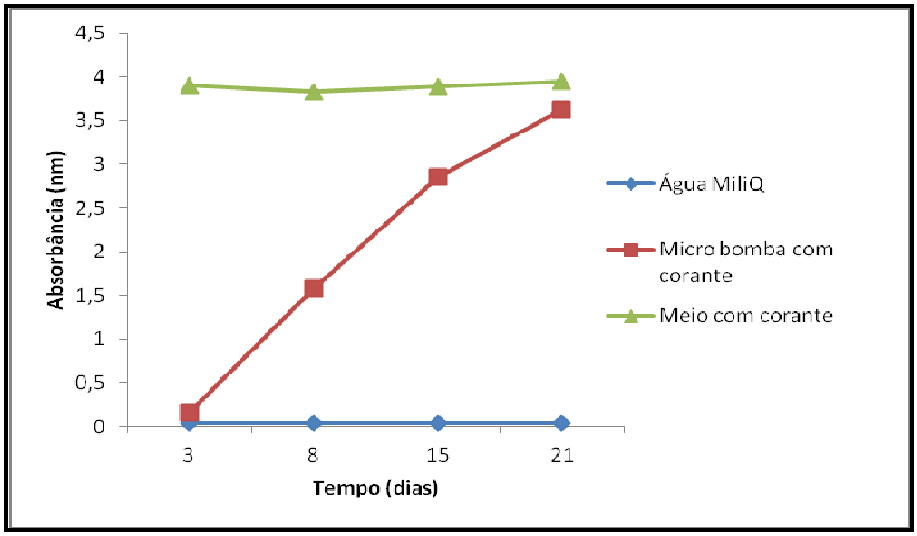
- Tubo 1: uma microbomba contendo 100 µl de solução de Azul de Evans foi colocado no tubo contendo 5 ml de água MiliQ, sendo que essa solução de Azul de Evans era liberada conforme o funcionamento da microbomba. Nos dias 3, 7, 15 e 21 após o procedimento, 100 µl da água do tubo foi retirada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro;

- Tubo 2: nesse tubo, 100 µl de solução de Azul de Evans foi diluída em 5 ml de água MiliQ, representando a liberação total do volume da microbomba osmótica. Nos dias 3, 7, 15 e 21 após o procedimento, 100 µl da água do tubo foi retirada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro;

- Tubo 3: esse tubo foi usado como controle, sendo que só continha água MiliQ. Nos dias 3, 7, 15 e 21 após o procedimento, também foram retirados 100 µl da água do tubo para a leitura da absorbância em espectrofotômetro.

O resultado das leituras encontra-se na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Teste de liberação da microbomba osmótica.



Ao analisar o padrão de liberação da microbomba osmótica pela absorbância obtida, verificamos que seu funcionamento estava de acordo com as instruções dos fabricantes, demonstrando que o problema no grupo experimental anterior foi relacionado com a dose de dexametasona administrada.

Após readequação da dose a ser administrada, o grupo experimental foi definido e os experimentos relacionados com a resposta lipogênica dos adipócitos foram feitos. Todos os detalhes sobre o novo grupo experimental e os experimentos realizados estão descritos a seguir.

5.3 Procedimentos experimentais

Os animais, a partir da chegada ao biotério, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: controle (CON, n = 10) e dexametasona (DEX, n = 10).

- Grupo CON: o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após completarem 10 semanas de vida, os animais passaram por um procedimento cirúrgico em que foi inserido, subcutaneamente entre as escápulas, microbombas osmóticas (Alzet®) contendo uma quantidade de veículo (salina 0,9%). Após 4 semanas, esses animais foram eutanasiados.

- Grupo DEX: esse grupo representou o excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing). Após 10 semanas de vida, esses animais passaram por um procedimento cirúrgico, em que foi inserido, subcutaneamente entre as escápulas, microbombas osmóticas (Alzet®) com dexametasona diluída em salina

(concentração de dexametasona de 25 mg/ml, e dose de 0,25 mg/kg/d) (adaptado de Rafacho et al., 2008).

A microbomba osmótica possuía um volume total de 100 µl, sendo liberada uma dose de 0,11 µl por hora ao longo das 4 semanas. A microbomba foi usada com o intuito de quebrar a ritmicidade diária da liberação de corticosterona e de promover aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides. E ao final do tratamento os animais foram eutanasiados.

Durante o tratamento, os animais de ambos os grupos foram pesados uma vez por semana para acompanhamento. O consumo alimentar e hídrico também foram acompanhados 1 vez por semana.

5.4 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)

Uma semana antes da eutanásia, os animais de ambos os grupos, em jejum prévio de 8 horas, foram submetidos ao teste de tolerância à glicose oral (teste começando às 16 h). Antes da administração de glicose, foi coletado sangue da calda dos animais para a mensuração da glicemia no tempo 0. Logo após, houve a administração da glicose (75 mg/100 g pc) por gavagem, e novas coletas sanguíneas foram feitas nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. O sangue foi analisado em glicosímetro (*One Touch Ultra®, Johnson & Johnson®*, São Paulo, SP, Brasil). A área sob a curva a partir dos valores obtidos foram calculados e usados para as análises.

Nos tempo 0, 15, 30 e 60 minutos, 25 µl de sangue foram retirados e armazenados em solução salina para posterior análise de insulina plasmática.

5.5 Teste de tolerância à insulina intravenosa (ivITT)

Uma semana antes da eutanásia, 10 animais (sendo 5 de cada grupo), também foram submetidos ao teste de tolerância à insulina intravenosa. Antes da administração de insulina, foi coletado sangue da calda dos animais para a mensuração da glicemia no tempo 0. Logo após, os animais foram anestesiados (Zoletil 0,2 ml e Fentanila 0,1 ml; 0,3 ml/500 g pc, intramuscular), e então houve a administração da insulina (75 mU/100 g pc) pela veia peniana, e novas coletas

sanguíneas foram feitas nos tempos 3, 5, 7, 9, 12, 15 e 20 minutos para mensuração da glicose sanguínea. O sangue foi analisado em glicosímetro (*One Touch Ultra*®). A constante de tempo para o desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculado a partir da regressão linear obtida com a transformação de log dos valores de glicose entre os tempo 0 e 15 minutos após a administração de insulina.

5.6 Experimentos *in vitro*

Após as 4 semanas de tratamento, os grupos CON e DEX, foram mantidos em 12 h de jejum e foram eutanásiados às 18 h. Esse horário foi definido considerando o ritmo de liberação de corticosterona pelo animal, e pela atividade espontânea de alimentação do animal estar aumentada (Jahng et al., 2008). 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. Foi coletado sangue do tronco, e posteriormente, a laparotomia mediana foi feita para a retirada dos tecidos adiposos subcutâneo abdominal (SC), periepididimal (PE), retroperitoneal (RP) e mesentérica (MS). O músculo sóleo e as glândulas adrenais também foram retirados e pesados.

Fragmentos das gorduras SC, PE, RP e MS foram retirados para isolamento dos adipócitos, e submetidos, *in vitro*, aos testes biológicos para avaliação das taxas basais ou maximamente estimuladas por insulina de oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$, além da incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose TAG, incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em AG de TAG e a incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de TAG. Os adipócitos passaram ainda por análises morfométricas, para determinação do volume.

5.6.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos foram isolados através de digestão do tecido pela colagenase (Rodbell, 1964), com algumas modificações para adaptar o método às condições laboratoriais para realização do estudo. Em resumo, os coxins adiposos SC, PE, RP e MS foram retirados, picados em finos fragmentos e incubados em 4 ml de tampão digestivo (DMEM/HEPES 20 mM/BSA 4%, colagenase II [Sigma Chemical, St. Louis,

MO, Estados Unidos] - 1,0 mg/ml, pH 7,40) por cerca de 45 minutos a 37 ^{o}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 ºC. Para determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 µl da suspensão celular em tampão EHB foram colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (2000 rpm por 1 minuto). O volume total da suspensão corresponde a 100% e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação nos fornece o lipócrito da amostra.

Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 40x) acoplado à câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 – MOTIC®). Utilizou-se o programa *Motic-Images Plus 2.0*® para medição da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio. Em cada preparação 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:

$$\mathbf{V} = \frac{(\pi/6) \times \mathbf{D}^3}{1000}$$

$$\mathbf{N} = \frac{(\text{lipócrito} \times 10^7)}{\mathbf{V}}$$

Onde:

D é o diâmetro médio de 50 adipócitos (µm), **N** é o número de células e **V** é o volume médio (Fine, Di Girolamo, 1997). A divisão por 1000 na primeira equação visa expressar o volume em picolitros.

5.6.2 Cálculo indireto da celularidade

O cálculo indireto da celularidade do tecido adiposo foi realizado através da relação entre a massa total do coxim adiposo e a massa de um adipócito:

$$\text{Celularidade} = \frac{\text{Massa do tecido (mg)}}{\text{Massa de um adipócito (ng)}}$$

A massa de um adipócito é calculada a partir da fórmula da densidade:

$$D = \frac{m}{v}$$

Onde:

D = densidade média do adipócito; m = massa média de um adipócito, e v = volume médio do adipócito.

Sendo a densidade média do adipócito igual a 0,91, tem-se:

$$m = 0{,}91 \times v$$

5.6.3 Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ e teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis em adipócitos isolados

Adipócitos (conc. final de 20% v:v) em tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/glicose 5 mM, pH 7,4 a 37 ^{o}C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-^{14}C]-glicose (1850 Bq/tubo), com ou sem insulina (10 nM). Estes tubos foram vedados com tampas de borracha. A seguir, os tubos foram enriquecidos de uma atmosfera com 95% de O_2 5% de CO_2 e incubados por 120 min em banho-maria a 37 ºC. Ao término da incubação, 0,2 ml de H_2SO_4 8N foi pipetado sobre a mistura de

reação e um flaconete com papel de filtro (2x4 cm embebido com 0,2 ml de etanolamina) foi emborcado (para absorver o $^{14}CO_2$ liberado da reação).

Foi incubado por mais 30 minutos, e após o flaconete foi preenchido com coquetel de cintilação biodegradável para contagem da radioatividade beta incorporada (Lima et al., 1994; Rodbell, 1964).

Em seguida, foi realizada a extração dos lípides mediante a adição de 2,5 ml de reativo de DOLE (isopropanol:n-heptano:H_2SO_4 8N, 4:1:0.25 v:v:v) no meio de incubação (Dole, Meinertez, 1960). Dessa mistura, 500 µl foram transferidos para *vial* de cintilação, e após secagem completa, 2,5 ml de líquido de cintilação foram colocados no tubo, e finalmente levados para contador beta por 5 minutos. Os resultados estão expressos em nmol.10^{-6} cels.

5.6.4 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis

Da mistura composta por TAG previamente obtida no teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triglicerídeos, foram retirados 1000 µl, seguido por secagem completa. Após este processo, houve adição de 1 ml de etanol (95%) e 250 µl de KOH (40%), os tubos de ensaio foram frouxamente tampados e colocados em banho-maria à 60 °C por 1 hora. Em seguida o material foi resfriado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e logo após adicionou-se 2 ml de HCL 3N e 2 ml de n-heptano. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 10 minutos. Uma amostra de 1000 µl da fase superior desta mistura foi retirada e transferida para um *vial*, e após a secagem, 2,5 ml de líquido de cintilação foi colocado e, finalmente, foi levado ao contador beta por 5 minutos.

5.6.5 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis

A partir dos valores obtidos na incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em TAG e em AGs, uma subtração foi feita e o valor final considerado uma estimativa da incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de TAG.

5.7 Determinações bioquímicas e hormonais

5.7.1 Determinação de glicose

A concentração sérica de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Lott, Turner, 1975). O ensaio foi realizado utilizando o kit Glicose HK Liquiform (Labtest, ref. 85-2/100, Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração mínima detectável é de 2 mg/dl, com coeficiente de variação interensaio de 1,6%.

5.7.2 Determinação de triglicérides

Os triglicérides foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (GPO/POD). Para este ensaio, foi utilizado o kit Triglicérides Liquiform (Labtest, ref. 87-2/100). A concentração mínima detectável é de 3 mg/dl, com coeficiente de variação interensaio < 2,0%.

5.7.3 Determinação de colesterol total e suas frações (HDL-c, LDL-c e VLDL-c)

O colesterol total foi determinado por método enzimático, pelo kit Colesterol Liquiform (Labtest, ref. 76-2/100l). A concentração mínima detectável é de 2 mg/dl, com coeficiente de variação interensaio de < 3,0%.

O HDL-c foi determinado pelo método de precipitação usando 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), como segue a seguir:

$$\text{VLDL colesterol} = \frac{\text{Triglicérides}}{5}$$

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL-c} + \text{VLDL-c})$$

5.7.4 Determinação de insulina, leptina, adiponectina e corticosterona

As concentrações séricas de insulina, leptina, adiponectina e corticosterona foram determinadas usando kits comerciais específicos para rato. Insulina (kit RI-13K, Millipore Corporation, St Charles, MO, Estados Unidos): sensibilidade de 0,0329 ng/dl. O coeficiente de variação intraensaio é < 5,8% e o coeficiente de variação interensaio é < 10,8%. O ensaio foi realizado em 100 µl de amostra. Leptina (kit RL-83K, Millipore Corporation): sensibilidade de 0,639 ng/dl. O coeficiente de variação intraensaio é < 4,6% e o coeficiente de variação interensaio é < 5,7%. O ensaio foi realizado em 100 µl de amostra. Adiponectina (kit MADP-60HK, Millipore Corporation): sensibilidade de 1 ng/dl. O coeficiente de variação intraensaio é < 4,5% e o coeficiente de variação interensaio é < 8,3%. O ensaio foi realizado em 100 µl de amostra (soro diluído na proporção de 1:1000). Corticosterona (kit TKRC1, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Los Angeles, CA, Estados Unidos): sensibilidade de 5,7 ng/dl. O coeficiente de variação intraensaio é < 12,2% e o coeficiente de variação interensaio é < 14,9%. O ensaio foi realizado em 50 µl de amostra.

5.8 Análises enzimáticas

5.8.1 Preparo das amostras para atividade de enzimas lipogênicas

As amostras de TAB SC, PE, RP e MS (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 PE, RP e MS) 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 ºC. 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 a 340 nm foi medida em espectrofotômetro, 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 estão expressos em $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína presente no extrato.

5.8.2 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), $MgC_2.6H_2O$ (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, e acompanhada por 10 minutos a 25ºC.

5.8.3 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.

O tampão de ensaio utilizado (volume de 260 µl por poço) consistiu de KH_2PO_4 (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 KH_2PO_4 ao extrato enzimático, sendo acompanhada por 10 minutos de leitura à 37 ºC.

5.8.4 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, foram utilizados 270 µl de tampão de ensaio contendo Tris-HCL (200 mM), $MgCL_2$ $6H_2O$ (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 $MgCL_2$ $6H_2O$ (20 mM), pH 7,4 ao extrato enzimático e acompanhada por 10 minutos a 37 ºC.

5.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo – qPCR

5.9.1 Extração de RNA total

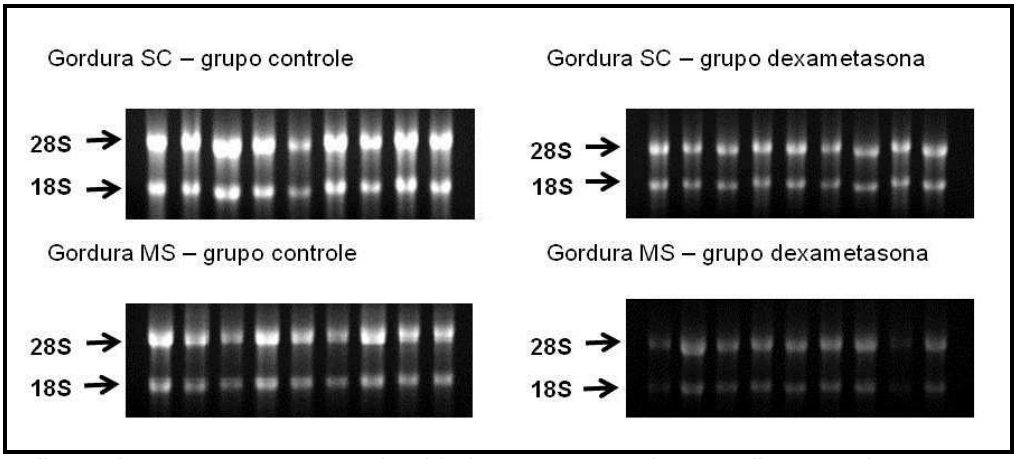
Amostras de 200 mg dos tecidos adiposos SC e MS foram homogeneizadas em Polytron por 30 segundos com trizol (Trizol Reagent®, Invitrogen, Life Technologies, PA, Estados Unidos), na proporção de 1 ml para cada 100 mg de amostra, seguindo-se as especificações do fabricante. A seguir, os homogenatos foram aliquotados em tubos de 1 ml e armazenados a -80 ºC para posterior extração.

Na etapa da extração, as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25 ºC) para permitir a completa dissolução dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, 0,2 ml de clorofórmio foram adicionados aos tubos, agitando-se vigorosamente em vórtex, por 15 segundos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 1200 g por 15 minutos a 4 ºC, e ao final foram formadas 3 fases. A fase aquosa superior, contendo RNA, foi transferida para outro tubo e a purificação do RNA foi feita por coluna, seguindo o protocolo do kit manufaturado PureLink RNA Mini kit® (Cat. No. 12183-018A, Ambion by Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil).

