

CINTIA BAGNE UETA

**PAPEL DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1 E β_2
NA TERMOGÊNESE FACULTATIVA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

São Paulo
2009

CINTIA BAGNE UETA

**PAPEL DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1 E β_2
NA TERMOGÊNESE FACULTATIVA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Anatomia

Orientador: Profa. Dra Cecília Helena A. G. Ferreira

São Paulo
2009

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

Ueta, Cintia Bagne.

Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa / Cintia Bagne Ueta. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Gouveia, Cecília Helena Azevedo.

Dissertação (Metrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Termogênese Facultativa.

Versão do título para o inglês: Role of adrenergic receptor β_1 e β_2 in facultative thermogenesis.

Descritores: 1. Termogênese facultativa 2. Tecido adiposo marrom 3. Nocaute I. Ueta Cintia Bagne II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Anatomia III. Título.

ICB/SBIB001/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cintia Bagne Ueta.

Título da Tese: Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa.

Orientador(a): Prof^a Dra. Cecília Helena Azevedo Gouveia.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br


COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA. 001/2009

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 158/06, aprovado em 06.02.07, informo que por solicitação da Profa. Dra. Cecília H. A Gouveia, o título do protocolo foi alterado para "*Ação do hormônio tireoideano no metabolismo e desenvolvimento ósseo: aspectos estruturais e moleculares*", sem modificações de seu conteúdo e que a coordenação do mesmo passa sob sua responsabilidade, uma vez que a aluna *Cíntia Bagne Ueta*, está sob sua orientação.

São Paulo, 07 de janeiro de 2009.


Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice-Coordenador da CEEA
ICB/USP



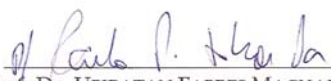
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

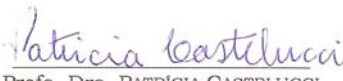
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - Telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **158** nas fls. **40** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Miriam Oliveira Ribeiro, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Papel do hormônio tiroideano no metabolismo energético**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Cíntia Bogue Ueta**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **06.02.2007**.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2007.


Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP


Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, em quem eu sempre me inspirei e que foram fundamentais para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai, fonte de amor, por ter me abençoado e me dado sabedoria;

À Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro, que me orienta desde a minha iniciação científica, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação e amizade, por ter acreditado no meu potencial, por ter me dado a oportunidade e o prazer de trabalhar neste importante projeto;

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, que me acolheu no programa de pós-graduação, a fim de que eu pudesse realizar meu mestrado pelo departamento de anatomia;

À Profa. Dra. Cecília H. A. G. Ferreira, por me aceitar como aluna, por ter permitido a utilização de seu laboratório para a realização de alguns experimentos e pelo auxílio no encaminhamento de meu projeto à FAPESP;

À Profa. Dra. Patrícia Brum, que gentilmente forneceu os animais para que esse projeto fosse realizado;

Ao Prof. Anselmo Moriscot, por ter permitido a utilização de seu laboratório para o desenvolvimento do PCR.

À Profa. Maria Luiza Barreto de Chávez, pelos preciosos ensinamentos de anatomia humana e por ter permitido o uso de seu laboratório para a realização de alguns experimentos;

Aos meus colegas do Mackenzie, por toda a ajuda e pelos momentos de descontração e amizade;

Aos meus colegas da USP que tiveram paciência de me ensinar e que se tornaram grandes amigos: Tatiana Fonseca, Cris Costa, Eduardo Beber, Fátima Freitas, Beatriz Amorim, Luciane Capelo e Marcelo Christoffollete. Obrigada por toda ajuda, dedicação e momentos de descontração;

A todos do departamento de anatomia, que, de alguma forma, me ajudaram na realização do projeto;

À minha irmã querida Gizela, pelo carinho, pela amizade e pela paciência de ouvir sobre o meu projeto mesmo sem entender o assunto;

Ao João Bosco, por todo amor, dedicação, paciência e ajuda;

Aos meus pais, Elizabeth e Ademar, que, com amor e dedicação, sempre me incentivaram e me ajudaram a lutar pelos meus objetivos;

À FAPESP, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudos.

“Uma boa vida tem como base o sentimento do que queremos para nós em cada momento e daquilo que realmente vale como principal”
(Guerdjef, pensador russo).

RESUMO

UETA, C.B. **Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O tecido adiposo marrom (BAT), principal sítio de termogênese facultativa, é ativado pela liberação de noradrenalina (NE) pelo Sistema Nervoso Simpático, que se liga aos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e β_3 expressos nos adipócitos marrons. Animais com nocaute das três isoformas de receptor adrenérgico β (TKO) são obesos e sensíveis ao frio, demonstrando que estes receptores estão envolvidos na manutenção do peso corporal e na regulação da temperatura central. No entanto, ainda não é claro qual o papel de cada isoforma nestes processos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das isoformas β_1 e β_2 na mediação da termogênese facultativa induzida pela dieta e na termogênese induzida pelo frio. Para tanto, camundongos com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 ($KO\beta_1$) e camundongos com nocaute para o receptor β_2 ($KO\beta_2$) foram tratados com dieta hipercalórica por 22 semanas. Os resultados obtidos mostram que os animais $KO\beta_1$ e $KO\beta_2$ tratados com dieta hipercalórica não desenvolvem obesidade mais severa do que os animais selvagens, como comprovado pela medida de peso corporal e determinação da composição corporal. Porém não são capazes de aumentar o consumo de oxigênio induzido pela dieta, sugerindo que esses receptores apresentam papel relevante nessa resposta fisiológica. Essa resistência ao desenvolvimento da obesidade sugere que os receptores β_1 e β_2 não medeiam a termogênese facultativa induzida pela dieta, embora haja a possibilidade de existirem mecanismos compensatórios nesses animais. Por outro lado, a presença do receptor β_1 é exigida para termogênese induzida pelo frio, uma vez que os camundongos $KO\beta_1$ são sensíveis ao frio e a capacidade termogênica do BAT desses animais em resposta à NE é bastante reduzida quando comparados com animais selvagens. A ausência do receptor β_2 não piora a resposta dos animais ao frio sugerindo que essa isoforma não esteja envolvida na termogênese induzida pela dieta ou pelo frio. Em conclusão, este estudo indica que o receptor adrenérgico β_1 é fundamental na termogênese induzida pelo frio, mas não na termogênese induzida pela dieta. Além disso, é provável que a termogênese induzida pela dieta seja regulada por mecanismos distintos da termogênese induzida pelo frio.

Palavras Chaves: Receptores adrenérgicos β . Nocaute. Termogênese facultativa. BAT.