O RNA total foi quantificado em leitura espectrofotométrica em Quibit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) a 260 nm. Para análise da pureza do RNA, adotou-se o cálculo da razão do valor da absorbância a 260 nm pelo valor da absorbância a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas), onde se estipula como razão ideal para aceitação da amostra o intervalo entre 1,6-2,0. Alíquotas de 8 µl de amostras contendo 1 µg de RNA total diluído em água DEPC foram amazenadas a -80 ºC.

Para confirmar a integridade do RNA extraído, 2 µg de cada amostra foram submetidos à eletroforese em minigel de agarose 1% (em ácido morfolinopropanosulfônico [MOPS] 200 mM, acetato de sódio 50 mM, EDTA 0,5mM, pH 8,0; solução 10x concentrada, pH 7,0) com formaldeído 4% e corado com 1 µg/ml de brometo de etídio (Figura 6).

Figura 6 – Eletroforese em gel para verificar a integridade do RNA total extraído.



As bandas ilustradas representam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal.

5.9.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Na etapa inicial, pipetou-se 1 µl de tampão de DNAse (10x) e 1 µl da enzima DNAse (1 U/1 µl) em tubos contendo 1 µg de RNA total. A mistura foi incubada a 25 ºC por 15 minutos com a finalidade de evitar uma possível amplificação de DNA genômico, que pode contaminar o RNA extraído. A seguir, adicionou-se 1 µl de EDTA 25 mM e a mistura foi submetida à incubação a 65 ºC por 10 minutos. Na etapa seguinte (síntese de DNA), pipetou-se 1 µl de oligo DTs 146 ng/µl e 1 µl de mistura de dNTPs 10 mM, seguido de incubação a 70 ºC por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em gelo por 1 minuto, e então 5 µl de tampão da enzima transcriptase reversa (5x), 1 µl de ditiotreitol (DTT) 0,1 M e 1 µl da enzima transcriptase reversa (Superscript® III, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foram adicionados à mistura, que foi então incubada novamente. Na etapa final, as amostras foram submetidas à incubação a 42 ºC por 55 minutos e mais 15 minutos a 70 ºC. As incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf®, Hamburg, HH, Alemanha). O material obtido (cDNA) foi então mantido em freezer a -20 ºC até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

5.9.3 PCR quantitativo (real time)

Alíquotas de 1 µl de amostra de cDNA obtidas a partir da reação de RT foram adicionadas a um *mix* contendo 3,65 µl de água DEPC autoclavada, 0,5 µl de

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, código do produto: 4304437, São Paulo, SP, Brasil), 0,35 µl de TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x (para rato e específico para cada gene) contendo os dois primers para PCR e uma sonda MGB *TaqMan®* marcada com FAM e um *mix* pré-formulado na concentração de 20x, na concentração final 1x de 250 nM de sonda e 900 nM de cada primer (a tabela 1 mostra a lista dos kits inventariados utilizados com seus respectivos números de catálogo).

Tabela 1 – Lista de *kits* inventariados (*Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay Mix* 20x)

Gene	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
Ácido Graxo Sintase	FASN	Rn_00569117
Acetil-CoA Carboxilase	ACACA	Rn_00573474
ATP-citrato liase	ACLY	Rn_00566411
Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	G6PDH	Rn_00566576
Enzima Málica	ME1	Rn_00561502
11β-Hidroxiesteróide desidrogenase 1	11HSB1b1	Rn_00567167
β-actina	ACTB	Rn_00667869
hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT-1	Rn_01527840
ribosomal protein L37a	RPL 37a	Rn_02114291

Fonte: Life Technologies

As reações de PCR foram realizadas em aparelho *StepOnePlus® Real Time* PCR *System* (Applied Biosystems). A reação de PCR iniciou-se com um período de 2 minutos para ativação da *AmpErase®* UNG seguida de 10 minutos a 95 ºC para a ativação da *AmpliTaq Gold®* DNA *Polymerase*. Essa fase só ocorreu no primeiro ciclo de reação. As etapas seguintes envolveram desnaturação da fita de cDNA a temperatura de 95 ºC por 15 segundos, seguida da fase de anelamento do *primer* e extensão da fita por 1 minutos na temperatura de 60 ºC. Essas 2 fases se repetiram a cada ciclo por 40 ciclos.

A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

5.9.4 Quantificação relativa – Método de C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)

Análise comparativa entre a expressão do gene alvo normalizada por um controle endógeno (*housekeeping*).

Resumidamente, para cada condição acima descrita, foram calculados os valores de ΔC_T para cada gene de interesse [ΔC_T = C_T(gene alvo) – C_T(controle endógeno)]. Em seguida, tomando-se como referência os valores de ΔC_T do grupo controle, calcularam-se os valores de $\Delta\Delta C_T$ [$\Delta\Delta C_T$ = ΔC_T(gene) - (média geométrica do ΔC_T do grupo controle)]. A partir do resultado obtido, foi calculado o conteúdo relativo de RNAm do gene estudado (Conteúdo relativo = $2^{-\Delta\Delta C_T}$).

Valores são apresentados como conteúdo normalizado de RNAm do gene de interesse relativo à média do grupo controle.

5.9.5 Seleção de controladores endógenos (housekeeping)

Realizou-se reações de qPCR para cada possível controle endógeno: β-actina (ACTB), *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* 1 (HPRT-1) e *ribosomal protein L37a* (RPL 37a), utilizando-se amostras dos animais submetidos ao protocolo experimental da pesquisa (CON e DEX). Os resultados foram submetidos à análise estatística para a escolha, utilizando-se amostras de controle endógeno com menor variação para o protocolo experimental da pesquisa; que nesses tecidos e para esse modelo experimental foi RPL.

5.10 Tratamento estatístico dos dados

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Para verificar as diferenças entre os grupos nos valores de Kitt, área sob a curva, além do tamanho das células, estruturas, determinações bioquímicas e hormonais, e atividade máximas das enzimas e expressão gênica, foi aplicado teste *"t" Student* não-pareado, quando os dados foram paramétricos, e o teste de Mann-Whitney quando os dados foram não-paramétricos. Para o experimento "*in vitro*", foi aplicado ANOVA *two-way* para medidas repetidas para comparar a ingestão alimentar e hídrica, curva de oGTT e ivITT, além dos testes basal e máximo intra e entre grupos.

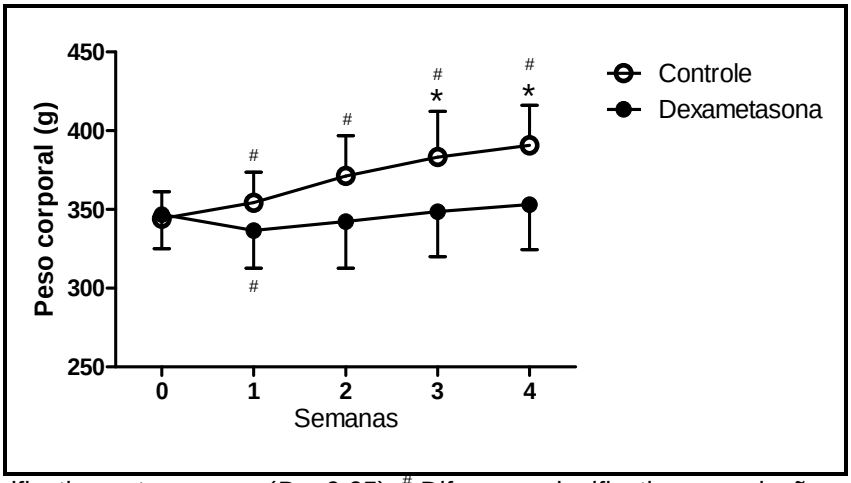
A esfericidade dos dados foi verificada por meio do teste de *Mauchly*, e quando os valores foram significativos, a correção de *Greenhouse-Geisser* foi utilizada. Quando o valor de *F* foi significante, a análise foi complementada por meio do teste de *post hoc* de *Bonferroni* para identificar as diferenças pontuais. Os dados estão expressos como média ± EP. A significância foi fixada em $P < 0,05$. O *software* utilizado foi o *Graph Prism 5.0*® (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, Estados Unidos).

6 RESULTADOS

6.1 Peso corporal

Ao longo das 4 semanas de tratamento, o peso corporal dos animais foi mensurado uma vez por semana. Houve diminuição significativa do peso corporal no grupo DEX comparado ao grupo CON nas duas últimas semanas de tratamento (semanas 3 e 4). O grupo CON apresentou aumento de peso corporal a cada semana, enquanto que o grupo DEX apresentou redução de peso significante somente na primeira semana de tratamento (Figura 7).

Figura 7 – Evolução do peso corporal dos animais ao longo das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05); # Diferença significativa em relação a semana 0 (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP.

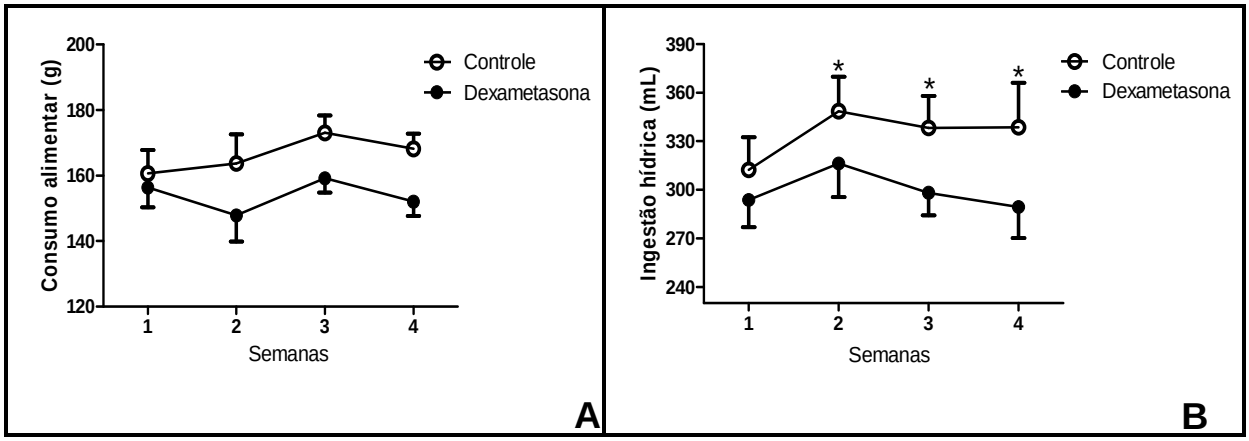
Ao analisar o ganho de peso (peso ao final do período experimental subtraído pelo peso inicial), houve diferença estatística entre os grupos, com os animais do grupo DEX praticamente mantendo seu peso corporal ao longo do tratamento (CON = 46,8 ± 3,9 g; DEX = 6,2 ± 3,8 g, *P* < 0,05).

6.2 Ingestão alimentar e hídrica

Apesar do aumento do peso corporal do grupo CON, não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos ao longo do tratamento (Figura 8 A). Da mesma forma, a ingestão hídrica também não apresentou diferença significativa entre os

grupos. Somente o grupo CON apresentou diferença significativa entre as semanas 2, 3 e 4 em relação a semana 1 ($P < 0,05$) (Figura 8 B).

Figura 8 – Ingestão alimentar (A) e ingestão hídrica (B) ao longo das 4 semanas de tratamento (n = 10).

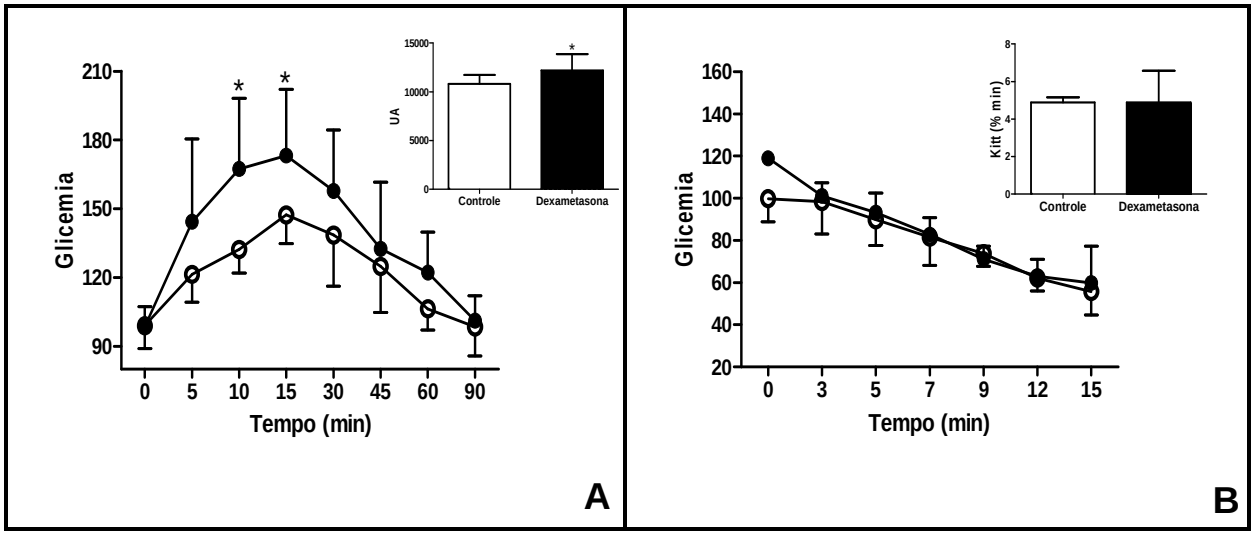


* Diferença significativa em relação a semana 1 ($P < 0,05$). Dados estão expressos como média ± EP.

6.3 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT) e teste de tolerância à insulina intravenosa (ivITT)

Para verificar se os animais estavam intolerantes à glicose e resistentes à insulina, que são algumas das características do quadro de síndrome de Cushing, foram aplicados os testes oGTT e ivITT nesses animais. Houve diferença na área sob a curva entre os grupos no teste oGTT, indicando que os animais tratados com dexametasona estavam intolerantes à glicose (Figura 9 A), além de diferença entre os tempos 10 e 15 minutos ($P < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença nos valores obtidos a partir do teste ivITT, tanto entre os tempos do teste, quanto no Kitt (Figura 9 B). Os testes foram feitos em dois dias, sendo que em cada dia 5 animais de cada grupo era testado. Como não foi encontrada nenhuma tendência sequer no teste ivITT no primeiro dia de teste, optamos em não submeter os outros animais ao teste devido seu caráter estressante e para não correr o risco de “perder” animais.

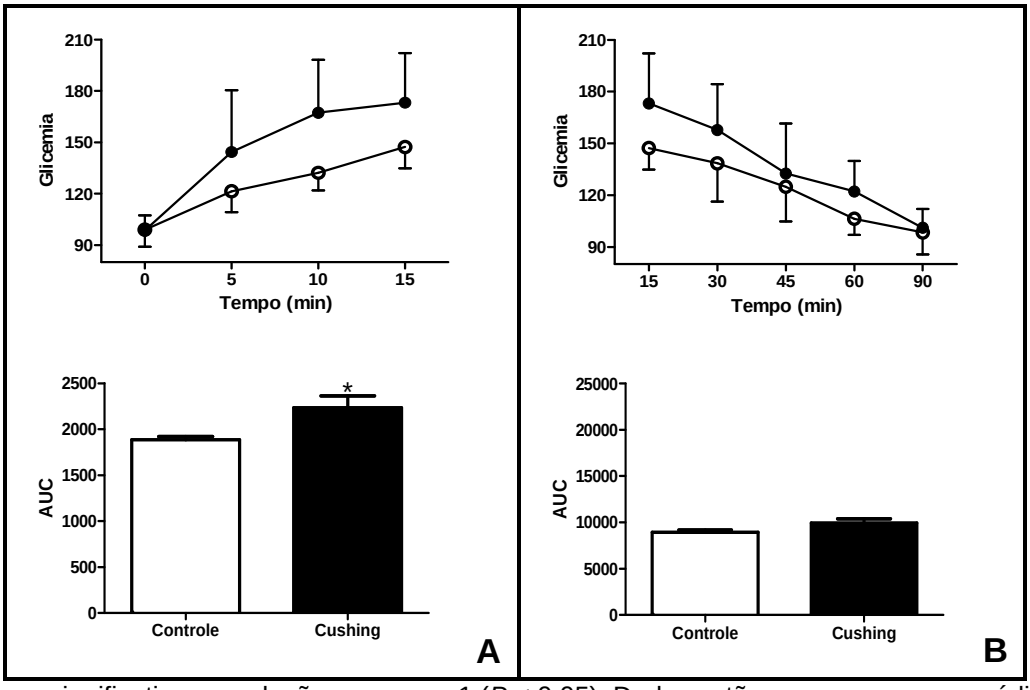
Figura 9 – **A** – Teste de Tolerância à Glicose oral (oGTT) (n = 10); *inset*: valores de área sob a curva. **B** – Teste de Tolerância à Insulina intravenosa (ivITT) (n = 5); *inset*: valores de Kitt.



* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05); Barra em branco – grupo Controle, Barra em preto – grupo Dexametasona. Dados estão expressos como média ± EP.

Em outra análise feita, quando se dividiu a curva do teste de oGTT em duas partes, sendo uma do tempo 0 a 15 minutos, e a outra do tempo 15 a 90 minutos, somente a primeira parte da curva apresentou diferença significativa entre os grupos na área sob a curva (*P* < 0,05; Figura 10 A); enquanto que na segunda parte do teste não houve diferença (*P* > 0,05; Figura 10 B). Isso indica que o excesso de dexametasona pode ter alterado as fases de liberação de insulina pelo pâncreas.

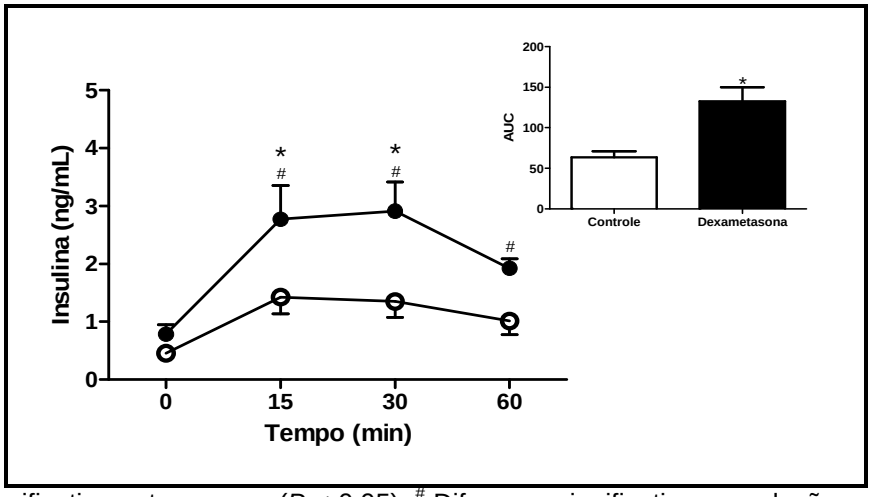
Figura 10 – **A** – Curva de oGTT e área sob a curva do tempo 0 a 15 minutos (n = 10); **B** – Curva de oGTT e área sob a curva do tempo 15 a 90 minutos (n = 10).



* Diferença significativa em relação a semana 1 (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP.

Apesar de não ter havido diferença no teste de ivITT,, os valores de insulina analisados durante o teste de oGTT apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 11). Foram coletadas amostras de sangue nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos, e a insulina plasmática foi dosada. Houve diferença significativa entre os grupos nos tempos 15 e 30 minutos, com o grupo DEX apresentando maiores valores de insulina (*P* < 0,05). Também foi verificada diferença significativa entre os grupos na área sob a curva. Além disso, o grupo DEX também apresentou diferença significante nos tempos 15, 30 e 60 minutos em relação ao tempo 0, sendo que essa diferença não foi vista no grupo CON (Figura 11).

Figura 11 – Valores de insulina plasmática ao longo do teste de oGTT (n = 10); *inset*: valores de área sob a curva.



* Diferença significativa entre grupos ($P < 0,05$); # Diferença significativa em relação ao tempo 0 ($P < 0,05$). Dados estão expressos como média ± EP.

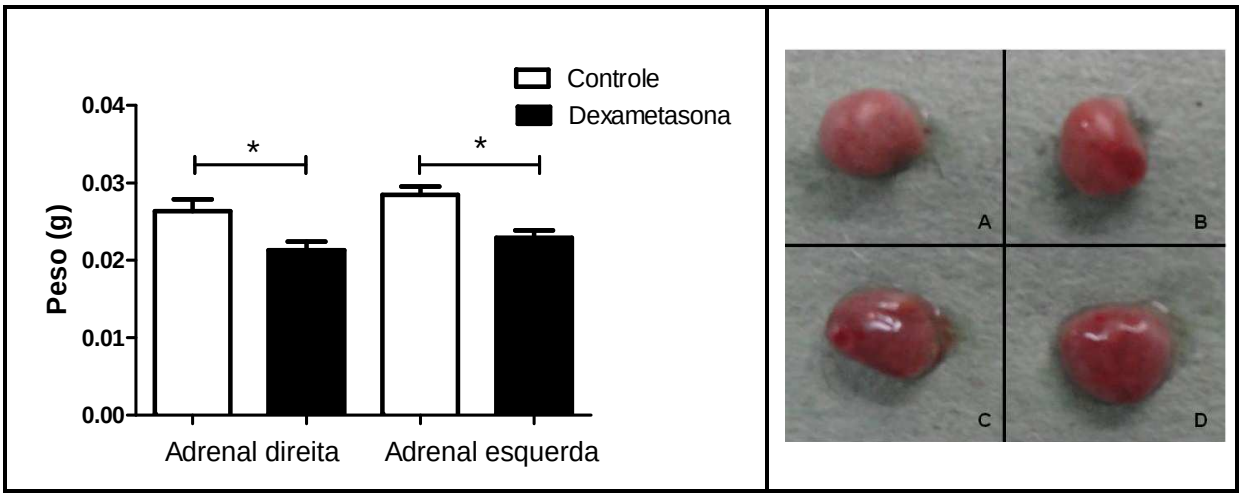
6.4 Características corporais

Um dos efeitos do uso excessivo de glicocorticoides é a diminuição do crescimento ósseo. No final das 4 semanas de tratamento, o comprimento naso-anal dos animais foi mensurado, e o grupo DEX foi significativamente menor em relação ao grupo CON (CON = 24,8 ± 0,2 cm; DEX = 23,8 ± 0,2 cm).

Além dos coxins adiposos, durante o sacrifício as glândulas adrenais e o músculo sóleo esquerdo também foram retirados e pesados. Uma das características da síndrome de Cushing, que nos permitiria ver logo no momento do sacrifício se o tratamento administrado aos animais foi eficiente era a diminuição do tamanho das glândulas adrenais.

Foi encontrada diferença significativa no peso das glândulas adrenais, tanto na direita quanto na esquerda ($P < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 – Peso e representação das adrenais direita e esquerda após 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05). A – Adrenal direita – DEX; B – Adrenal esquerda – DEX; C – Adrenal direita – CON; D – Adrenal esquerda – CON. Dados estão expressos como média ± EP.

Além disso, no quadro de síndrome de Cushing também ocorre perda de massa muscular. No presente estudo, houve uma redução significativa no peso absoluto do músculo sóleo no grupo tratado (CON = 0,1454 ± 0,01 g; DEX = 0,1339 ± 0,001 g, *P* < 0,05); porém, quando foi considerado o peso do músculo sóleo relativo ao peso corporal a diferença entre os grupos desapareceu (CON = 0,0373 ± 0,0011 g; DEX = 0,0380 ± 0,0008 g, *P* > 0,05), indicando que não houve perda da massa do músculo sóleo com tratamento.

6.5 Determinações bioquímicas

As concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides, colesterol total e suas frações foram analisadas no soro dos animais (Tabela 2). Em todas as análises, o grupo DEX apresentou valores significativamente maiores que do grupo CON (*P* < 0,05).

Além dos níveis citados acima, também foi analisado a concentração sérica de hormônios, como a insulina, leptina, adiponectina, além da corticosterona. O grupo DEX apresentou maiores valores plasmáticos de insulina, leptina e adiponectina quando comparado ao grupo CON (*P* < 0,05). Já a corticosterona foi significativamente menor no grupo tratado em relação ao grupo controle (*P* < 0,05).

Esse resultado comprova que o tratamento administrado foi eficaz para bloquear o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito de 4 semanas de tratamento com dexametasona sobre os níveis de glicose plasmática, perfil lipídico e hormônios séricos (n = 10).

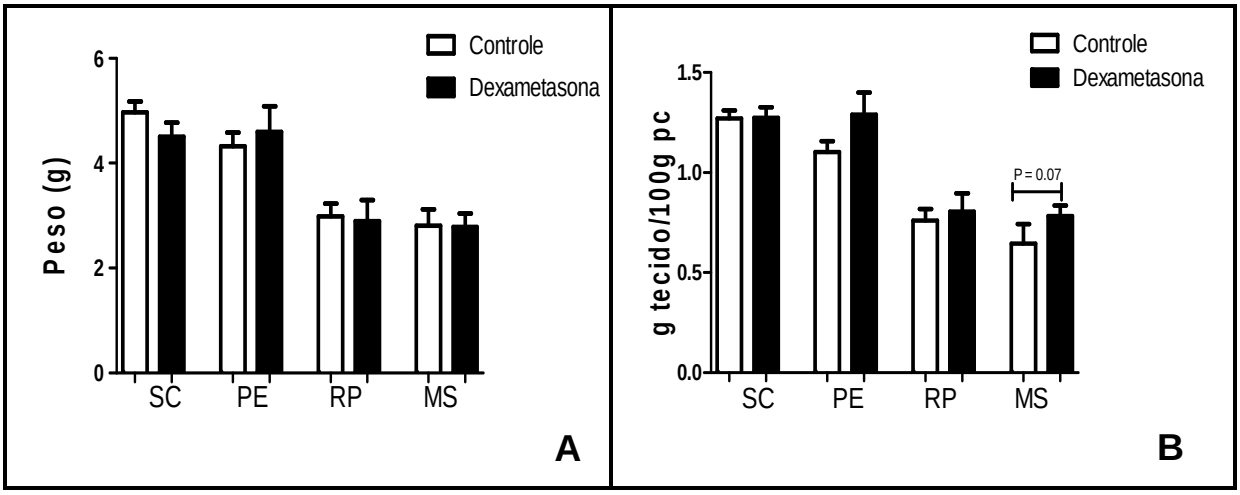
	Controle	**Dexametasona**
Glicose (mg/dL)	104 ± 3,5	146 ± 6,9*
Triglicérides (mg/dL)	29,5 ± 3,8	43,6 ± 5,3*
Colesterol total (mg/dL)	28,4 ± 3,3	47,0 ± 3,0*
LDL-c (mg/dL)	16,5 ± 1,6	21,2 ± 2,5
HDL-c (mg/dL)	10,8 ± 1,1	17,1 ± 0,8*
VLDL-c (mg/dL)	5,9 ± 0,8	8,7 ± 1,1*
Corticosterona (ng/mL)	337,4 ± 15,2	140,5 ± 10,1*
Insulina (ng/mL)	1,16 ± 0,2	5,09 ± 1,2*
Leptina (ng/mL)	2,89 ± 0,3	4,59 ± 0,5*
Adiponectina (µg/mL)	3,22 ± 0,2	4,63 ± 0,2*

* Diferença significativa entre grupos ($P < 0,05$). Dados estão expressos como média ± EP.

6.6 Coxins adiposos

Após eutanásia, os coxins adiposos SC, PE, RP e MS foram retirados e pesados. Quando se comparou o peso absoluto das gorduras, não houve diferença entre os grupos nos diferentes coxins adiposos ($P > 0,05$) (Figura 13 A). Já quando os coxins foram analisados em relação ao peso relativo (por 100 g do peso corporal), houve tendência dos coxins PE, RP e MS serem maiores no grupo DEX em relação ao grupo CON ($P = 0,07$) (Figura 13 B).

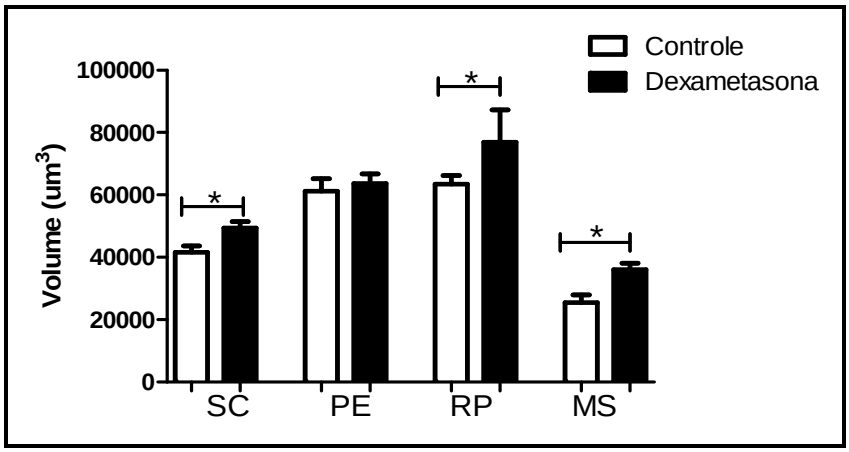
Figura 13 – **A** – Peso total dos coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento. **B** – Peso dos coxins adiposos relativo ao peso corporal dos animais (n = 10).



Dados estão expressos como média ± EP.

Os adipócitos dos coxins RP e MS apresentaram maior volume no grupo DEX ($P < 0,05$). Além dos coxins mais viscerais, os adipócitos da gordura SC também apresentaram maior volume quando comparado ao grupo CON ($P < 0,05$). Já a gordura PE não apresentou diferença entre os grupos (Figura 14).

Figura 14 – Volume dos adipócitos dos diferentes coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



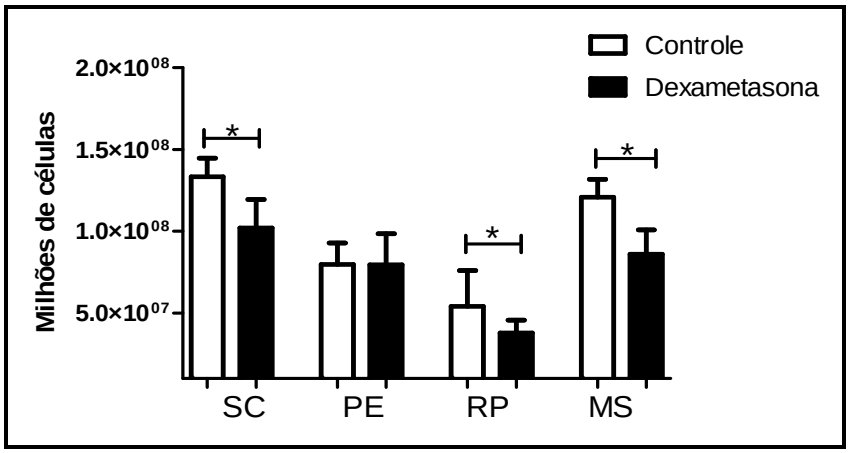
* Diferença significativa entre grupos ($P < 0,05$). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

Em relação ao diâmetro das células, o comportamento foi semelhante, com os coxins SC (CON = 42,9 ± 2,1 µm; DEX = 45,5 ± 2,0 µm), RP (CON = 49,4 ± 2,3 µm; DEX = 54,4 ± 3,9 µm) e MS (CON = 36,2 ± 3,3 µm; DEX = 40,8 ± 2,6 µm)

apresentando diâmetros estatisticamente maiores no grupo DEX (*P* < 0,05), enquanto que a gordura PE (CON = 48,7 ± 3,4 µm; DEX = 49,4 ± 2,7 µm) não apresentou diferença alguma entre os grupos (*P* > 0,05).

A celularidade, que corresponde a estimativa do número de adipócitos dos coxins adiposos, também apresentou diferença estatística nos coxins SC, RP e MS entre os grupos (*P* < 0,05); porém dessa vez, os valores foram estatisticamente menores no grupo DEX quando comparados ao grupo CON (Figura 15).

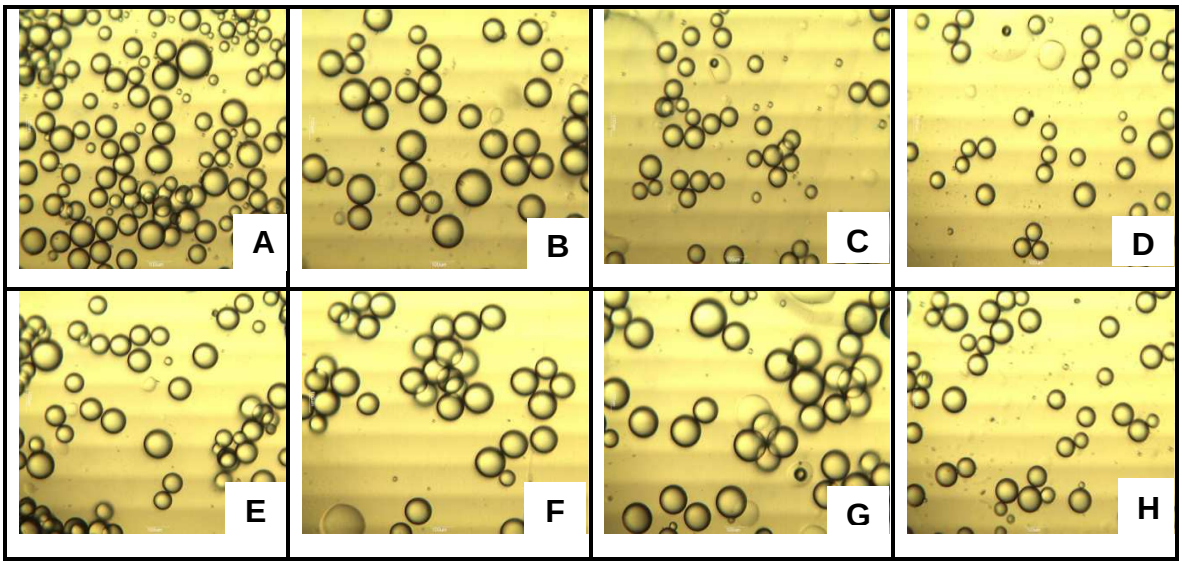
Figura 15 – Celularidade dos diferentes coxins adiposos ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

A partir dos resultados mostrados acima, em que os animais do grupo DEX apresentaram maiores volumes celulares dos adipócitos SC, RP e MS, e também apresentaram diferença entre a celularidade (menor número de células), podemos inferir que esse aumento na massa adiposa ocorreu por hipertrofia dos adipócitos. Abaixo, segue a representação do tamanho dos adipócitos nos diferentes coxins adiposos em cada um dos dois grupos (Figura 16).

Figura 16 – Representação do tamanho dos adipócitos dos diferentes coxins nos grupos.



A, B, C e D – células subcutânea, periepididimal, retroperitoneal e mesentérica do grupo controle, respectivamente; E, F, G e H – células subcutânea, periepididimal, retroperitoneal e mesentérica do grupo com excesso de glicocorticoide, respectivamente.