ABSTRACT

UETA, C.B. **Role of adrenergic receptor β_1 and β_2 in diet- or cold-induced thermogenesis.** 2009. 72f. Master thesis (Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Brown adipose tissue (BAT) is the main site of facultative thermogenesis and is activated by signaling of β_1 , β_2 e β_3 adrenergic receptors by norepinephrine (NE) released by Sympathetic Nervous System. Previous studies have shown that animals with knockout for all β adrenergic receptor (TKO) are obese and cold intolerant. These data indicates that these β adrenergic receptors are involved in the development of obesity and body temperature regulation. Nonetheless, it is unclear the role of each isoform in these process. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the role of isoforms β_1 and β_2 in mediate diet-induced thermogenesis and cold-induced thermogenesis. For that, knockout mice for the adrenergic receptor β_1 ($KO\beta_1$) and knockout mice for the adrenergic receptor β_2 ($KO\beta_2$) were fed with high fat diet for 22 weeks. The results obtained showed that the animals $KO\beta_1$ and $KO\beta_2$ treated with high fat diet did not develop more severe obesity when compared to wild type animals, as evidenced by the measure of body weight and determination of body composition. However, they were unable to increase the oxygen consumption induced by diet, suggesting that these receptors have important role in this physiological response. This resistance to the development of obesity suggests that β_2 and β_1 isoform do not mediate diet- induced thermogenesis, although there is a possibility that there are compensatory mechanisms in these animals. These results suggest that the adrenergic receptors β_1 and β_2 do not mediate the facultative thermogenesis induced by diet. Furthermore, the presence of the β_1 receptor is required for cold-induced thermogenesis, since the $KO\beta_1$ mice are sensitive to cold and BAT thermogenic response is significantly impaired when compared to wild type animals. The absence of β_2 receptor does not worsen the response of animals to cold, suggesting that this isoform is not involved in the diet- or cold-induced thermogenesis. In conclusion, this study indicates that the β_1 isoform of the adrenergic receptor is critical in the cold-induced thermogenesis, but not in diet-induced thermogenesis. Moreover, it is likely that the diet-induced thermogenesis and cold-induced thermogenesis are regulated by different mechanisms.

Key-words: β adrenergic receptor. knockout. Facultative thermogenesis. BAT.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Esquema do mecanismo de ação dos receptores β adrenérgicos no BAT.....	17
Figura 2. Peso Corporal dos camundongos C57 e KO β_1 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	36
Figura 3. Ganho de peso corporal dos camundongos C57 e KO β_1 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	37
Figura 4. Peso Corporal dos camundongos FVB e KO β_2 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica	37
Figura 5. Ganho de peso corporal dos camundongos FVB e KO β_2 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica	38
Figura 6. Consumo de ração diário dos camundongos C57 e KO β_1 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	39
Figura 7. Consumo de ração diário dos camundongos FVB e KO β_2 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	39
Figura 8. Porcentagem de gordura corporal total dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou hipercalórica.....	40
Figura 9. Porcentagem de gordura corporal total dos camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou hipercalórica	40
Figura 10. Consumo de Oxigênio (VO $_2$) dos camundongos C57 e KO β_1 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	41
Figura 11. Consumo de Oxigênio (VO $_2$) dos camundongos FVB e KO β_2 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	41
Figura 12. Teste de tolerância à glicose (GTT): dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	43
Figura 13. Teste de tolerância à glicose (GTT): dos camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	43
Figura 14. Teste de tolerância à insulina (ITT): dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	44
Figura 15. Teste de tolerância à insulina (ITT): dos camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	44

Figura 16. Níveis plasmáticos de colesterol dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	45
Figura 17. Níveis plasmáticos de triglicérides dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	45
Figura 18. Níveis plasmáticos de colesterol dos camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	46
Figura 19. Níveis plasmáticos de triglicérides dos camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.....	46
Figura 20. Exposição ao frio dos camundongos C57 e KO β_1	47
Figura 21. Queda da temperatura corporal após 3 horas de exposição ao frio dos camundongos C57 e KO β_1	48
Figura 22. Exposição ao frio dos camundongos FVB e KO β_2	48
Figura 23. Queda da temperatura corporal após 3 horas de exposição do frio dos camundongos FVB e KO β_2	49
Figura 24. Consumo de oxigênio dos camundongos C57 e KO β_1 durante exposição a diferentes temperaturas.....	49
Figura 25. Consumo de oxigênio dos camundongos FVB e KO β_2 durante exposição a diferentes temperaturas.....	50
Figura 26. Delta da temperatura do BAT após infusão de NE nos camundongos C57 e KO β_1	50
Figura 27. Delta da temperatura do BAT após infusão de NE nos camundongos FVB e KO β_2	51
Figura 28. Delta da temperatura do BAT após infusão de Dobutamina nos camundongos C57 e KO β_1	51
Figura 29. Delta da temperatura do BAT após infusão de Dobutamina nos camundongos FVB e KO β_2	52
Figura 30. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_2 no BAT de camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou hipercalórica.....	53
Figura 31. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 no BAT de camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou hipercalórica.....	53
Figura 32. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 no BAT de camundongos FVB e KO β_2 tratados com dieta padrão ou hipercalórica.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências dos primers para PCR em tempo real.....	32
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

- BAT**- tecido adiposo marrom
- iBAT**- tecido adiposo marrom interscapular
- WAT**- tecido adiposo branco
- UCP**- proteína desacopladora mitocondrial
- NE**- noradrenalina
- SNS**- sistema nervoso simpático
- AR β** - receptor adrenérgico tipo β
- KO β_1 ^{-/-}**- nocaute para o receptor adrenérgico β_1 , duplo homozigoto
- KO β_2 ^{-/-}**- nocaute para o receptor adrenérgico β_2 , duplo homozigoto
- TKO**- nocaute para os três receptores β adrenérgicos
- i.v.**- intra venosa
- i.p.**- intraperitoneal
- AMPc**- adenosina monofosfato 3',5'-cíclico
- PKA**- proteína kinase dependente de cAMP
- O₂**- oxigênio
- VO₂**- volume do oxigênio consumido em repouso
- GDP**- difosfato de guanidina
- LHS**- lipase hormônio sensível
- ATP**- adenosina trifosfato
- ADP**- adenosina difosfato
- PGs**- proteína G estimulatória
- AC**- adenilil ciclase
- NADH** – dinucleotídeo adenina nicotinamida (forma reduzida)
- FADH₂**- dinucleotídeo adenina flavina (forma reduzida)
- CREB**- proteína ligadora ao elemento responsivo do AMPc
- TAG**- triacilglicerol
- DAG**- diacilglicerol
- MAG**-monoacilglicerol
- FA**- ácidos graxos
- MGL**- lípase de monoacilglicerol
- $\Delta^\circ \text{C}$ - variação da temperatura
- KGF**- quilograma-força

CL-316,243- agonista seletivo para a isoforma β_3

DNAc- ácido desoxirribonucléico complementar

RNA- ácido ribonucléico

RNA_m- ácido ribonucléico mensageiro

PCR- reação de Polimerização em cadeia

TR β - receptor de hormônio tireoideano β

TR α - receptor de hormônio tireoideano α

T3- hormônio triiodotironina

GTT- teste de tolerância a glicose

ITT- teste de tolerância a insulina

H⁺- próton hidrogênio

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	15
1.1. Termogênese.....	15
1.1.1. Tecido adiposo marrom e UCP-1	15
1.1.2. Mecanismo de ação dos receptores adrenérgicos β	16
1.2. Receptores adrenérgicos β	18
1.3. Receptores β adrenérgicos e termogênese facultativa induzida pelo dieta.....	20
1.4. Receptores β adrenérgicos e termogênese facultativa induzida pela frio	24
2- OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos específicos	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Animais	28
3.2. Dieta Hipercalórica	29
3.3. Consumo de oxigênio	29
3.4. Teste de tolerância à glicose (GTT)	30
3.5. Teste de tolerância à insulina (ITT)	30
3.6. Medida de colesterol plasmático	30
3.7. Medida de triglicérides plasmáticos	31
3.8. Determinação da composição corporal por análise da carcaça	31
3.9. Isolamento do RNA do iBAT e análise do RNAm por PCR em tempo real.....	31
3.10. Determinação da eficiência das reações de amplificação dos receptores adrenérgicos β	32
3.11. Exposição ao frio	34
3.12. Consumo de oxigênio durante exposição ao frio	34
3.13. Resposta térmica do BAT à infusão de NE	34
3.14. Resposta térmica do BAT à infusão de Dobutamina	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Determinação da composição corporal e desenvolvimento da obesidade.....	36
4.2. Papel dos receptores β adrenérgicos no metabolismo.....	41

4.3. Resposta termogênica ao frio.....	47
4.4. Níveis de RNAm das isoformas de receptores adrenérgicos β em animais nocaute....	52
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Termogênese

A geração de calor pela queima de calorias está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da temperatura corporal, metabolismo, peso corporal e balanço energético. Animais homeotérmicos apresentam significativa ineficiência termodinâmica na utilização da energia metabólica que resulta na liberação de calor e se valem dessa ineficiência intrínseca a fim de manter sua temperatura corporal constante (BIANCO, 2005).

A quantidade de calor liberado por um organismo em repouso, não realizando digestão e a termoneutralidade ($\sim 28^{\circ}\text{C}$ para seres humanos adultos), pode ser calculada a partir da medida do calor perdido para o ambiente (calorimetria direta) ou através do consumo de oxigênio (calorimetria indireta). É chamada de **termogênese obrigatória** (SILVA, 1995).

O gasto energético de repouso aumenta de forma significativa em resposta a mudanças ambientais ou comportamentais, tais como alterações na temperatura ambiente e/ou ingestão de alimentos. A capacidade dos mamíferos de aumentar a liberação de calor sob demanda é chamada de **termogênese facultativa**, também chamada termogênese química ou adaptativa (para revisão ver LOWELL e SPIEGELMAN, 2000).

1.1.1 Tecido adiposo marrom e UCP-1

O BAT é o mais importante sítio de termogênese química (*non-shivering thermogenesis*) presente em pequenos mamíferos durante todas as idades e em seres humanos principalmente nos primeiros meses de vida (CANNON e NEDERGAARD, 1985; HIMMS-HAGEN, 1985; NICHOLLS e LOCKE, 1984). Recentemente, no entanto, foi demonstrado que seres humanos adultos também podem apresentar tecido adiposo marrom com todas as características morfológicas e fisiológicas descritas no órgão adiposo de pequenos mamíferos, apresentando-se principalmente na região supraclavicular e cervical, com regulação similar a dos roedores. (CINTI, 2006; NEDERGAARD *et al*, 2007). A relação entre superfície e volume (S/V) no corpo humano é inteiramente diferente dos pequenos mamíferos e, desta forma, a termodispersão é significativamente menor em humanos que em roedores, o que justificaria a reduzida necessidade do BAT em humanos adultos. No entanto, a atividade do BAT em humanos

adultos pode desempenhar um importante papel no metabolismo (NEDERGAARD; BENDTSSON; CANNON, 2007).

A identificação de tecido adiposo marrom em humanos abre um grande leque de possibilidades no tratamento da obesidade. A compreensão dos mecanismos que regulam a atividade desse tecido em humanos pode resultar em formas de estimular o gasto energético e, conseqüentemente, reduzir o peso corporal. Uma possibilidade seria a ativação seletiva dos receptores adrenérgicos β_3 que são expressos no BAT e no WAT, mas não em outros tecidos. A descoberta de uma droga altamente seletiva para essa isoforma, ocasionaria a estimulação da lipólise sem causar os efeitos indesejáveis dos outros receptores adrenérgicos β_1 e β_2 .

1.1.2 Mecanismo de ação dos receptores adrenérgicos β no BAT

O mecanismo bioquímico pelo qual o BAT gera calor envolve a expressão da proteína desacopladora, a UCP-1, presente no interior da membrana mitocondrial (CANNON *et al.*, 1982; NICHOLLS e LOCKE, 1984).

A estimulação do BAT se dá pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS), através da liberação de noradrenalina (NE). No adipócito marrom maduro, a NE interage com diferentes subtipos de receptor adrenérgico que estão associados com a ativação de diferentes vias de sinalização. A estimulação dos receptores adrenérgicos β ativa a proteína G estimulatória, com conseqüente amplificação do AMPc e ativação da PKA. A PKA, por sua vez, ativa a lipase hormônio sensível (LHS) que quebra os triglicerídeos das células adiposas, liberando glicerol e ácidos graxos.

Esses ácidos graxos servem como substrato para o ciclo de Krebs, com conseqüente liberação de hidrogênios que são carreados pelas flavoproteínas na forma reduzida (NADH e FADH₂) e bombeados pela cadeia respiratória para o espaço intermembranoso mitocondrial, criando um gradiente de prótons. Esses prótons podem retornar a matriz mitocondrial pela ATPase com conseqüente síntese de ATP. No BAT a UCP-1 constitui uma via alternativa ao retorno desses prótons para a matriz mitocondrial, onde os ácidos graxos deslocam o nucleotídeo GDP da UCP-1 (desacoplamento) e a energia do gradiente eletroquímico é dissipada na forma de calor aquecendo o corpo (Figura 1).