6.7 Testes biológicos

6.7.1 Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$

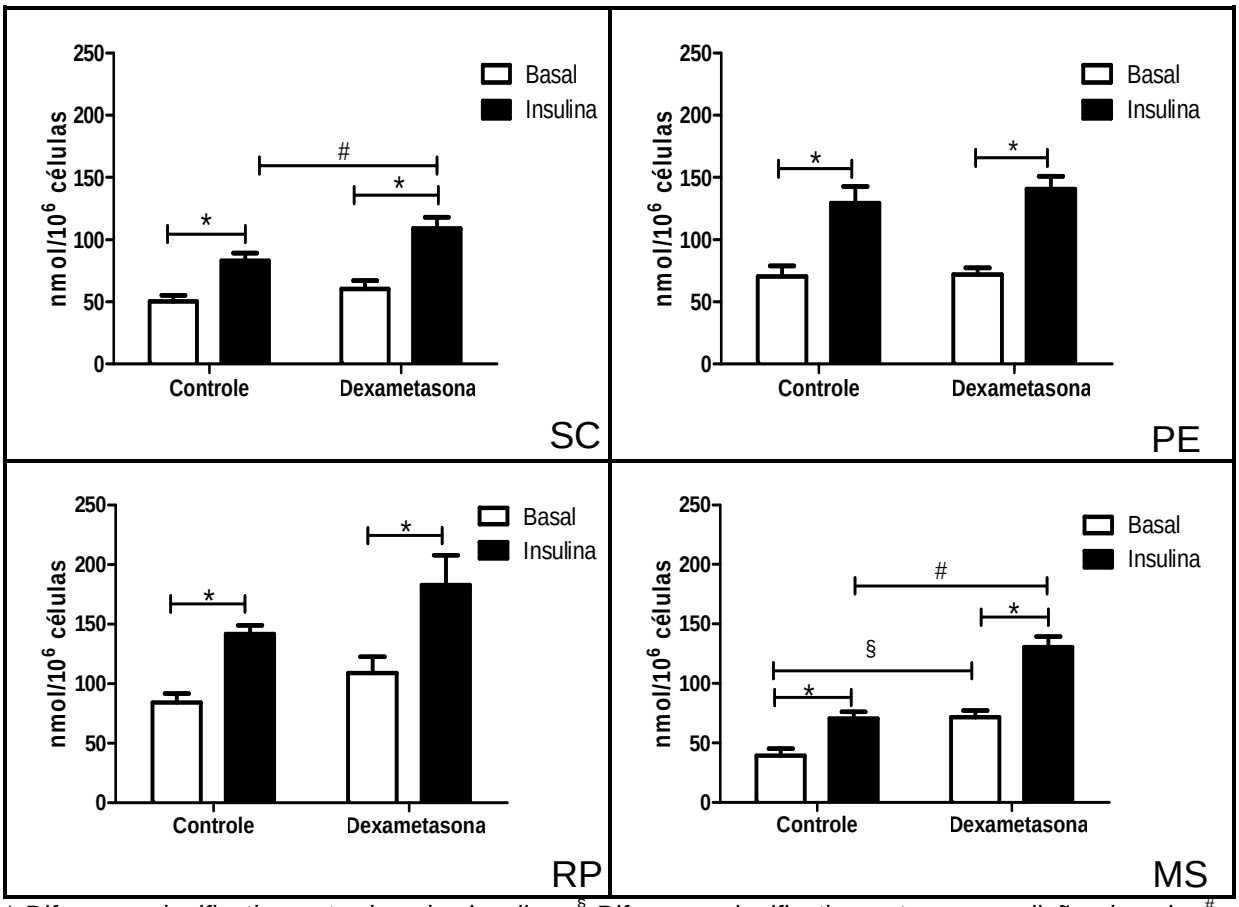
No teste de oxidação de glicose, a gordura SC apresentou diferença estatística entre os valores basal e estimulado com insulina nos dois grupos, e também houve diferença estatística nos valores maximamente estimulados entre os dois grupos ($P < 0,05$), indicando que a gordura SC do grupo DEX apresentou uma maior capacidade de oxidar glicose quando comparado com o grupo CON (Figura 17).

Já na gordura PE foi encontrada diferença somente entre o valor basal e estimulado dentro dos próprios grupos ($P < 0,05$), e não houve diferença entre os grupos em nenhum dos valores (Figura 17). A gordura RP apresentou resposta semelhante ao coxim PE, não apresentando diferença entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 17).

Já a gordura MS, além de apresentar diferença significante entre o valor basal e máximo dentro do próprio grupo, apresentou diferenças significativas entre os

valores basais e estimulados com insulina entre os grupos (*P* < 0,05) (Figura 17), indicando que o tratamento alterou a condição metabólica desse coxim.

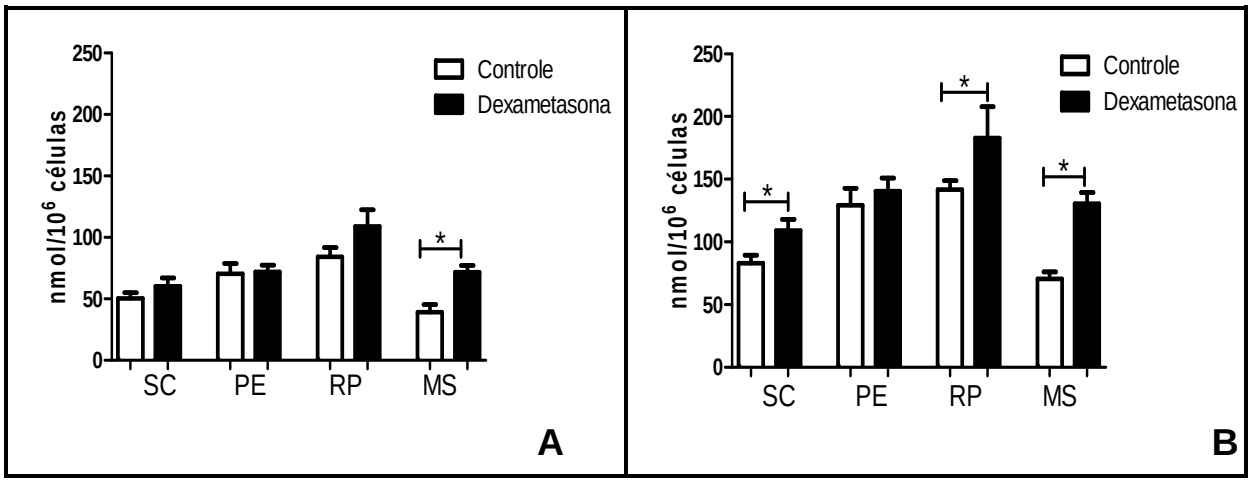
Figura 17 – Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre basal e insulina; § Diferença significativa entre as condições basais; # Diferença significativa entre as condições estimuladas (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

Outra maneira interessante de olhar os dados é comparando-os entre os diferentes coxins em uma mesma condição. Por exemplo, quando comparada somente a condição basal, somente a gordura MS apresentou diferença entre grupos, com o grupo DEX oxidando mais gordura na condição basal que o grupo CON (*P* < 0,05) Quando a mesma análise foi feita, porém na condição maximamente estimulada pela insulina, os coxins SC, RP e MS apresentaram diferença entre os grupos, mais uma vez com o grupo DEX sendo maior que o grupo controle (*P* < 0,05) (Figura 18).

Figura 18 – Oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose até $^{14}CO_2$ nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n = 10).



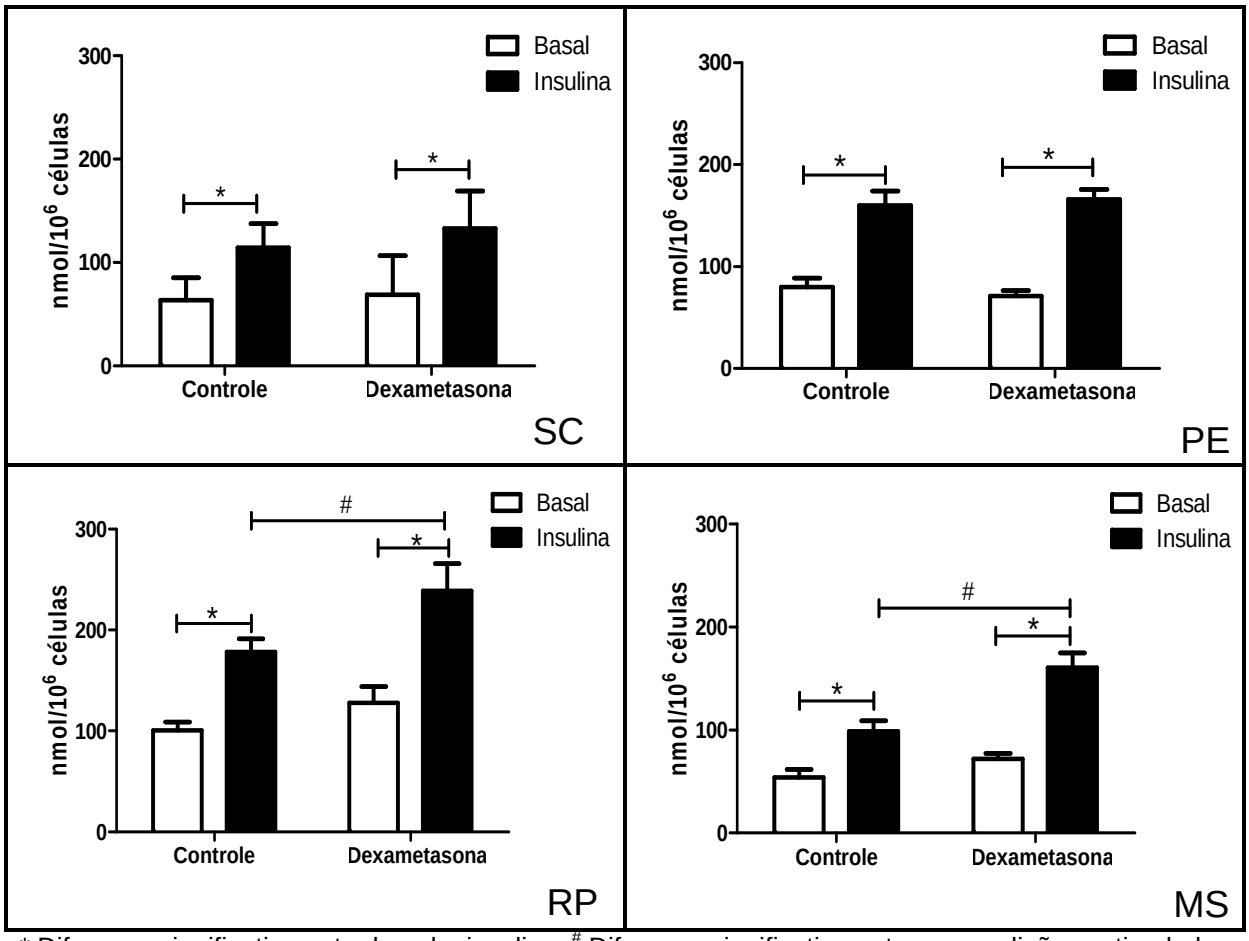
* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

6.7.2 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis

A partir desse teste podemos avaliar, a quantidade de glicose que é incorporada no TAG. Na gordura SC foi encontrada diferença estatística somente entre o basal e o estimulado com insulina em ambos os grupos (*P* < 0,05) (Figura 19). O mesmo comportamento foi observado no coxim PE (*P* < 0,05) (Figura 19).

Já nas gorduras mais viscerais, representadas pelos coxins RP e MS, além da diferença entre o valor basal e máximo nos próprios grupos, houve uma maior capacidade lipogênica no grupo DEX em relação ao grupo CON quando os mesmos foram estimulados com insulina (*P* < 0,05) (Figura 19).

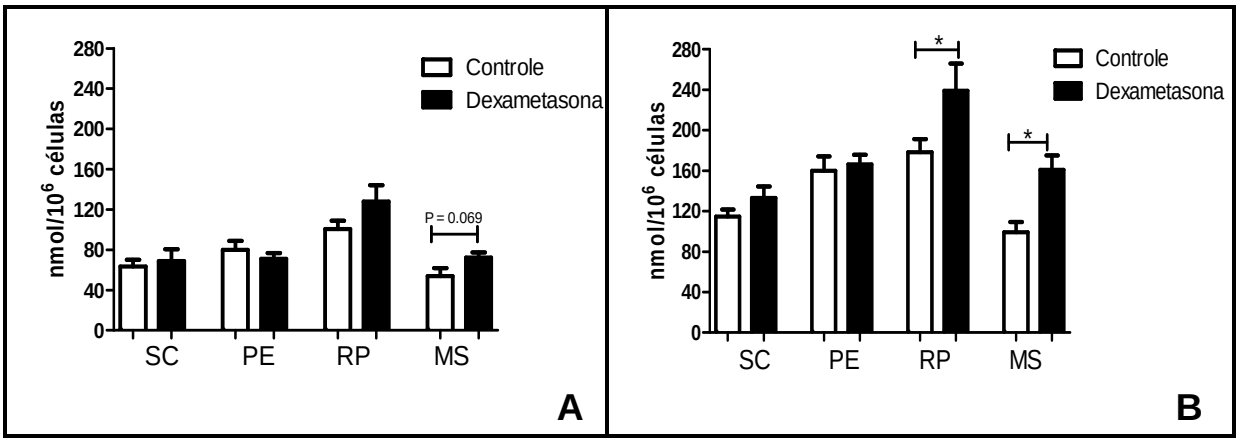
Figura 19 – Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre basal e insulina; # Diferença significativa entre as condições estimuladas (P < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

Novamente, olhando os dados de forma individual, na condição basal o grupo DEX apresentou tendência de maior lipogênese no coxim MS quando comparado com o grupo CON (P = 0,069). Já na condição estimulada pela insulina, tanto o coxim RP quanto o MS apresentara maior lipogênese no grupo DEX, indicando que os coxins mais viscerais possuíam maior capacidade lipogênica nos animais tratados com dexametasona (Figura 20).

Figura 20 – Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n = 10).



* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

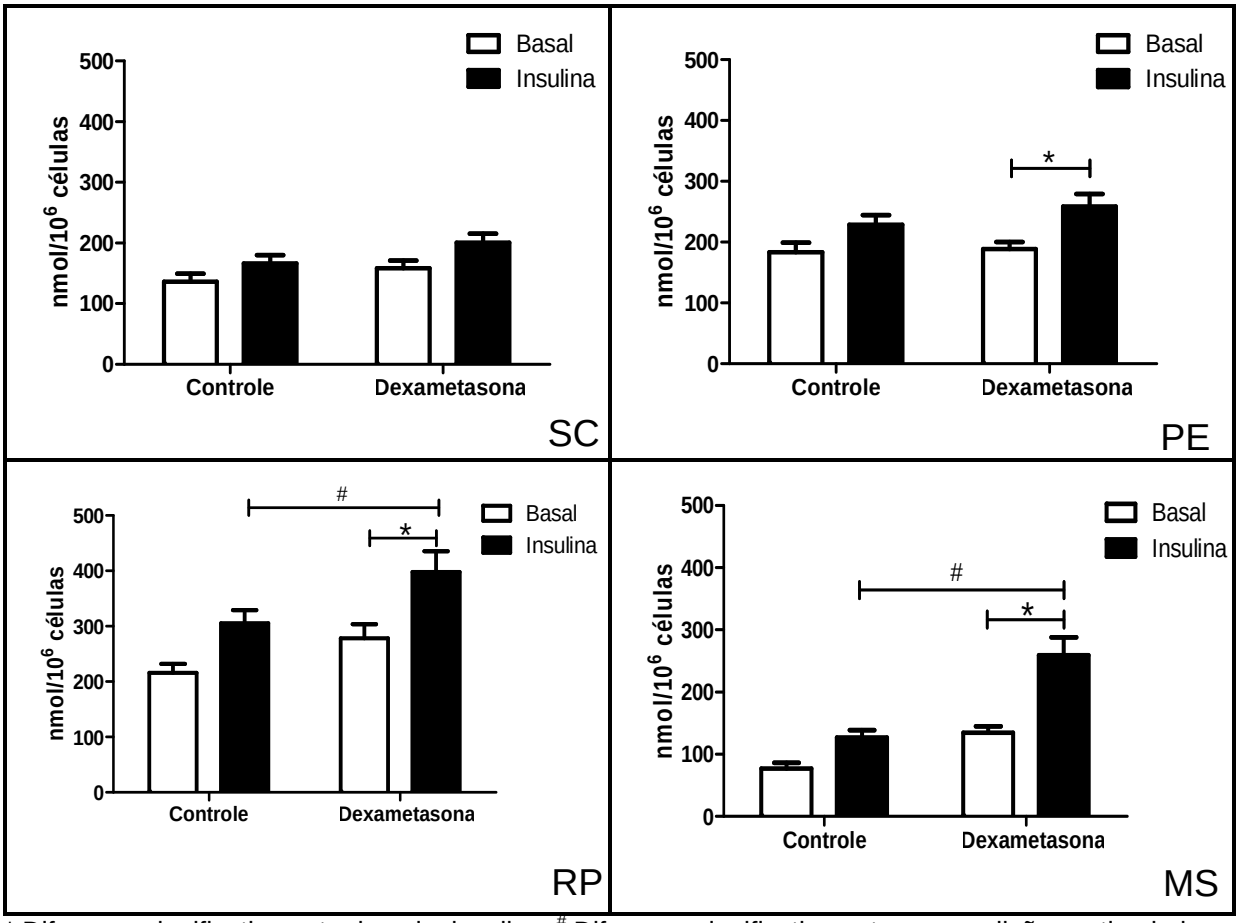
6.7.3 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis

O teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em AG livres de TAG permite a análise do que chamamos de síntese *de novo* de AG (lipogênese *de novo*), que indica a quantidade de glicose que é incorporada à porção AG do TAG.