Para compensar essa liberação de prótons, a célula aumenta o consumo de oxigênio para manter a síntese de ATP pela célula (JANSKÝ, 1995; LOWELL e SPIEGELMAN,

2000; RIBEIRO *et al*, 2001; BACHMAN *et al*, 2002; BOSS *et al*, 1998; LEAVER e PAPPONI, 2002; NICHOLLS e LOCKE, 1984; NICHOLLS e RIAL, 1999; SKULACHEV, 1998).

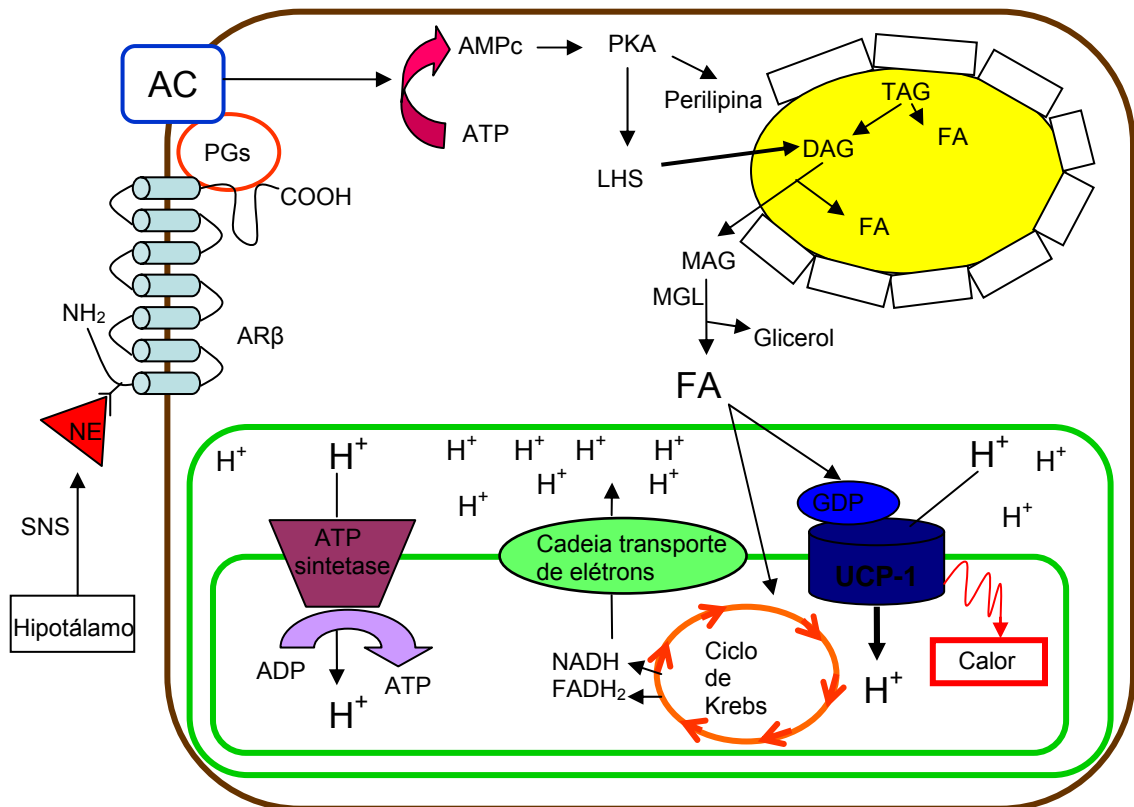


Figura 1: Esquema do mecanismo de ação dos receptores β adrenérgicos no BAT. Quando o hipotálamo é estimulado pelo frio ou pela dieta hipercalórica o SNS libera NE que se liga aos receptores β adrenérgicos. A amplificação do AMPc aumenta a PKA que age na ativação da lipase hormônio sensível que quebra o diacilglicerol, liberando glicerol e ácidos graxos. Esse último serve como substrato para o ciclo de krebs. Nesse ciclo são liberados cofatores reduzidos (NADH e FADH₂) que vão para a cadeia transporte de elétrons, aumentando o gradiente de prótons H⁺ no espaço entre membranas. Esses prótons podem retornar pela ATP sintetase para a matrix mitocondrial e ocorre síntese de ATP ou os ácidos graxos podem deslocar o nucleotídeo GDP da UCP-1 (desacoplamento) e os prótons retornam para a matrix pela UCP-1 dissipando energia na forma de calor.

O BAT representa, portanto, um atraente modelo celular para avaliar a sinalização adrenérgica na termogênese facultativa, já que é altamente regulado pelo sistema nervoso simpático, expressa diferentes subtipos de receptores adrenérgicos (REHNMARK *et al*, 1990; PUIGSERVER *et al*, 1996; ROHLFS *et al*, 1995) e é importante no controle do balanço energético por sua capacidade de realizar a respiração desacopladora mitocondrial envolvendo a UCP-1.

1.2 Receptores adrenérgicos β

Os receptores adrenérgicos α e β são membros de uma grande família de receptores positivamente acoplados à proteína G. Esses receptores são ainda subdivididos em α_{1a} , α_{1b} , α_{1c} , α_{2a} , α_{2b} , α_{2c} (FITZGERALD, 2007), β_1 , β_2 e β_3 . (COLLINS e SURWIT, 2005). Tais receptores são proteínas transmembranas com uma porção amino terminal extracelular e uma porção carboxi terminal intracelular. Apresentam sete regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana celular. Através dessas regiões, os subtipos de receptores adrenérgicos exibem aminoácidos homólogos e diferenças nos segmentos 50 e 60 que determinam a especificidade do encaixe de agonistas (FITZGERALD, 2007). Estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como desenvolvimento, comportamento, tônus do músculo liso, funcionamento cardíaco e metabolismo energético (JIMENEZ *et al*, 2002).

Os receptores adrenérgicos α_1 medeiam a vasoconstrição do músculo liso vascular, glicogenólise e gliconeogênese no fígado (FITZGERALD, 2007). Já o receptor α_2 tem o papel de inibir a lipólise, no tecido adiposo branco e a termogênese no BAT, por estar acoplado à proteína G inibitória, levando a uma inibição da ativação da adenilil ciclase e redução da formação de AMPc (FITZGERALD, 2007).