A gordura SC não apresentou nenhuma diferença no teste, seja entre o valor basal e máximo nos grupos ou seja entre os grupos, indicando que o tratamento com glicocorticoide não influenciou esse coxim (*P* > 0,05) (Figura 21). Na gordura PE, somente foi encontrada diferença significativa entre o valor basal e o estimulado no grupo DEX (*P* < 0,05) (Figura 21).

Mais uma vez, as gorduras centrais foram as mais responsivas ao tratamento com glicocorticoide, sendo que os coxins RP e MS apresentaram diferença significativa entre seus valores basais e maximamente estimulados no grupo DEX, além desses valores estimulados serem significativamente maiores que nos animais controles (*P* < 0,05) (Figuras 21).

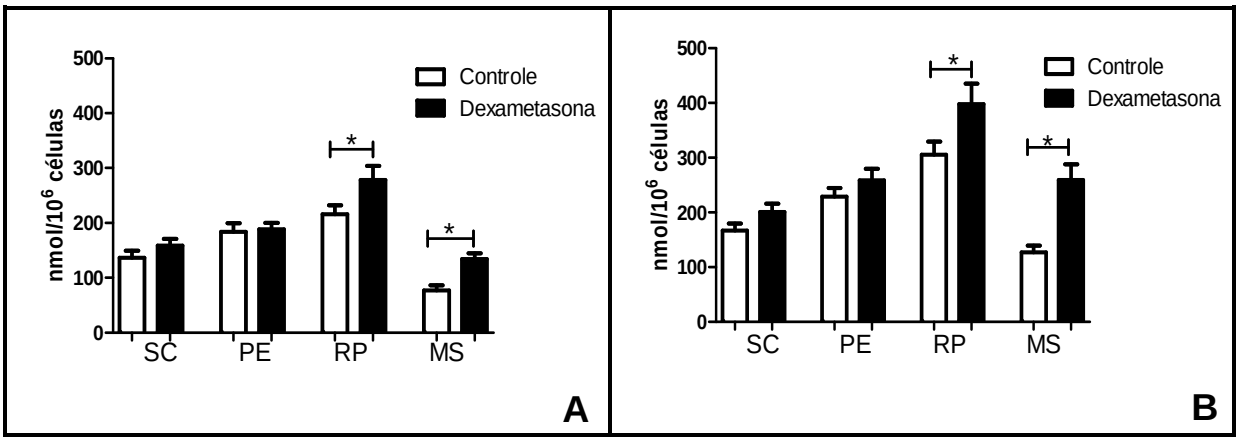
Figura 21 – Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre basal e insulina; # Diferença significativa entre as condições estimuladas (P < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

Mais uma vez, a análise separada pelas condições mostrou diferença significativa na condição basal no coxim RP e MS no grupo DEX em relação ao grupo CON (P < 0,05). Já na condição estimulada pela insulina, os coxins RP e MS apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 22).

Figura 22 – Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em ácidos graxos de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n = 10).

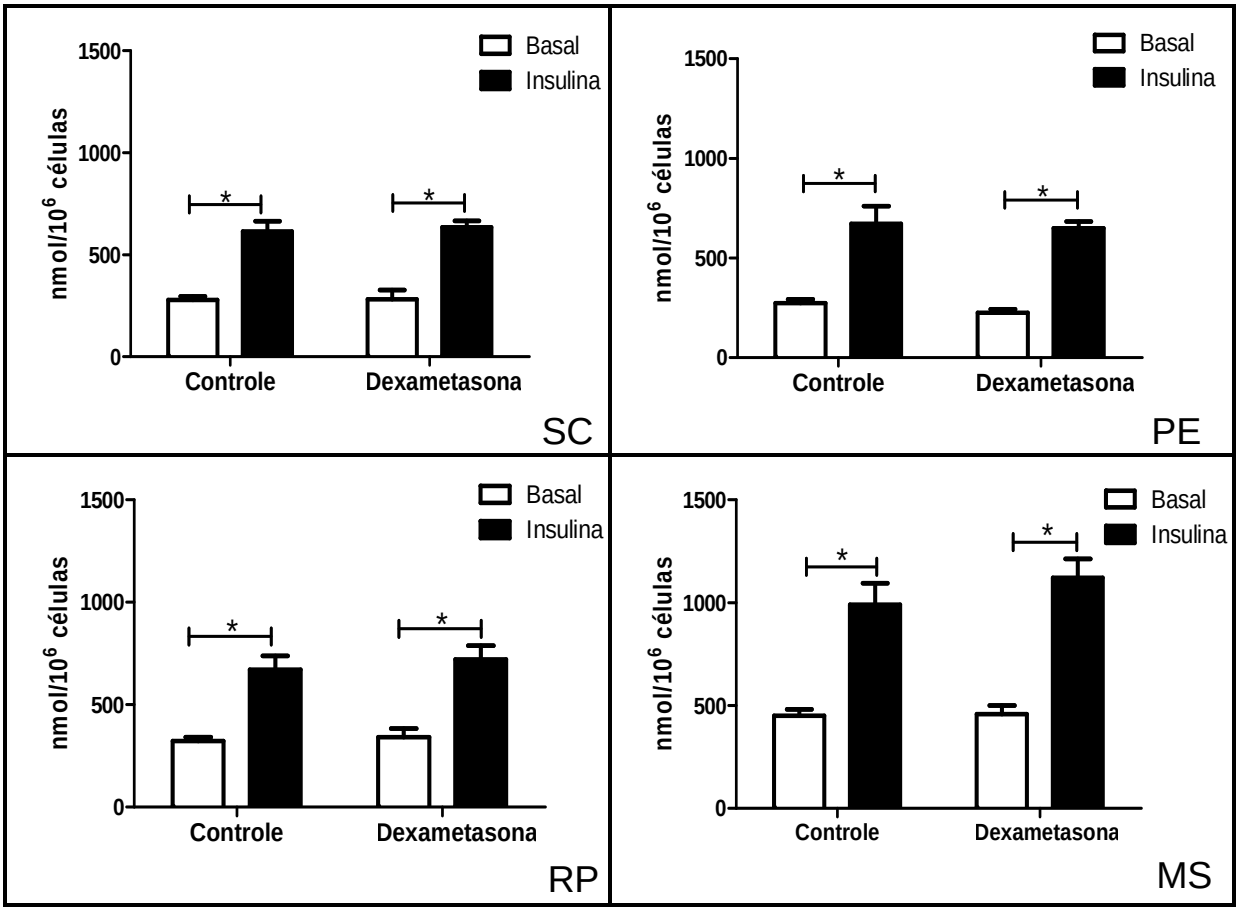


q* Diferença significativa entre grupos (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

6.7.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis

A incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em glicerol de TAG somente apresentou diferença estatística no valor basal e estimulado nos grupos (*P* < 0,05) (Figura 23). Esse comportamento foi visto nos quatro coxins adiposos estudados. A única diferença observada é em relação a amplitude de incorporação, que foi maior na gordura MS.

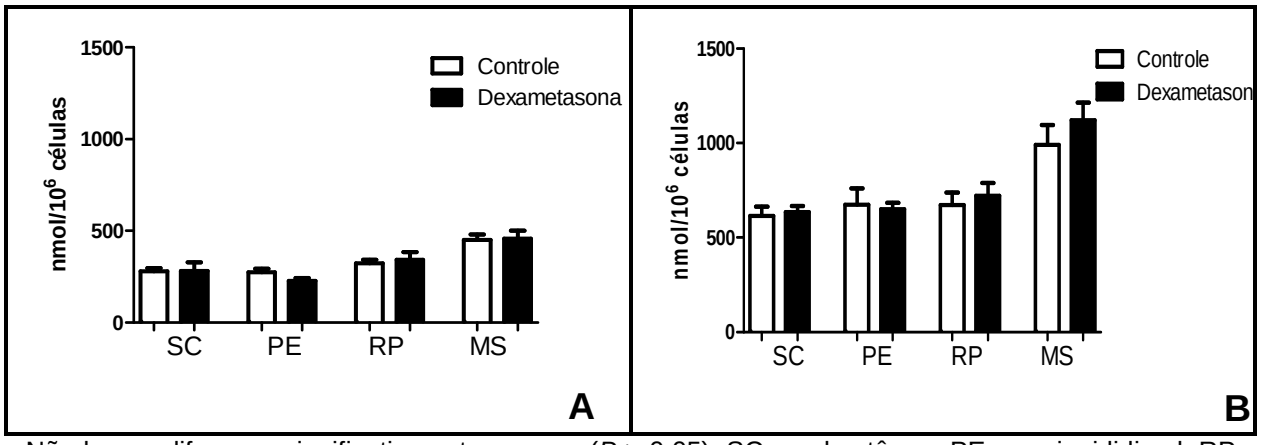
Figura 23 – Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis nas nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento (n = 10).



* Diferença significativa entre basal e insulina (*P* < 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

Analisando separadamente, tanto a condição basal, quanto a maximamente estimulada pela insulina não apresentaram diferença significante entre grupos (*P* > 0,05) (Figura 24).

Figura 24 – A incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em glicerol de triacilgliceróis nos adipócitos dos coxins adiposos SC, PE, RP e MS ao final das 4 semanas de tratamento, nas condições basal (A) e maximamente estimulada pela insulina (B) separadamente (n = 10).



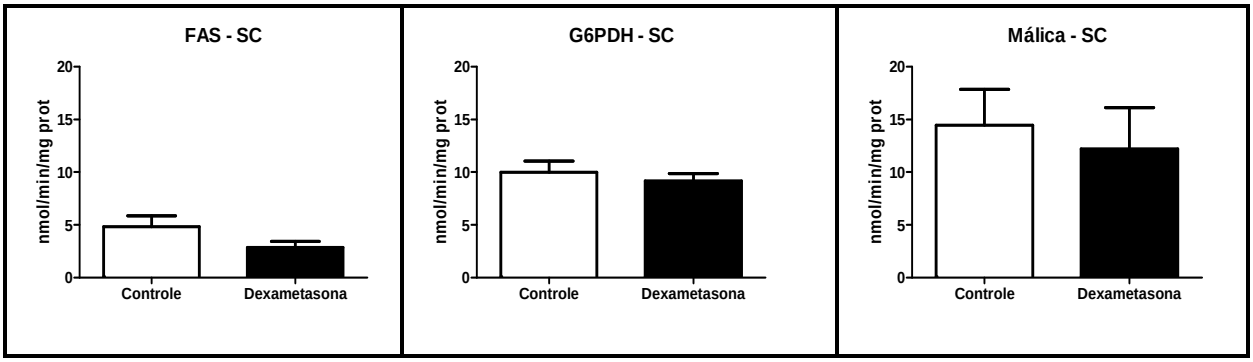
Não houve diferença significativa entre grupos (*P* > 0,05). SC – subcutâneo; PE – periepididimal; RP – retroperitoneal; MS – mesentérica. Dados estão expressos como média ± EP.

6.8 Análises enzimáticas

A via de síntese de AG apresenta uma grande quantidade de enzimas atuantes. No presente estudo, a atividade máxima de duas enzimas relacionadas com a síntese local de TAG propriamente dita (FAS) e de outras duas enzimas relacionadas com a produção de um importante cofator (NADPH) para a síntese de AG (G6PDH e EM), foi avaliada nos quatro diferentes coxins adiposos.

No coxim SC, a enzima FAS não apresentou diferença significativa entre grupos (Figura 25). Da mesma forma, as enzimas G6PDH e EM também não apresentaram diferença significativa entre os grupos (*P* > 0,05).

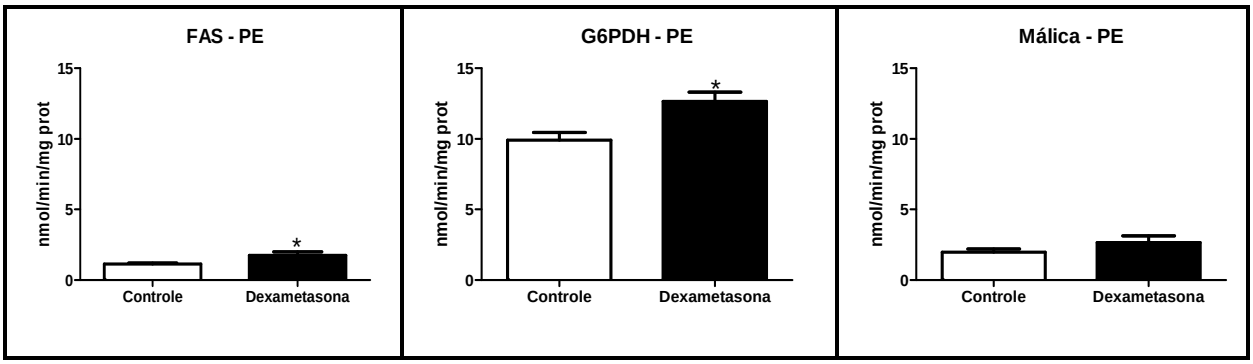
Figura 25 – Atividade enzimática máxima no tecido subcutâneo (n = 10).



Não houve diferença significativa entre grupos. (*P* > 0,05). Dados estão expressos como média ± EP. FAS – Ácido Graxo Sintase; G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase; SC – Tecido Adiposo Subcutâneo. Dados estão expressos como média ± EP.

Já no depósito PE, a atividade máxima das enzimas FAS e G6PDH foi significativamente maior no grupo DEX (*P* < 0,05). Da mesma forma que no coxim SC, a atividade máxima da enzima ACL não apresentou diferença entre os grupos (*P* > 0,05), mesmo comportamento encontrado na atividade máxima da EM (*P* > 0,05) (Figura 26).

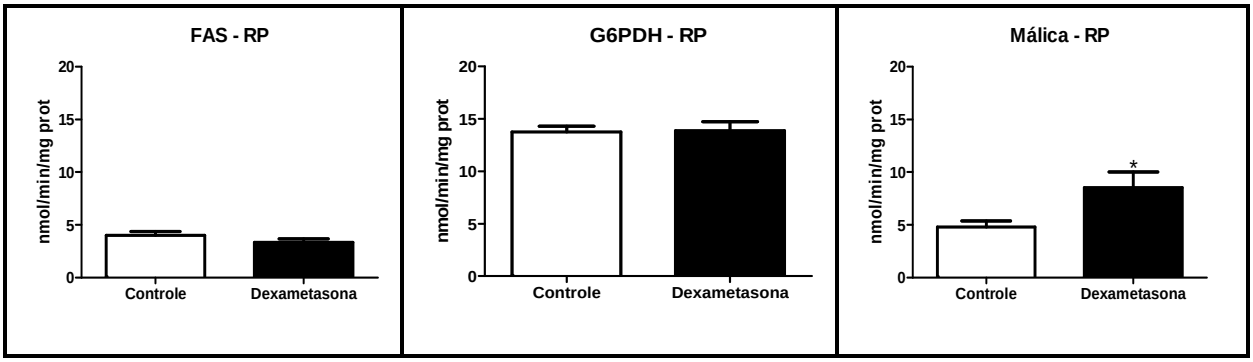
Figura 26 – Atividade enzimática máxima no tecido periepididimal (n = 10).



* diferença significativa entre grupos. (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP. FAS – Ácido Graxo Sintase; G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase; PE – Tecido Adiposo Periepididimal. Dados estão expressos como média ± EP.

No tecido retroperitoneal, não foram encontradas diferenças nas atividades máximas das enzimas FAS e G6PDH entre os grupos (*P* > 0,05), enquanto que a EM apresentou maior atividade no grupo tratado em comparação ao grupo CON (*P* < 0,05) (Figura 27).

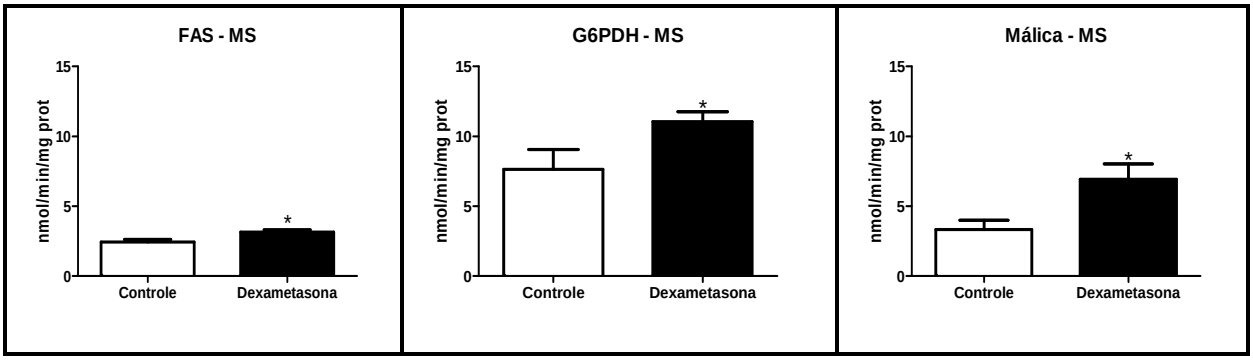
Figura 27 – Atividade enzimática máxima no tecido retroperitoneal (n = 10).



* diferença significativa entre grupos. (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP. FAS – Ácido Graxo Sintase; G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase; RP – Tecido Adiposo Retroperitoneal. Dados estão expressos como média ± EP.

Já no coxim MS, a atividade máxima de todas as enzimas foi significativamente maior no grupo DEX em relação ao grupo CON (*P* < 0,05) (Figura 28).

Figura 28 – Atividade enzimática máxima no tecido mesentérico (n = 10).



* diferença significativa entre grupos. (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP. FAS – Ácido Graxo Sintase; G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase; MS – Tecido Adiposo Retroperitoneal. Dados estão expressos como média ± EP.

A partir dos resultados das atividades enzimáticas pode-se inferir que a EM parece ter um papel fundamental provendo o cofator NAPDH para a síntese de AG nas gorduras RP e MS (viscerais).