Os receptores adrenérgicos β_1 medeiam o aumento da força de contração do músculo cardíaco e a atividade cardíaca (ROHRER, 1998), aumentam a secreção de renina pelos rins e no tecido adiposo branco e marrom parecem aumentar a calorigênese e o consumo de oxigênio (FITZGERALD, 2007). Já os receptores adrenérgicos β_2 causam relaxamento do músculo liso, resultando em broncodilatação e vasodilatação, aumentando tanto a glicogenólise e gliconeogênese no fígado quanto a secreção de insulina e glucagon nas ilhotas pancreáticas (FITZGERALD, 2007). Os receptores adrenérgicos β_3 podem estar envolvidos na estimulação do gasto energético e na lipólise no BAT e no WAT. Além disso, os receptores β_3 parecem interferir também na sinalização da insulina, embora não esteja claro seu papel, podendo inibir a ativação do receptor de insulina (ISSAD *et al*, 1995; OBERMAIER *et al*, 1987; HÄRING *et al*, 1986; KLEIN *et al*, 1991; 1999) ou aumentar a captação de glicose pelas células (CHERNOGUBOVA; CANNON; BENGTTSSON, 2004).

O adipócito marrom expressa todas as isoformas de receptores adrenérgicos, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 (SELL; DESHAIES; RICHARD, 2004).

Apesar de os receptores adrenérgicos β apresentarem diversas funções, seu papel na regulação do metabolismo energético fica claro quando se estuda animais que não expressam os receptores β_1 , β_2 e β_3 , os animais triplo nocaute ou TKO. Os camundongos TKO apresentam redução do gasto energético em temperatura ambiente, obesidade moderada em dieta normal, sensibilidade à obesidade induzida pela dieta e exibem intolerância ao frio (JIMENEZ *et al*, 2002).

COLLINS *et al* (1994) estabeleceram uma relação entre as quantidades de RNAm para os receptores adrenérgicos $\beta_1/\beta_2/\beta_3$, no tecido adiposo marrom de camundongos, na razão aproximada de 3:1:150, isto é, a quantidade de RNAm para o receptor adrenérgico β_3 é 50 vezes maior que a quantidade de β_1 e 150 vezes maior que a quantidade de β_2 . Em função do alto nível de expressão do gene dos receptores adrenérgicos β_3 , tem sido proposto que esse seja o principal regulador da lipólise no tecido adiposo de camundongos.

No entanto, a baixa quantidade de RNAm para os receptores β_1 e β_2 não seria razão para descartar esses receptores como mediadores da ação da NE. Os receptores β_1 e β_2 são receptores de alta afinidade e, portanto, mesmo em baixas concentrações, a NE circulante pode ligar e ativar esses receptores. Por outro lado, os receptores β_1 e β_2 podem ser dessensibilizados ou tornarem-se *downregulated* durante estimulação simpática prolongada, limitando a produção de AMPc. É possível que esses receptores mediem os efeitos sistêmicos da NE, tais como ativação parcial da lipólise e da termogênese, regulação do fluxo sanguíneo e da proliferação celular (ATGIÉ; D'ALLAIRE; BUKOWIECKI, 1997).

Vários mecanismos moleculares têm sido envolvidos na dessensibilização desses receptores, principalmente da isoforma β_2 . Um mecanismo proposto envolve a fosforilação da PKA logo após sua ativação pela NE, resultando num rápido desacoplamento do receptor da via de transdução do sinal (BENOVIC *et al*, 1988,1989; BOUVIER *et al*, 1989; HAUSDORFF *et al*, 1989). Outra forma de dessensibilização dos receptores β_2 ocorre durante a ativação do receptor por longos períodos de tempo. Nesse caso, ocorreria degradação de receptores pré-existentes e dessensibilização do RNAm desses receptores, reduzindo o número de receptores na superfície da membrana celular (DOSS *et al*, 1981; MORISHIMA *et al*, 1980; HOMBURGER *et al*, 1984; HADCOCK e MALBON, 1988).

O receptor β_1 tem poucos sítios de fosforilação e não apresentam dois resíduos de tirosina implicados na *downregulation* do β_2 (VALIQUETTE *et al*, 1990), sendo, portanto, menos sensível à dessensibilização do que o β_2 .

Os receptores β_3 são de baixa afinidade, mas são particularmente resistentes à dessensibilização induzida pelas catecolaminas, pois não apresentam o sítio sensível à fosforilação que está envolvido no processo de dessensibilização dos receptores acoplados à proteína G (CARPÉNÉ *et al*, 1993; GRANNEMAN, 1992; NANTEL *et al*, 1993, 1994).

Quando camundongos são tratados com dieta hipercalórica por um longo período, ocorre intensa estimulação simpática, o que faria com que os receptores adrenérgicos β_3 permanecessem funcionais, enquanto os receptores β_1 e β_2 tornar-se-iam *downregulated*. Isso sugere que os receptores adrenérgicos β_3 poderiam ser mediadores dos efeitos da NE liberados pelos nervos simpáticos quando a termogênese é ativada por períodos prolongados (ATGIÉ; D'ALLAIRE; BUKOWIECKI, 1997). Os receptores β_3 representariam, portanto, um receptor fisiológico para a NE secretada nas terminações dos nervos simpáticos quando sua concentração na fenda sináptica é alta e/ou quando os receptores de alta afinidade β_1/β_2 estejam dessensibilizados pela estimulação simpática prolongada (D'ALLAIRE *et al* 1995). No entanto, não há consenso nessa “divisão de tarefas”.

Assim, a contribuição dos três receptores adrenérgicos β para a regulação dos processos metabólicos que ocorrem nos adipócitos pode variar durante diferentes condições fisiológicas como exposição ao frio, a idade dos animais e a composição da dieta (HIMM-HAGEN, 1990).

1.3 Receptores β adrenérgicos e termogênese facultativa induzida pela dieta

A energia corpórea armazenada é relativamente estável durante longos períodos de tempo e a restrição, ou o excesso, de ingestão calórica desencadeia mecanismos compensatórios para manter os estoques energéticos constantes (WEIGLE, 1994; WILSON *et al*, 1990). A gordura é armazenada quando as calorias consumidas excedem as calorias gastas. Portanto, em princípio, a obesidade pode ser causada pelo aumento das calorias ingeridas, diminuição do gasto de energia, pela combinação de ambos ou ainda por prejuízos na mobilização dos estoques de gordura (BACHMAN *et al*, 2002; LEE *et al*, 1996; ZHANG *et al*, 1994). Como o ganho ou a perda de peso é determinado pelo balanço

em longo prazo entre o ganho e o gasto energético, é importante entender os fatores que compõem e regulam o gasto energético em condições normais.

A energia total gasta por um organismo pode seguir três caminhos: 1) a energia necessária para executar funções celulares e orgânicas, chamada de termogênese obrigatória; 2) o aumento no gasto energético induzido pela dieta ou pela exposição ao frio, chamada de termogênese química ou facultativa e 3) a atividade física.