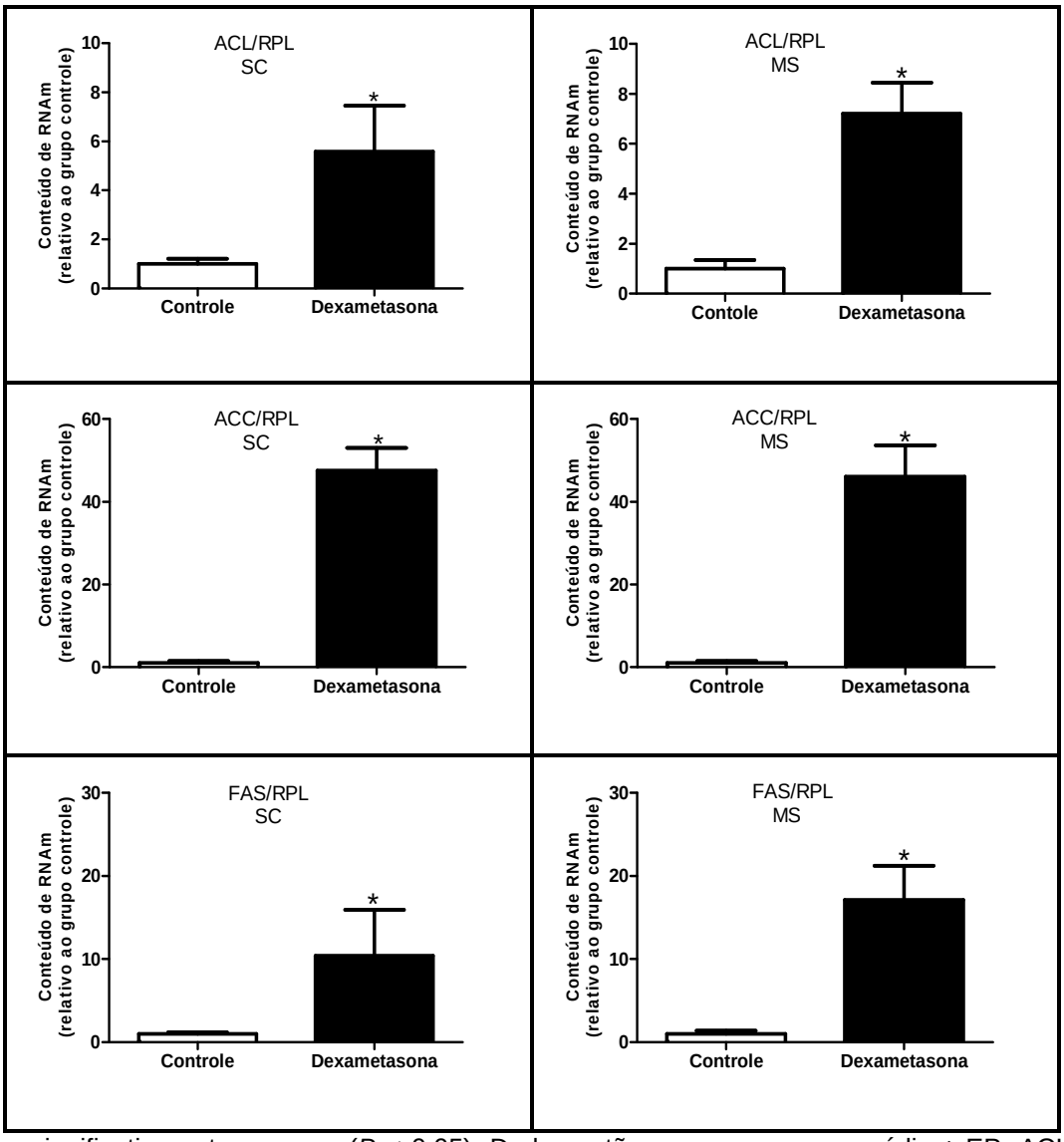
6.9 q-PCR

Após a análise da atividade enzimática máxima, verificamos que as principais diferenças foram encontradas nos coxins SC e MS, portanto a análise da expressão

gênica por qPCR de algumas das enzimas lipogênicas foi feitas somente nesses dois coxins.

Tanto no coxim SC quanto no coxim MS, a expressão gênica das enzimas envolvidas na via lipogênica propriamente dita foi significativamente maior no grupo DEX quando comparado com o grupo CON, corroborando o dado de atividade enzimática máxima (Figura 29) ($P < 0,05$).

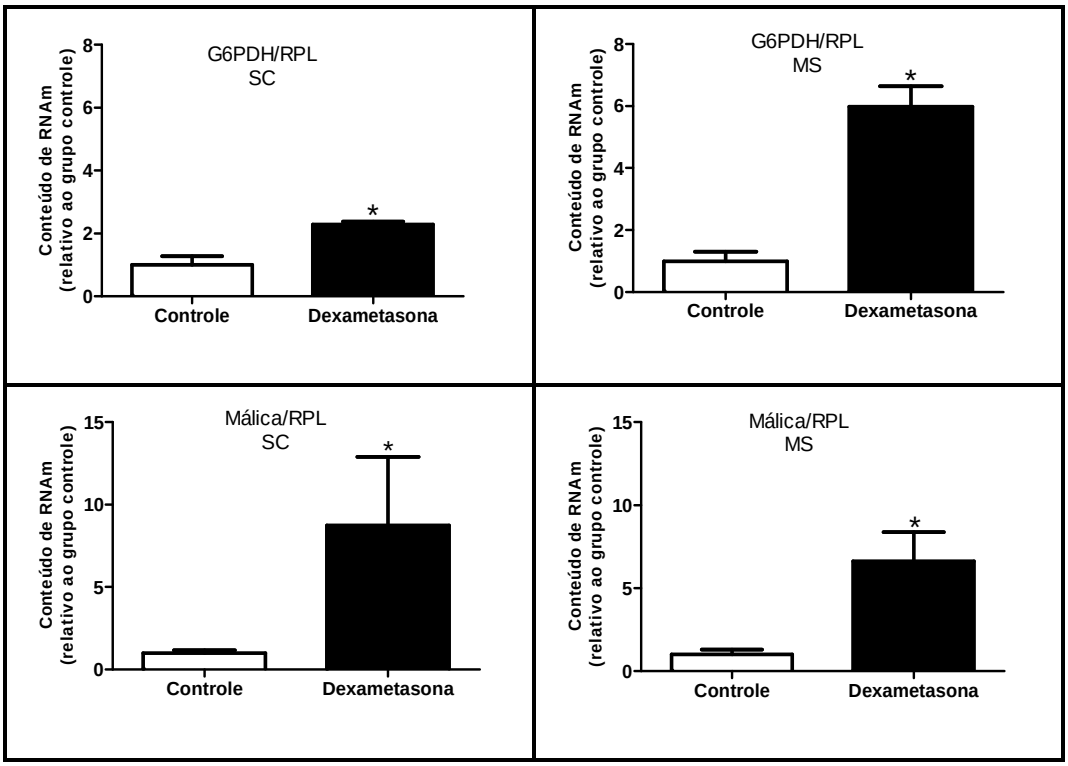
Figura 29 – Expressão gênica das enzimas lipogênicas nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n = 6).



* diferença significativa entre grupos. ($P < 0,05$). Dados estão expressos como média ± EP. ACL – ATP-citrato liase; ACC – Acetil-CoA Carboxilase; FAS – Ácido Graxo Sintase; SC – Tecido Adiposo Subcutâneo; MS – Tecido Adiposo Mesentérico. Dados estão expressos como média ± EP.

Ao analisar a expressão gênica das enzimas G6PDH e EM, que são importantes fornecedores do cofator NADPH, também foi encontrada diferença significativa em ambos os coxins adiposos estudados, sendo que a expressão gênica foi maior no grupo DEX (*P* < 0,05) (Figura 30).

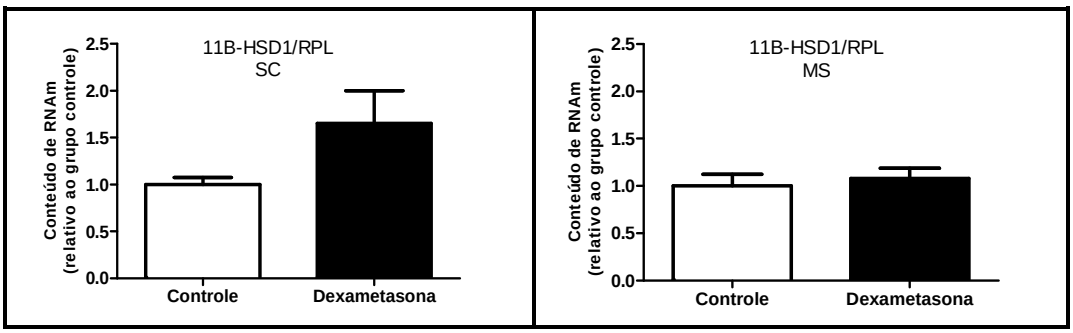
Figura 30 – Expressão gênica das enzimas G6PDH e Málica nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n = 6).



* diferença significativa entre grupos. (*P* < 0,05). Dados estão expressos como média ± EP. G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase; SC – Tecido Adiposo Subcutâneo; MS – Tecido Adiposo Mesentérico. Dados estão expressos como média ± EP.

Além das enzimas que fazem parte da síntese *de novo* de AG, a expressão gênica da enzima 11β-HSD1, que é responsável por converter a corticosterona na sua forma ativa também foi analisada. Não foi encontrada diferença entre os grupos nos dois coxins adiposos estudados (*P* > 0,05) (Figura 31).

Figura 31 – Expressão gênica da enzima 11β-HSD1 nos coxins SC e MS após 4 semanas de tratamento (n = 6).



Dados estão expressos como média ± EP. 11β-HSD1 – 11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 ; SC – Tecido Adiposo Subcutâneo; MS – Tecido Adiposo Mesentérico. Dados estão expressos como média ± EP.

7 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar as adaptações específicas das gorduras viscerais induzidas pela ação excessiva de glicocorticoides. Porém no primeiro momento, buscou-se padronizar o quadro iatrogênico de síndrome de Cushing para então investigar o papel do excesso de glicocorticoides sobre a lipogênese e síntese *de novo* de AG em diferentes territórios adiposos.

7.1 Caracterização do modelo experimental

A dexametasona é um potente glicocorticoide sintético que pode promover alterações tanto no metabolismo dos carboidratos quanto no dos lipídeos, além de atuar em outros tecidos, sendo seu efeito dose-dependente (Rafacho et al., 2008). Ao administrar um glicocorticoide exógeno, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é afetado, fazendo que, por *feedback* negativo, o hipotálamo deixe de liberar o hormônio liberador de corticotropina, responsável pela síntese do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), deixando este de atuar sobre a glândula adrenal. Uma vez que as adrenais não são mais estimuladas pelo ACTH, ocorre atrofia.

Como um dos objetivos do estudo era padronizar o quadro de síndrome de Cushing, uma das principais características, a atrofia das adrenais, realmente se verificou no grupo DEX. Além da atrofia das glândulas, espera-se que as concentrações séricas de corticosterona dos animais do grupo DEX estejam significativamente menor que no grupo CON. Esse menor valor plasmático de corticosterona foi verificado nos animais tratados com dexametasona, corroborando outros estudos que também usaram a dexametasona como glicocorticoide exógeno (Rafacho et al., 2008; Zakrzewska et al., 1999), sendo que os valores plasmáticos de corticosterona no presente estudo reduziram em torno de 58%. Dessa forma, o tratamento aplicado parece ter atingido o efeito esperado no que diz respeito à concentração de corticosterona.

Entre os outros efeitos da dexametasona está a perda de peso corporal. Há estudos indicando uma tendência de perda de peso corporal em animais tratados com dexametasona (Bouillon et al., 1980; Severino et al., 2002), enquanto outros verificaram uma perda de peso significante (Barel et al., 2010). No presente estudo,

os animais tratados com dexametasona não apresentaram diferença no peso corporal ao longo das 4 semanas de tratamento quando comparando os dados brutos. No entanto, ao comparar o ganho de peso (peso final – peso inicial), essa diferença ficou evidente, com o grupo DEX ganhando apenas 6 g de peso corporal comparado com o grupo CON (que ganhou 46 g), corroborando os resultados de outros estudos na literatura (Barel et al., 2010; Campbell et al., 2011).

Já foi mostrado que os glicocorticoides aumentam a expressão do gene *ob* e a secreção de leptina *in vivo* em ratos (Bradley, Cheatham, 1999; Murakami et al., 1995). A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo, que sinaliza o status das reservas energéticas ao sistema nervoso central para regular o apetite e o gasto energético (Villanueva, Myers, 2008). No presente estudo, não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos, porém os animais que receberam dexametasona apresentaram uma tendência a comer menos que o grupo controle. Campbell et al. (2011) também verificaram que os animais que receberam um *pellet* com corticosterona consumiram menos ração que os controles. Interessantemente, os animais do grupo DEX também apresentaram uma tendência a ingerir menos água que o grupo CON.

A redução na ingestão alimentar e do peso corporal em animais tratados com dexametasona já foram reportados em outros estudos (Barel et al., 2010; Jahng et al., 2008; Novelli et al., 2008), e é mostrada estar relacionada com aumento nos níveis circulantes de leptina. Nossos resultados corroboram a literatura, uma vez que os animais do grupo DEX apresentaram maiores níveis circulantes de leptina. A leptina atua em neurônios orexígenos (neuropeptídeo Y [NPY] e peptídeo relacionado ao gene Agouti) e anorexígenos (hormônios estimulante de melanócito alfa e transcrito regulado por cocaína e anfetamina) localizados no núcleo arqueado, regulando a ingestão alimentar. Foi mostrado que a dexametasona diminui os níveis de NPY no núcleo arqueado quando administrada intraperitonealmente, e dessa forma, diminuiu a ingestão alimentar dos animais. Por outro lado, quando a dexametasona é infundida de forma intracerebroventricular, os animais apresentam aumento na ingestão e peso corporal, aumentando os níveis desse neurônio (Zakrzewska et al., 1999). Portanto, a forma de indução dos glicocorticoides também parece influenciar a resposta de ingestão alimentar do organismo.

A literatura também registra que o tratamento com glicocorticoides aumenta a liberação de leptina pelo tecido adiposo (Bradley et al., 1999; Jahng et al., 2008). Dessa forma a tendência de maior quantidade de tecido adiposo encontrada nos animais tratados com dexametasona pode estar contribuindo para essa maior concentração de leptina plasmática.

Vários estudos já demonstraram que os glicocorticoides diminuem a concentração e a expressão da adiponectina (hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo), tanto *in vitro* quanto em modelos animais (Fasshauer et al., 2002; Shi et al., 2010). Ao analisar os dados de adiponectina plasmática dos animais tratados com dexametasona, ficamos surpresos com a alta concentração plasmática encontrada nesses animais. Contudo, essa alta concentração plasmática de adiponectina corrobora os dados de Shinahara et al. (2009) que também verificaram altos níveis plasmáticos de adiponectina em camundongos transgênicos que superexpressavam CRH, porém seus níveis de RNAm estavam diminuídos. Uma possível explicação para esse resultado é que os glicocorticoides de alguma forma inibiram a degradação da adiponectina plasmática ou induziram resistência à adiponectina, o que mantém seus níveis aumentados. Outras análises são necessárias para a confirmação dessas suposições.

Além da influência sobre o peso corporal, os glicocorticoides podem atuar sobre o metabolismo da glicose, dos lipídeos e das proteínas, sendo a atrofia das fibras musculares uma das características mais predominantes (Ahtikoski et al., 2004; Fernandez-Rodriguez et al., 2009). No presente estudo, o peso do músculo sóleo entre os grupos apresentou diferença estatística, porém quando esse dado foi corrigido pelo peso corporal essa diferença desapareceu. Esse resultado está de acordo com Barel et al. (2010), que também não verificaram diminuição no peso do músculo sóleo de ratos submetidos tanto ao tratamento com dexametasona (1 mg/kg/d, ip, 10 dias), quanto ao exercício físico (corrida em esteira à 60% da capacidade física, 8 semanas); enquanto que o peso dos músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos foi diminuído pelo tratamento com esse glicocorticoide, demonstrando que a dexametasona atinge principalmente músculos com predominância de fibras brancas. Outra característica do excesso de glicocorticoides observada nos nossos animais foi o menor comprimento naso-anal, demonstrando os efeitos dos glicocorticoides sobre o crescimento.

O excesso de glicocorticoides é frequentemente usado para induzir resistência à insulina farmacológica em ratos, levando-se em consideração a dose e o tempo de administração (Angelini et al., 2010; Rafacho et al., 2008; Severino et al., 2002). No presente estudo, após 3 semanas de tratamento, os animais que receberam dexametasona não apresentaram essa característica a julgar pelo resultado do teste de tolerância à insulina intravenosa. Esse resultado corrobora os de Novelli et al. (2008), que trataram animais durante três semanas com dexametasona (0,125 mg/kg pc) e também não encontraram resistência à insulina. Porém, após a quarta semana de tratamento (chegando ao final do período experimental), os valores de insulina plasmática foram significativamente maiores nos animais tratados, indicando que eles se tornaram resistentes à insulina. Esses dados realmente refletem o quadro de resistência à insulina induzida pelos glicocorticoides, em que há hiperglicemia e hiperinsulinemia moderada (Zakrzewska et al., 1999).