A termogênese facultativa induzida pela dieta é mediada pelo sistema nervoso simpático através da estimulação dos receptores adrenérgicos β que ativam no BAT os mecanismos de liberação de calor (BACHMAN *et al*, 2002). Esses receptores, portanto, podem ser alvos para o tratamento da obesidade. Como animais que não expressam as três isoformas de receptor β , os animais TKO são sensíveis à obesidade induzida pela dieta, assim, é possível que o aumento no acúmulo de gordura seja devido a um prejuízo na função do BAT. Portanto, um defeito na termogênese induzida pela dieta seria uma possível explicação para a obesidade que tem sido relacionada à ineficiência do tecido adiposo marrom em diversos modelos experimentais (BACHMAN *et al*, 2002).

Diversos estudos têm indicado o receptor adrenérgico β_3 como um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas terapêuticas anti-obesidade e anti-diabetes (STROSBERG, 1997a e b). Estudos demonstraram que tratamentos diários em ratos jovens com CL-316,243, um agonista específico para os receptores adrenérgicos β_3 , por 2 semanas retardaram o desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta hipercalórica (HIMMS-HAGEN *et al*, 1994). Essa proteção à obesidade foi associada com um aumento da taxa metabólica e dos níveis de UCP-1. (CHAMPIGNY *et al*, 1991; COLLINS *et al*, 1997; FISHER *et al*, 1998; GHORBANI *et al*, 1997; HIMMS-HAGEN *et al*, 1994; SASAKI *et al*, 1998).

Entretanto, camundongos nocaute para o receptor adrenérgico β_3 alimentados com dieta hipercalórica passam por alterações de composição corporal, principalmente no aumento dos estoques de gordura e a maior porcentagem do peso de gordura, mas esse aumento é relativamente pequeno quando comparado a outros modelos de roedores geneticamente obesos (ROHRER, 1998). Essas características sugerem que o β_3 desempenha um pequeno papel na regulação do balanço energético ou que mecanismos adaptativos compensatórios ocorram pela deficiência do receptor β_3 que limita o desenvolvimento de obesidade (SUSULIC *et al*, 1995). De fato, esses animais nocaute para o receptor adrenérgico β_3 apresentam um aumento na expressão do receptor β_1 , no

BAT. Portanto, é possível que os receptores β_1 ou β_2 também apresentem efeitos antiobesidade. A ativação dos receptores β_1 e β_2 nos animais com nocaute para a isoforma β_3 aumenta o consumo de oxigênio e elimina a intolerância ao frio e reduz o excesso de tecido adiposo branco (ARCH *et al*, 1984). Além disso, camundongos transgênicos que superexpressam os receptores adrenérgicos β_1 apresentam resistência à obesidade induzida pela dieta (SOLOLEVA *et al*, 1997).

Por outro lado, outros estudos sugerem que a termogênese e a lipólise no BAT são principalmente mediadas pelos receptores adrenérgicos β_1 e β_3 e que os receptores adrenérgicos β_2 desempenham um menor papel no controle desse processo metabólico. (ATGIÉ; D'ALLAIRE; BUKOWIECKI, 1997).

Os receptores β também apresentam ação lipolítica no tecido adiposo branco e as três isoformas já foram implicadas em mediar este efeito (ARCH *et al*, 1984; SUSULIC *et al*, 1995; SOLOLEVA *et al*, 1997).

Por outro lado, quando dietas hipercalóricas são administradas por longos períodos a animais selvagens, a resposta lipolítica não aumenta em função do estabelecimento da obesidade, sugerindo o desenvolvimento de uma certa “resistência adrenérgica”. COLLINS *et al* (2004 e 1999) demonstraram a diminuição da velocidade de lipólise em animais alimentados com dieta hipercalórica que poderia ser explicada pela diminuição da expressão de receptores β adrenérgicos. Além disso, uma vez estabelecida a obesidade e a resistência a insulina, ocorre diminuição da expressão do receptor adrenérgico β_3 , podendo contribuir para redução na mobilização de triglicérides e diminuição da termogênese (HAMANN, FLIER, LOWELL, 1996).

Em conjunto, esses dados mostram que o papel de cada isoforma no desenvolvimento da obesidade, ainda não é claro.

Outro aspecto importante é a captação de glicose no BAT, marcadamente aumentada durante duas condições metabólicas opostas: durante processo anabólico ativo (estimulado pela insulina) e ativação da termogênese (ativada pelo sistema nervoso simpático) (MARETTE e BUKOWIECKI, 1989; SHIMIZU *et al*, 1991; LIU *et al*, 1994). A insulina promove a utilização de glicose e lipogênese no BAT (McCORMACK, 1982; NEDERGAARD e LINDBERG, 1982) e é exigida para a termogênese induzida pelo frio e pela dieta (ROTHWELL e STOCK, 1981). De fato, estudos realizados em cultura de adipócitos marrons demonstraram uma interação entre os sistemas de sinalização da

insulina e adrenérgico (BRONNIKOV *et al*, 1999; BENGTTSSON *et al*, 2000; KIKUCHI-UTSUMI *et al*, 1997; LINDQUIST *et al*, 2000; NIKAMI *et al*, 1996).

Há outras formas de regulação do catabolismo lipídico, crucial para a termogênese facultativa, além da realizada pelo SNS. A leptina, grelina e hormônio tireoideano participam de forma importante nos mecanismos envolvidos nesses processos.

A leptina é um hormônio antilipogênico que aumenta o gasto energético, apresentando duas ações: a primeira, em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, onde estimula a expressão de neuropeptídeos relacionados aos mecanismos de inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético total via inervação simpática; e a segunda, agindo em outros neurônios do mesmo núcleo, inibindo a expressão de neuropeptídeos, envolvidos no aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético (FONSECA-ALANIZ *et al*, 2006). A produção de leptina aumenta proporcionalmente ao tamanho dos adipócitos e os níveis de leptina são altos em animais que se tornam obesos após o tratados com dieta hipercalórica (HALAAS *et al*, 1997; HEYMSFIELD *et al*, 1999; LEVIN *et al*, 2002; LI *et al*, 1997; WIDDOWSON *et al*, 1997). Entretanto, apesar de aumentada, a leptina apresenta uma falha na sua sinalização que pode ser causada pela redução no seu transporte através da barreira hematoencefálica (BANKS e FARRELL, 2003), diminuindo a atividade. A estimulação dos efeitos da leptina no gasto energético exigem receptores adrenérgicos β funcionais (ASSENSIO *et al*, 2008) e isso é consistente com a hipótese de que a termogênese poderia ser um importante mecanismo pelo qual a leptina regula a composição corporal.