Ao analisar mais especificamente a curva do teste de oGTT, verifica-se que há um aumento inicial da glicemia, e, ao final do teste, os animais de ambos os grupos apresentam o mesmo valor de glicemia. Adicionalmente, a área sob a curva entre os pontos 0 a 15 minutos foi maior nos animais tratados com dexametasona quando comparado aos controles (Figura 10). Essa maior concentração de glicose no início do teste poderia estar relacionado com a perda da primeira fase de liberação de insulina, e um aumento da segunda fase de liberação. Estudos usando modelo animal e humanos já relataram que a perda desse primeiro pico de liberação de insulina está diretamente relacionado com o surgimento de diabetes mellitus tipo 2 (Del Prato, Tiengo, 2001). No presente estudo, também foram analisadas as concentrações plasmáticas de insulina ao longo do teste de oGTT (tempos 0, 15, 30 e 60), e foi verificado que o grupo DEX apresentava maior área sob a curva de liberação de insulina durante o teste que os animais controles, indicando que o excesso de glicocorticoides atuou de alguma forma alterando a liberação de insulina.

Rafacho et al. (2008, 2009) demonstraram que ratos tratados com diferentes doses de dexametasona (0,1; 0,5 e 1 mg/kg/d), durante 5 dias apresentaram aumento na massa, no tamanho, na proliferação e na apoptose de células beta pancreáticas, além de aumento na secreção de insulina dessas células quando

estimulada pela glicose, sendo essas alterações dose-dependentes. Podemos especular que essas sejam algumas das causas para a maior concentração de insulina plasmática durante o teste de oGTT encontrados no presente estudo. De forma geral, os glicocorticoides parecem promover perda da primeira fase de secreção de insulina e aumento da segunda fase; entretanto, essa hipótese deve ser vista com cautela, uma vez que essa primeira fase de liberação é esperada ocorrer em torno de 5 minutos após o estímulo com glicose, e durante o teste de oGTT o primeiro ponto foi coletado apenas aos 15 minutos. Porém, o aumento da concentração de insulina ao longo do teste indica um aumento na segunda fase de liberação.

Por muitos anos, já foi mostrado que os glicocorticoides podem causar hipertrigliceridemia tanto em humanos quanto em animais (Bagdade et al., 1976; Chanson, Salenave, 2010; Elshourbagy et al., 1985). No presente estudo, os animais tratados com dexametasona apresentaram quadro de hipertrigliceridemia confirmando os achados já estabelecidos. Essa hipertrigliceridemia e maior concentração de VLDL-c plasmático podem ser devido a estimulação da liberação de VLDL-c e triglicérides hepático em decorrência da deposição de gordura ectópica no fígado e músculo esquelético, sendo essa em função de uma maior disponibilidade de AG livres circulantes (Bagdade et al., 1976). Infelizmente não foi possível analisar as concentrações de AG livres plasmáticos nesses animais para confirmar essa suposição.

Além de hipertrigliceridemia, nossos animais também apresentaram hipercolesterolemia. Já foi reportado que a administração de glicocorticoides para ratos resulta em aumento de VLDL-c plasmático (Bagdade et al., 1976), e o mecanismo mais provável pelo qual os glicocorticoides influenciam os níveis de lipídeos plasmáticos é por mudança na expressão de genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas (Staels et al., 1991; Taylor et al., 1996). Além de altas concentrações de colesterol total, LDL-c e VLDL-c, os níveis de HDL-c também estavam elevados nos animais tratados com dexametasona. Taylor et al. (1996) verificaram que os glicocorticoides aumentaram os níveis da apolipoproteína A-I, que é um dos principais componentes da molécula de HDL-c. Apesar do aumento nos níveis de HDL-c serem correlacionados com efeitos cardioprotetores, no presente estudo esse benefício deve ser visto com certa cautela, pois os

glicocorticoides promoveram aumento nos níveis de HDL-c, mas também de LDL-c e VLDL-c, os quais neutralizam os efeitos benéficos do HDL-c.

Além dos pontos considerados até o momento, devemos observar também que a adiposidade visceral é um dos fatores para a pré-disposição à resistência à insulina (Korach-André et al., 2005; Wajchenberg, 2000). Além disso, já se sabe que os glicocorticoides promovem acúmulo de gordura na região visceral do corpo em detrimento a periferia (Macfarlane et al., 2009). Ao analisar o peso bruto dos coxins adiposos no presente estudo, não foi verificado diferença de peso entre eles, porém ao analisar o peso dos coxins adiposos relativo ao peso corporal, as gorduras PE, RP e MS (representantes das chamadas gorduras viscerais), tenderam a ser maior no grupo tratado com glicocorticoide, enquanto que a gordura SC permaneceu igual. Já é amplamente sabido que os diferentes coxins adiposos possuem características distintas, o que pode favorecer o acúmulo ou “quebra” de gordura. Dessa forma, essas respostas encontradas no peso dos coxins adiposos podem estar relacionadas com as diferenças metabólicas, enzimáticas e de expressão gênica entre eles (Einstein et al., 2005; Lafontan, Berlan, 2003; Palou et al., 2009; Palou et al., 2010).

O tamanho das células adiposas também apresentou diferenças entre os grupos. As células adiposas das gorduras SC, RP e MS foram maiores no grupo DEX que no grupo CON, enquanto que na gordura PE não houve diferença. O mesmo foi verificado no volume dessas células; enquanto que a celularidade, que corresponde ao número estimado de células, foi estatisticamente menor nesses mesmos coxins no grupo tratado. Já se sabe que o aumento do tecido adiposo pode ocorrer por dois processos, hipertrofia (que corresponde ao aumento do volume da célula) e hiperplasia (que corresponde a o aumento do número de células) (Ailhaud et al., 1992). No presente estudo, ao correlacionar os resultados dos animais do grupo DEX, que apresentaram maiores volumes das células adiposas nos coxins SC, RP e MS, concomitantemente com menor número de células, podemos afirmar que houve hipertrofia dos adipócitos, e não hiperplasia; confirmando mais um dos efeitos dos glicocorticoides sobre o TAB (Rebuffé-Scrive et al., 1985; Rebuffé-Scrive et al., 1988). Além disso, esse aumento no tamanho das células do grupo tratado pode refletir o início da disfunção dessas células, uma vez que, já se sabe que o

aumento exacerbado no tamanho dos adipócitos os tornam disfuncionais e patogênicos (Weyer et al., 2000).

Masuzaki et al. (2001) em seu modelo transgênico de síndrome metabólica, verificaram que em animais que superexpressavam a enzima 11β-HSD1, essa enzima não estimulava a diferenciação dos pré-adipócitos, ao invés disso, promovia aumento no seu tamanho causando hipertrofia dos adipócitos viscerais. Além disso, essa hipertrofia dos adipócitos pode estar relacionada com a quantidade de interleucina-1β, uma vez que é mostrado que essa citocina poderia diminuir o potencial adipogênico no tecido adiposo por afetar fatores de transcrição como PPARγ (Speaker, Fleshner, 2012). Essas podem ser algumas das explicações para a maior hipertrofia verificada nos animais tratados com dexametasona no nosso estudo.

7.2 Respostas fisiológicas frente ao excesso de glicocorticoides

Os objetivos principais do projeto relacionam-se com ensaios biológicos para determinação da oxidação e incorporação de glicose em TAG (lipogênese) e em suas frações: ácido graxo (síntese *de novo* de AG) e glicerol. Poucos estudos na literatura buscaram verificar o papel dos glicocorticoides na lipogênese, tanto em humanos, ratos e cultura de células (Bouillon, Berdanier, 1980; Campbell et al., 2011; Galton, Wilson, 1971; Gathercole et al., 2011; Wilson, Galton, 1972), e nenhum deles foi conclusivo, devido entre outros, a diferentes doses de glicocorticoides utilizadas nesses estudos. Enquanto alguns verificaram aumento na incorporação de glicose em lipídeos após tratamento com glicocorticoides (Bouillon, Berdanier, 1980), outros encontraram que os efeitos do tratamento com glicocorticoides se dão sobre a adipogênese, e não sobre a lipogênese (Campbell et al., 2011). Outros ainda observaram que altas doses de glicocorticoides diminuem a lipogênese em cultura de células (Gathercole et al., 2011). Assim, ainda há certa contradição sobre os efeitos dos glicocorticoides sobre a reposta lipogênica no TAB.

A oxidação de glicose compreende três passos metabólicos, a saber, glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória, liberando ao final CO_2 e água. Essa via demonstra o estado metabólico da célula. No presente estudo, ambos grupos (CON e DEX) apresentaram diferença significativa entre os valores basais e maximamente

estimulados nos coxins adiposos das quatro regiões (SC, PE, RP e MS). Além disso, os coxins SC e MS apresentaram diferença significativa entre os grupos nos valores maximamente estimulados, e o coxim MS apresentou também diferença entre os valores basais entre grupos. Nossos resultados corroboram àqueles encontrados por Deveaud et al. (2004), que demonstraram em adipócitos isolados de ratos, que o depósito PE (que representa um depósito visceral) possui maior capacidade oxidativa que o depósito SC. Essa maior capacidade foi demonstrada pela atividade da succinato desidrogenase, citrato sintase, citocromo oxidase c, além de maior consumo de oxigênio por esses adipócitos.

Quando os valores de oxidação foram analisados separadamente (considerando os coxins adiposos de forma distinta entre os grupos), na condição basal o coxim MS apresentou maior oxidação no grupo DEX quando comparado ao grupo CON. Já na condição estimulada pela insulina, além do coxim MS, os coxins SC e RP também apresentaram maiores valores no grupo tratado em relação ao grupo controle. Dessa forma podemos concluir que os glicocorticoides atuam de maneira semelhante sobre a oxidação da glicose tanto na gordura mais periférica quanto na mais visceral quando estimulada pela insulina.

No presente estudo, foi encontrada diferença na lipogênese (incorporação de glicose em TAG) em ambos os grupos entre os valores basais e máximos, nos quatro coxins adiposos. Além disso, foi encontrada diferença significativa entre os valores maximamente estimulados nas gorduras RP e MS, sendo maior no grupo DEX. Já foi mostrado que os coxins adiposos denominados “viscerais”, representados pelas gorduras PE, RP e MS são mais suscetíveis a ação dos glicocorticoides (Macfarlane et al., 2009; Wajchenberg et al., 2002). No entanto, nossos resultados diferem daqueles encontrados por Campbell et al. (2011), que não verificaram diferença na lipogênese (porém seu estudo foi feito em cultura de células 3T3-L1 incubadas com corticosterona). A diferença encontrada na incorporação de glicose em TAG, principalmente nos coxins RP e MS, pode ser explicada pela maior quantidade de receptores para glicocorticoides encontrados nesses depósitos (Wajchenberg et al., 2002), concomitante com uma maior afinidade desses receptores pelo glicocorticoide (Sjögren et al., 1994). A partir dessa maior quantidade e afinidade dos glicocorticoides pelo seu receptor, esses podem ter promovido maior expressão de genes envolvidos na resposta lipogênica da

célula, seja de forma direta e/ou indireta, como, por exemplo, aumento nas enzimas lipogênicas ou de fatores transcricionais para essas enzimas (SREBP1c, por exemplo) (Berdanier, 1989; Drake et al., 2010).

Novamente quando esses dados foram analisados separadamente, na condição basal somente o coxim MS apresentou tendência (*P* = 0,069) de maior incorporação de glicose em TAG no grupo DEX quando comparado ao grupo CON; enquanto que na condição estimulada, tanto o coxim RP quanto MS incorporaram mais glicose em TAG no grupo tratado. Já foi mostrado que os glicocorticoides inibem a atividade da AMPK no TAB visceral (Christ-Grain et al., 2008; Kola et al., 2008). Uma vez que esse AMPK é um sensor energético celular, sua menor atividade “ativa” vias anabólicas celulares o que poderia favorecer o aumento da lipogênese nos coxins viscerais. Infelizmente, não foi possível analisar os níveis e a expressão de AMPK no presente trabalho para confirmar essa suposição.

Quando analisada a incorporação de glicose na porção AG de TAG, que permite inferir a síntese *de novo* de AG, somente as gorduras RP e MS apresentaram diferença entre os valores basal e máximo no grupo DEX, e também apresentaram diferença significativa entre os valores maximamente estimulados, com o grupo DEX apresentando o maior valor. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Wang et al. (2004), demonstrando que a maior síntese *de novo* de AG em cultura de células primarias humanas está relacionada com aumento da atividade da enzima FAS, especialmente quando as células foram incubadas com insulina e dexametasona. Também em cultura de células, Gathercole et al. (2011) verificaram aumento da lipogênese quando essas foram incubadas com baixa dose de dexametasona, sendo essa resposta melhorada quando a insulina estava presente.

Também ao analisar separadamente os dados, mesmo na condição basal os coxins RP e MS apresentaram maior síntese *de novo* de AG no grupo DEX, sendo que o mesmo comportamento se repetiu na condição estimulada pela insulina. Esses dados demonstram que mesmo sem a presença da insulina, os glicocorticoides apresentaram um efeito permissivo sobre as células, facilitando a incorporação da glicose em AG, provavelmente atuando sobre a expressão e atividade de enzimas atuantes nessa via.

Vários estudos já demonstraram que os glicocorticoides alteram a atividade das enzimas lipogênicas, seja aumentando ou diminuindo sua atividade (Bouillon, Berdanier, 1980; Diamant, Shafrir, 1975; Volpe, Marasa, 1975; Wang et al., 2004). No presente trabalho, três enzimas participantes da síntese *de novo* de AG foram analisadas, e o resultado foi curioso. O único coxim a responder ao tratamento, aumentando a atividade das três enzimas estudadas foi o coxim MS. Sabe-se que esse coxim apresenta maior quantidade de receptores de glicocorticoide (Wajchenberg et al., 2002) e maior afinidade pela dexametasona (Sjögren et al., 1994) que os outros, e esse aumento pode estar relacionado com o efeito do corticoide sobre o TAB.

Os glicocorticoides promovem seus efeitos através da ligação a elementos responsivos no núcleo celular promovendo, entre outras coisas, a transcrição de genes (Stahn et al., 2007). A expressão gênica das enzimas lipogênicas estudadas no presente trabalho estavam aumentadas tanto no coxim SC quanto no MS no grupo DEX, corroborando estudos da literatura que também encontraram aumento na expressão gênica de enzimas lipogênicas em resposta ao tratamento com glicocorticoides (Drake et al., 2010; Gathercole et al., 2011). No coxim MS, esse resultado de maior expressão gênica das enzimas lipogênicas foi refletido nos resultados da atividade enzimática encontrados nesse mesmo coxim. Um dado interessante é que a magnitude de aumento na expressão gênica da enzima G6PDH no grupo DEX foi maior no coxim MS que no coxim SC. Isso demonstra a importância das enzimas responsáveis por fornecer cofatores reduzidos para a via de síntese *de novo* de AG em resposta ao tratamento com excesso de glicocorticoides no tecido adiposo visceral.

Fato interessante é que a enzima responsável pela conversão de cortisona em cortisol (em humanos) e 11-desoxicorticosterona em corticosterona (em ratos), a 11β-HSD1, necessita do cofator NADPH para realizar a reação (White et al., 2007). Dessa forma, poderíamos inferir que a maior atividade da EM encontrada nos coxins RP e MS, e da enzima G6PDH no coxim MS, poderiam, além de atuar na síntese *de novo* de AG, prover cofatores para a conversão de corticosterona, e dessa forma, aumentar a atividade lipogênica desses depósitos. Porém, quando a expressão gênica da 11β-HSD1 foi analisada, não houve diferença entre os grupos tanto no coxim SC quanto no coxim MS. Apesar de alguns dados da literatura relacionarem a

concentração de glicocorticoides com aumento da atividade e expressão da enzima 11β-HSD1 (Bujalska et al., 2002; Bujalska et al., 2006; Seckl, Walker, 2001), o tratamento empregado no presente trabalho não foi suficiente para promover qualquer alteração na expressão gênica dessa enzima. Outros estudos também encontraram resposta diferenciada na atividade e expressão dessa enzima, como por exemplo, Balachandran et al. (2008), que verificaram que o tratamento de células 3T3-L1 com dexametasona diminuiu a atividade e a expressão da enzima 11β-HSD1.

Outro ponto para ser considerado nessa maior síntese *de novo* de AG, é a concentração plasmática de triglicérides e colesterol total. No presente trabalho, os animais tratados com dexametasona apresentaram maiores valores de triglicérides e colesterol total comparado aos controles. Esses podem ser hidrolisados pela LPL, que já foi mostrada estar aumentada em resposta ao tratamento com glicocorticoides (Macfarlane et al., 2009), para posteriormente serem incorporados como AG pelo TAB e esterificado a TAG por ação de enzimas, como por exemplo, GPAT, MGAT e DGAT (Zechner et al., 2000).

Finalmente, a incorporação de glicose na porção glicerol dos TAG apresentou apenas diferença entre os valores basal e máximo intragrupos, e quando analisados separadamente, não houve diferença entre os grupos nos diferentes coxins. Esse comportamento pode indicar que os glicocorticoides agiram predominantemente sobre a via da síntese *de novo* de AG, e mais especificamente nos depósitos RP e MS. Apesar de não ter havido diferença entre os grupos na incorporação de glicose em glicerol, cerca de 85% da glicose destinada a formação de TAG foi revertida para a porção glicerol na condição estimulada com insulina (dados não mostrados). Essa destinação preferencial dos carbonos da glicose para a porção glicerol dos TAG é semelhante àquela encontrada por Nye et al. (2008) que verificaram que, em ratos submetidos a dieta rica em sacarose, aproximadamente 90% do glicerol usado para a síntese de TAG no tecido adiposo foi proveniente da gliceroneogênese. Outro ponto que a ser considerado é que os glicocorticoides aumentam a expressão gênica e atividade da enzima PEPCK no tecido adiposo (sendo essa uma enzima chave dessa via), e dessa forma favorece a gliceroneogênese (Christ-Grain, et al., 2008; Kola et al., 2008). Apesar desses indícios, análises mais detalhadas são necessárias para confirmar essa observação.