Já a grelina é um hormônio secretado pelo estômago e que causa aumento do peso corporal, por aumentar a ingestão alimentar quando administrado farmacologicamente (NAKAZATO *et al*, 2001; TSCHOP *et al*, 2000; DORNONVILLE DE LA COUR *et al*, 2005). A síntese e secreção de grelina é regulada pelo estado nutricional, sendo que o aumento na ingestão de calorias diminui os níveis circulantes de ghrelina (TSCHOP *et al*, 2001; OTTO *et al*, 2001; WILLIAMS e CUMMINGS, 2005; DORNONVILLE DE LA COUR *et al*, 2005). Quando ocorre diminuição da ingestão de calorias, a grelina é secretada e age no núcleo arqueado no hipotálamo aumentando a expressão do neuropeptídeo Y, que é um potente orexígeno que induz a fome (SCHWARTZ *et al*, 2000; SHINTANI *et al*, 2001; UKKOLA e POYKKO, 2002). No tecido adiposo branco a grelina aumenta a captação de glicose e triglicerídeos, aumenta a lipogênese e inibe a oxidação de lipídeos. Enquanto que no tecido adiposo marrom, diminui a expressão de

UCP-1. Esses efeitos da grelina parecem ser mediados pelo SNS (THEANDER-CARRILLO *et al*, 2006).

O hormônio tireoideano é exigido para a resposta termogênica do BAT (HIMMS-HAGEN, 1983). Existe uma complexa interação entre o *status* da tireóide e a ação do SNS (HIMMS-HAGEN, 1983;1985). As ações do T3 são mediadas por duas isoformas, TR α e TR β e apresentam importante papel na mediação da termogênese facultativa, onde a isoforma TR α medeia o sinergismo entre as vias de sinalização do hormônio tireoideano e receptores adrenérgicos e a isoforma TR β induz a expressão de UCP-1 (RIBEIRO *et al*, 2001).

1.4 Receptores β adrenérgicos e termogênese facultativa induzida pelo frio

Durante aclimatação ao frio o hipotálamo, através do feixe prosencefálico medial, inicia a termogênese facultativa por meio de um mecanismo involuntário que é o tremor muscular. O músculo esquelético é o mais abundante tecido corporal, podendo contribuir significativamente para a manutenção da temperatura corporal durante a exposição ao frio. Cerca de 25-45% da produção de calor no músculo está relacionada com a utilização da energia derivada do gradiente de Ca²⁺ mantido pela Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (CHINET; DECROUY; EVEN, 1992), promovendo o *turnover* do ATP (HASSELBACH, 1978; de MEIS, 1989). Porém, esse tremor muscular ocasiona perda de calor por convecção devido a oscilações corpóreas e é, conseqüentemente, uma forma menos econômica de gerar calor quando comparada com o desacoplamento mitocondrial, principalmente em pequenos mamíferos e humanos recém-nascidos, que apresentam alta razão de área de superfície da massa corporal. Por esse motivo, a termogênese que não envolve tremorigênese (ou tremor muscular) é a principal fonte de calor em humanos e mamíferos (BIANCO *et al*, 2005), sendo o BAT o principal sítio da termogênese induzida pelo frio.

O mecanismo bioquímico pelo qual o BAT gera calor envolve exclusivamente a UCP-1, já que camundongos que não expressam a UCP-1 são incapazes de manter a temperatura corporal quando expostos ao frio. (GOLOZOUBOVA, *et al*, 2001). Diferentes isoformas de UCP têm sido identificadas, incluindo a UCP-2 encontrada em muitos tecidos e a UCP-3 que é altamente expressa no músculo esquelético. É possível que essas diferentes isoformas também induzam a respiração desacopladora e diminuam a síntese de ATP (ECHTAY *et al*, 2001; RICQUIER e BOUILLAUD, 2000). Porém, o papel fisiológico

das UCP-2 e UCP-3 ainda é controverso (JANSKÝ, 1995; SKULACHEV, 1998; LOWELL e SPIEGELMAN, 2000).

Os receptores β adrenérgicos medeiam a ativação da termogênese facultativa induzida pelo frio por mamíferos homeotérmicos aclimatados ao frio (PETTERSSON e VALLIN, 1976; FAIN *et al*, 1973; HEIM e HULL, 1966; FLAIM *et al*, 1977; FINK e WILLIAMS, 1976). Entretanto, o papel de cada isoforma ainda permanece a ser esclarecido.

Como camundongos TKO são intolerantes ao frio, é possível que os adipócitos marrons desses animais possam estar termogenicamente inativados, como indicado pela reduzida expressão de UCP-1 e pela ausência de efeito do frio em aumentar a expressão da proteína UCP-1 (SUSULIC *et al*, 1995; ROHRER *et al*, 1996).

Alguns estudos mostraram que a estimulação simultânea dos receptores β_1 e β_2 por doses fisiológicas de agonistas específicos a essas duas isoformas aumenta a taxa metabólica em humanos aclimatados ao frio em 59% (JANSKÝ *et al*, 2008; LESNÁ *et al*, 1999). Dessa forma, ambos os tipos de receptores β podem participar na mediação da resposta metabólica para a NE e para a adrenalina, embora a isoforma β_1 pareça ser mais proeminente que a isoforma β_2 (BLAAK *et al*, 1993 a, b). Os receptores β_3 também apresentam papel importante em aumentar a taxa metabólica quando humanos são expostos ao frio (BLAAK *et al*, 1993 a).

Por outro lado, os estudos em adipócitos marrons isolados de hamster constataam que somente o receptor β_3 estimula a termogênese facultativa (ZHAO *et al*, 1994). Esses resultados também foram observados em adipócitos marrons isolados de ratos, onde somente o β_3 foi acoplado com a termogênese (ZHAO; CANNON; NEDERGAARD, 1998). Entretanto, esse achado é contrastado com estudos que estimularam adrenergicamente a ativação da adenilil ciclase em preparados de adipócito marrom de ratos. Em tais preparações, tanto o receptor β_1 quanto o β_3 são capazes de estimular a adenilil ciclase (CHAUDHRY *et al*, 1992; GRANNEMAN, 1990; GRANNEMAN e WHITTY, 1991). Porém, em camundongos nocaute para o receptor adrenérgico β_3 a resposta termogênica induzida pelo frio não foi afetada (SUSULIC *et al*, 1995).

Esses achados mostram que realmente a sinalização dos receptores β adrenérgicos é exigida para a função termogênica do BAT e para a manutenção da temperatura corporal durante exposição ao frio.

Embora a ativação da termogênese facultativa pelos receptores adrenérgicos β seja fundamental para a regulação do peso e para a manutenção da temperatura corporal, o papel isolado de cada um desses receptores nesses processos ainda permanece a ser esclarecido.