8 CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados podemos concluir que a administração de 0,25 mg/kg/d de dexametasona durante 4 semanas para ratos Wistar:

- foi capaz de reduzir a resposta normal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, como verificado pela atrofia das glândulas adrenais e valores de corticosterona plasmática;

- promove características relacionadas com o quadro de excesso de glicocorticoides, como por exemplo, resistência à insulina, intolerância à glicose, alterações hormonais e dislipidemia;

- promove certo grau de acúmulo de gordura nos depósitos viscerais (especificamente no coxim MS), além de promover hipertrofia desses adipócitos;

- promove maior incorporação de glicose na porção AG dos TAG nos coxins viscerais;

- promove alteração na atividade de enzimas lipogênicas nos coxins RP e MS [principalmente daquelas envolvidas na geração de cofatores reduzidos (a saber, G6PDH e EM)];

- promove alteração na expressão gênica de enzimas lipogênicas (ACC, FAS, ACL, G6PDH e EM) tanto no coxim SC quanto no MS (porém com maior magnitude de aumento na expressão gênica da enzima G6PDH no coxim MS);

- não altera a expressão gênica da enzima 11βHSD1, que é responsável pela conversão da forma inativa da corticosterona para sua forma ativa;

Contudo, esses resultados mostram que certos aspectos da indução iatrogênica de síndrome de Cushing em ratos foram obtidos, e que uma possível explicação para o maior acúmulo de gordura na região visceral pode ser devido a

maior atividade e expressão de enzimas envolvidas na formação de cofatores reduzidos, ao invés da atividade de enzimas envolvidas na via de síntese propriamente dita.

REFERÊNCIAS*

Aarsland A, Chiinkes D, Wolfe RR. Hepatic and whole body fat synthesis in human during carbohydrate overfeeding. Am J Clin Nutr. 1997;65(6):1774-82.

Agarwal AK. Cortisol metabolism and visceral obesity: role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme and reduced co-factor NADPH. Endocr Res. 2003;29(4):411-8.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2000;11(8):327-32.

Ahtikoski AM, Riso EM, Koskinen SO, Risteli J, Takala TE. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. Pflugers Arch. 2004;448(1):123-30.

Ailhaud G, Grimaldi P, Négrl R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. Annu Rev Nutr. 1992;12:207-33.

Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissue. Ann Med. 1995;27(4):435-8.

Angelini N, Rafacho A, Boschero AC, Bosqueiro JR. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. Diabetes Res Clin Pract. 2010;87(2):184-91.

Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. Int J Obes. 2004;28 Suppl 4: S45-S52.

Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissue. Metabolism. 1995;44(2):228-33.

Bagdade JD, Yee E, Alberts J, Pykalisto OJ. Glucocorticoids and triglyceride transport: effects on triglyceride secretion rats, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat. Metabolism. 1976;25(5):533-42.

Balachandran A, Guan H, Sellan M, van Uum S, Yang K. Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Endocrinology. 2008;149(8):4069-79.

Ballard FJ, Hanson RW. The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: repleshiment of oxaloacetate. J Lipid Res. 1967;8(2):73-9.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical Journal:sample references. Available from: http://www.icmje.org [2011 Jul 15].

Barel M, Perez OAB, Giozzet VA, Rafachi R, Bosqueiro JR, Amaral SL. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. Eur J Appl Physiol. 2010;108(5):999-1007.

Bazin R, Ferré P. Assays of lipogenic enzymes. Methods Mol Biol. 2001;155:121-7.
Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H. Methods of enzymatic analysis. Orlando, FL: Academic Press; 1974.

Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H. Methods of enzymatic analysis. Orlando, FL: Academic Press; 1974.

Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. Diabetes Care. 1991;14(12):1132-43.

Bouillon D, Berdanier CD. Role of glucocorticoid in adaptive hyperlipogenesis in the rat. J Nutr. 1980;110(2):286-97.

Bradley RL, Cheatham B. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. Diabetes. 1999;48(2):272-8.

Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. A switch in the dehydrogenase to reductase activity of 11β – hidroxyesteroid dehydrogenase type 1 upon differential of human omental adipose stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(3):1205-10.

Bujalska IJ, Quinkler M, Tomlinson JW, Montague CT, Smith DM, Stewart PM. Expression profiling of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and glucocorticoid-target genes in subcutaneous and omental human preadipocytes. J Mol Endocrinol. 2006;37(2):327-40.

Cai Y, Song Z, Wang X, Jiao H, Lin H. Dexamethasone-induced hepatic lipogenesis is insulin dependent in chickens (*Gallus gallus domesticus*). Stress. 2011;14(3):273-81.

Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;300(1):C198-C209.

Chanson P, Salenave S. Metabolic syndrome in Cushing's syndrome. Neuroendocrinology. 2010;92 Suppl 1: S96-S101.

Christ-Crain M, Kola B, Lolli F, Fekete C, Seboek D, Wittman G, Feltrin D, Igreja SC, Ajodha S, Harvey-White J, Kunos G, Müler B, Pralong F, Aubert G, Arnaldi G, Giacchetti G, Boscaro M, Grossman AB, Korbonits M. AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. FASEB J. 2008;22(6):1672-83.

Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, Spencer RL. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. Psychoneuroendocrinology. 2000;25(2):151-67.

Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Prog Lipid Res. 2004;43(2):134-76.

Cushing's Support & Research Foundation [Internet]. Cushing's fact sheet. [cited 2012 Nov 26]. Available from: http://csrf.net/page/fact_sheet.php.

Del Prato S, Tiengo A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev. 2001;17(3):164-74.

Deveaud C, Beauvoit B, Salin B, Schaeffer J, Rigoulet M. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. Mol Cell Biochem. 2004;267(1-2):157-66.

Diamant S, Shafrir E. Modulation of the activity of insulin-dependent enzymes of lipogenesis by glucocorticoids. Eur J Biochem. 1975;53(2):541-6.

Dimitriadis G, Leighton B, Parry-Billings M, Sasson S, Young M, Krause U, Bevan S, Piva T, Wegener G, Newsholme EA. Effects of glucocorticoids excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. Biochem J. 1997;321(Pt 3):707-12.

Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic genes in adipose tissue in human obesity. Am J Physiol. 2002;282(1):E46-E51.

Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Mengel A, Christiansen JS, Schmitz OE, Møller N. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283(1):E172-E7.

Dole VP, Meirnetz H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. J Biol Chem. 1960;235:2595-9.

Drake AJ, Raubenheimer PJ, Kerrigan D, McInnes KJ, Seckl JR, Walker BR. Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. Endocrinology. 2010;151(4):1581-7.

Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, Rhéaume C, Tchernof A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissue in women. Int J Obes (Lond). 2008;32(2):283-91.

Einstein FH, Atzmon G, Yang XM, Ma XH, Rincon M, Rudin E, Muzumdar R, Barzilai N. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. Diabetes. 2005;54(3):672-8.

Elshourbagy NA, Boguski MS, Liao WS, Jefferson LS, Gordon JI, Taylor JM. Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1895;82(23):8242-6.

Espínola-Antunes D, Kater CE. Adipose tissue expression of 11β – hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in Cushing's Syndrome and in obesity. Arq Bras Endocrinol Metab. 2007;51(8):1397-1403.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(5):911-9.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Comun. 2002;290(3):1084-9.

Fernandez-Rodriguez E, Srewart PM. The pituitary-adrenal axis and body composition. Pituitary. 2009;12(2):105-15.

Fine JB, Di Girolamo M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. Int J Obes Relat Metab Disord. 1997;21(9):764-8.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr. 2007;83 Suppl 5: S192-S203.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.

Galton DJ, Wilson JPD. Lipogenesis in adipose tissue of patients with obesity and Cushing's disease. Clin Sci. 1972;43(6):17.

Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol. 2004;18(8):2024-34.

Gathercole LL, Morgan SA, Bujalska IJ, Hauton D, Stewart PM, Tomlinson JW. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. PLoS ONE. 2011;6(11):e26223. doi: 10.1371/journal.pone.0026223. Epub 2011 Oct 14.

Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrient and hormones. FASEB J. 1994;8(1):36-42.

Gounarides JS, Korach-André M, Killary K, Argentieri G, Turner O, Laurent D. Effect of dexamethasone on glucose tolerance and fat metabolism in a diet-induced obesity mouse model. Endocrinology. 2008;149(2):758-66.

Grasa MM, Cabot C, Balada F, Virgili J, Sanchis D, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Corticosterone binding to tissues of adrenalectomized lean and obese Zucker rats. Horm Metab Res. 1998;30(12):699-704.

Haugen F, Drevon CA. The interplay between nutrients and the adipose tissue. Proc Nutr Soc. 2007;66(2):171-82.

Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. Eur J Clin Nutr. 1999;53 Suppl 1: S53-S65.

Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor physiology. Rev Endocr Metab Disord. 2007;8(4):321-30.

Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. Physiol Rev. 1995;75(1):47-76.

Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev. 2010;11(1):11-8.

Jahng JW, Kim NY, Ryu V, Yoo SB, Kim BT, Kang DW, Lee JH. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases leptin in rats. Eur J Pharmacol. 2008;581(1-2):64-70.

Karastergious K, Smith SR, Greenberg AS, Fried SK. Sex differences in human adipose tissue – the biology of pear shape. Biol Sex Differ. 2012;3(1):3-13.

Kola B, Christ-Crain M, Lolli F, Arnaldi G, Giacchetti MB, Grossman AB, Korbonits M. Changes in adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(12):4969-73.

Korach-André M, Gao J, Gounarides JS, Deacon R, Islam A, Laurent D. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(1):E106-E16.

Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Bujis RM. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat – functional implications. J Clin Invest. 2002;110(9):1243-50.

Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? Trends Pharmacol Sci. 2003;24(6): 276-83.

Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(5):H2031-H41.

Lee MJ, Gong DW, Burkey BF, Fried SK. Pathway regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissue: a microarray study. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011;300(3):E571-E80.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. Mol Aspects Med. 2012; Oct 13. pii: S0098-2997(12)00115-X. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.001. [Epub ahead of print].

Letexier D, Pinteur C, Large V, Fréring V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. J Lipid Res. 2003;44(11):2127-34.

Life Technologies [Internet]. Gene Expression Analysis using TaqMan® Assays. [cited 2012 Dez 21]. Available from: https://pt-br.invitrogen.com/site/br/pt/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cippola-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of periodicity of food intake, time of the day and melatonin. Braz J Med Res. 1994;27(3):995-1000.

Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinde's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. Clin Chem. 1975;21(12):1754-60.

Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fueling fat redistribution in the metabolic syndrome. J Endocrinol. 2009;197(2):189-204.

Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. Science. 2001;294(5549):2166-70.

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. 1985;41(2):125-30.

Murakami T, Iida M, Shima K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1995;214(3):1260-67.

National Adrenal Diseases Foundation [Internet]. Adrenal Diseases – Cushing's Syndrome. The facts you need to know. [cited 2012 Nov 26]. Available from: http://www.nadf.us/diseases/cushings.htm.

Novelli M, Pocai A, Chiellini C, Maffei M, Masiello P. Free fatty acids as mediators of adaptive compensatory responses to insulin resistance in dexamethasone-treated rats. Diabetes Metab Res Rev. 2008;24(2):155-64.

Nye CK, Hanson RW, Kalhan SC. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. J Biol Chem. 2008;283(41):27565-74.

Ogias D. O jejum regula diferencialmente a *cortisone biding globulin* plasmática, o receptor de glicocorticoide e proteínas que controlam a progressão do ciclo celular na mucosa gástrica de filhotes e ratos adultos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fruhbeck G, Tinahones FJ, Fernández-Real JM. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. Obesity (Silver Spring). 2009;18(1):13-20.

Palou M, Priego T, Sánchez J, Rodríguez AM, Palou A, Picó C. Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. Cell Physiol Biochem. 2009;24(5-6):547-56.

Palou M, Sánchez J, Priego T, Rodríguez AM, Picó C, Palou A. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and reefeding. J Nutr Biochem. 2010;21(1):23-33.

Paulsen SK, Pedersen SB, Fisker S, Richelsen B. 11β-HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. Obesity (Silver Spring). 2007;15(8):1954-60.

Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. Nutrition. 2000;16(10):903-8.

Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. Diabetes Metab. 2008;34(6 Pt 2):643-8.

Rafacho A, Giozzet VAG, Boschero AC, Bosqueiro JR. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. Pancreas. 2008;36(3):284-93.

Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. High doses of dexamethasone insuce increased β-cell proliferation in pancreatic rat islets. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(4):E681-E9.

Rebuffé-Scrive M, Lundholm K, Bjiimtorp P. Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue. Eur J Clin Invest. 1985;15(5):267-71.

Rebuffé-Scrive M, Krotkiewski M, Elferson J, Bjorntorp P. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1988;67(6):1122-8.

Rockall AG, Sohaib SA, Evans D, Kaltsas G, Isidori AM, Monson JP, Besser GM, Grossman AB, Reznek RH. Hepatic steatosis in Cushing's syndrome: a radiological assessment using computed tomography. Eur J Endocrinol. 2003;149(6):543-8.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J Biol Chem. 1964;239:375-80.

Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S. Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: Insights from genetic manipulations. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;122(1-3):10-20.

Schoneveld OJLM, Gaemers IC, Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signaling. Biochim Biophys Acta. 2004;1680(2):114-28.

Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. Endocrinology. 2001;142(4):1371-6.

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. 2002;283(2):E367-E73.

Shi JH, Du WH, Liu XY, Fan YP, Hu XL, Zhou HY, Xu HB, Zhang XM, Xiang P, Chen FL. Glucocorticoids decrease serum adiponectin level and WAT adiponectin mRNA expression in rats. Steroids. 2010;75(12):853-8.

Shinahara M, Nishiyama M, Iwasaki Y, Nakayama S, Noguchi T, Kambayashi M, Okada Y, Tsuda M, Stenzel-Poore MP, Hashimoto K, Terada Y. Plasma adiponectin levels are increased despite insulin resistance in corticotropin-releasing hormone transgenic mice, and animal model of Cushing Syndrome. Endocr J. 2009;56(7):879-86.

Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. J Lipid Res. 1994;35(9):1535-41.

Sjögren J, Weck M, Nilsson M, Ottosson M, Björntorp P. Glucocorticoid hormone binding to rat adipocytes. Biochim Biophys Acta.1994;1224(1):17-21.

Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, deJonge L, la Bretonne J, Volafova J, Bray GA. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolism complications of obesity. Metabolism. 2001;50(4):425-35.

Speaker KJ, Fleshner M. Interleukin-1 beta: a potential link between stress and the development of visceral obesity. BMC Physiol. 2012;12:8. doi: 10.1186/1472-6793-12-8.

Staels B, van Tol A, Chan L, Verhoeven G, Auwerx J. Variables effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats. Arterioscler Thromb. 1991;11(3):760-9.

Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol Cell Endocrinol. 2007;275(1-2):71-8.

Swierczynski J, Goyke E, Wach L, Pankiewicz A, Adamonis W, Sledzinski Z, Aleksandrowicz Z. Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. Metabolism. 2000;49(5):594-9.

Swierczynski J, Zabrocka L, Goyke E, Raczynska S, Adamonis W, Sledzinski Z. Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. Mol Cell Biochem. 2003;254(1-2):55-9.

Taylor AH, Raymond J, Dionne JM, Romney J, Chan J, Lawless DE, Wanke IE, Wong NCW. Glucocorticoid increases rat apolipoprotein A-I promoter activity, J Lipid Res. 1996;37(10):2232-43.

Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc. 2001;60(3):329-39.

Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. Biochem Soc Trans. 2005;33(Pt 5):1078-81.

Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(7):2468-73.

Villanueva EC, Myers MG. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. Int J Obes (Lond). 2008;32 Suppl 7: S8-S12.

Volpe JJ, Marasa JC. Hormonal regulation of fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthesis in mammalian adipose tissue and liver. Biochim Biophys Acta. 1975;380(3):454-72.

Voshol PJ, Rensen PC, Van Dijk KW, Romijn JA, Havekes LM. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. Biochim Biophys Acta. 2009;1791(6):479-85.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev. 2000;21(6):697-738.

Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva MER, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. Horm Metab Res. 2002;34(11-12):616-21.

Wang Y, Voy BJ, Urs S, Kim S, Soltani-Bejnood M, Quigley N, Heo YR, Standridge M, Andersen B, Dhar M, Joshi R, Wortman P, Taylor JW, Chun J, Leuze M, Claycombe K, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. J Nutr. 2004;134(5):1032-8.

Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but no obesity itself, predicts Type II diabetes independent of insulin resistance. Diabetologia. 2000;43(12):1498-1506.

White PC, Rogoff D, McMillan DR, Lavery GG. Hexose 6-phosphate dehydrogenase (H6PD) and corticosteroid metabolism. Mol Cell Endocrinol. 2007;265-266:89-92.

Willi SM, Kennedy A, Wallace P, Ganaway E, Rogers NL, Garvey WT. Troglitazone antagonizes metabolic effects of glucocorticoids in humans: effects on glucose tolerance, insulin sensitivity, suppression of free fatty acids, and leptin. Diabetes. 2002;51(10):2895-2902.

Wilson JPD, Galton DJ. The effect of obesity and Cushing's disease on the incorporation of glucose into lipid and esterification of palmitate by human adipose tissue. Eur J Clin Invest. 1972;2(6):379-83.

Wise EM, Ball EG. Malic enzyme and lipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1964;52:1255-63.

Wong RHF, Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. Curr Opin Pharmacol. 2010;10(6):684-91.

Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. Diabetes. 1999;48(2):365-70.

Zechner R, Strauss J, Frank S, Wagner E, Hofmann W, Kratky D, et al. The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000;24 Suppl 4: S53-S6.