2 OBJETIVOS

Determinar o papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa induzida pela dieta ou pelo frio.

O tratamento de animais com nocaute para apenas um subtipo dos receptores adrenérgicos β com dieta hipercalórica assim como exposição destes animais ao frio, nos dá a oportunidade de avaliar a função destes receptores na termogênese facultativa. Portanto, o presente trabalho pretende estudar o efeito da dieta hipercalórica ou da queda da temperatura corporal em camundongos com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 e camundongos com nocaute para o receptor adrenérgico β_2 .

2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o papel dos receptores β_1 e β_2 no desenvolvimento da obesidade estimulada por dieta hipercalórica.

A ativação farmacológica dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e β_3 induz lipólise e protege contra obesidade (ATGIÉ; D'ALLAIRE; BUKOWIECKI, 1997), mas ainda não está totalmente estabelecido o papel de cada um dos subtipos dos receptores. É possível que os três subtipos sejam redundantes na mediação dos efeitos do SNS na termogênese facultativa ou não.

- 2) Avaliar o grau de envolvimento dos diferentes subtipos de receptores no controle da termogênese em animais que não expressem o receptor β_1 ou β_2 expostos ao frio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 29 camundongos machos que apresentaram nocaute para o receptor adrenérgico β_1 ($KO\beta_1^{-/-}$), 25 camundongos machos que apresentaram nocaute para o receptor adrenérgico β_2 ($KO\beta_2^{-/-}$), doados pela Profª. Dra. Patrícia Chacur Brum, da Faculdade de Educação Física da Universidade de São Paulo. Os animais tinham cerca de dois meses de idade, pesando aproximadamente 27g. Como controles foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem C57/BL6 para os animais $KO\beta_1^{-/-}$ e 28 camundongos machos da linhagem FVB para os animais $KO\beta_2^{-/-}$. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com não mais que cinco animais por gaiola, recebendo água e comida *ad libitum*, com temperatura de 24° C e ciclo de claro e escuro de 12 horas, no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Protocolo 1: Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese induzida pela dieta e no desenvolvimento da obesidade.

Para o estudo do desenvolvimento da obesidade, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

C57 (n=8): animais selvagens da linhagem C57, alimentados com dieta padrão (1,8Cal/g);

C57 Hiper (n=8): animais selvagens da linhagem C57 tratados com dieta hipercalórica (4,7Cal/g);

$KO\beta_1$ (n=8): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_1 da linhagem C57 alimentados com dieta padrão;

$KO\beta_1$ Hiper (n=8): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_1 da linhagem C57 tratados com dieta hipercalórica;

FVB (n=8): animais selvagens da linhagem FVB alimentados com dieta padrão;

FVB Hiper (n=8): animais selvagens da linhagem FVB tratados com dieta hipercalórica;

$KO\beta_2$ (n=8): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_2 da linhagem FVB alimentados com dieta padrão;

KO β_2 Hiper (n=8): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_2 da linhagem FVB tratados com dieta hipercalórica.

Os animais foram alimentados com ração hipercalórica durante vinte e duas semanas, tempo necessário para tornarem-se obesos. Durante esse período, mediram-se diariamente o peso corporal e o consumo de ração. Ao final do protocolo, os animais foram submetidos à medida do consumo de oxigênio, para a determinação do metabolismo energético em resposta à dieta hipercalórica. Além disso, realizaram-se testes de tolerância à glicose e à insulina para traçar o perfil metabólico. Os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento sob anestesia por uretana (560 mg/kg; i.p.) e cloralose (38 mg/kg; i.p.). Coletaram-se amostras de sangue para medidas de colesterol e lipídeos plasmáticos. Com as carcaças desses animais, determinou-se a sua composição corporal. Também foi retirado o BAT e imediatamente congelado para posterior determinação de RNAm PCR em tempo real.

3.2 Dieta hipercalórica

A dieta hipercalórica rica em gordura é produzida pela Rhoster Ind. E Com. Ltda. e é constituída por 19% de proteína, 24% de gordura e 19% de carboidratos, totalizando 4,7Cal/g. A dieta padrão apresenta 1,8 Cal/g.

3.3 Consumo de oxigênio

A determinação do metabolismo energético em resposta à dieta hipercalórica ou padrão foi feita através da medida de consumo de oxigênio (VO₂). O consumo de oxigênio em repouso foi medido utilizando-se um sistema de respirometria aberto (FC-10A, Sable Systems, Las Vegas, NV USA) conforme descrito na literatura (WITHERS, 1977). Os animais foram colocados dentro de uma caixa de acrílico (15cmx10cmx10cm) com dois pontos para entrada e saída de ar e mantidos no interior de uma estufa com temperatura controlada (25° C) (Eletrolab, São Paulo, SP), onde permaneceram durante 1 hora para a realização do experimento. Para coleta e análise dos dados, usou-se um

software (Sable Systems, Las Vegas, NV). Os resultados foram expressos em termos de mililitros de O₂ por min/Kg⁻¹ de peso corpóreo.

3.4 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os experimentos foram realizados pela manhã (09h00min). Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e então receberam uma dose de glicose (2g/Kg de peso corporal) em solução salina (0,9% NaCl) intraperitonealmente. Mediram-se os níveis de glicose sanguíneos em amostras do sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (antes da injeção de glicose), 30, 60, 90 e 120 minutos depois da injeção de glicose, utilizando-se glicosímetro (One touch Ultra, Johnson&Johnson, São Paulo, SP) (ASENSIO *et al*, 2005).

3.5 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Os experimentos foram realizados à tarde (14h00min). Depois submetidos a jejum de 4 horas, os animais receberam uma dose de insulina (0,5U/g de peso corporal) intraperitonealmente. Mediram-se os níveis de glicose sanguíneos em amostras do sangue da cauda retiradas nos tempos 0 (antes da injeção de glicose), 30 e 60 minutos depois da injeção de insulina, utilizando-se glicosímetro (One touch Ultra, Johnson&Johnson, São Paulo, SP) (ASENSIO *et al*, 2005).

3.6 Medida de Colesterol Plasmático

O colesterol plasmático foi determinado por colorimetria utilizando-se um *kit* comercial (Enzymatic Cholesterol Human GmbH, Germany), seguindo-se as instruções do fabricante. Para o teste, utilizaram-se 10µl de plasma de cada amostra ou do padrão e adicionaram-se 1000µl do reagente. Posteriormente, foi medida a absorbância das amostras num comprimento de onda de 500nm.

3.7 Medida de Triglicérides Plasmático

O triglicérides plasmático foi determinado por colorimetria, utilizando-se um *kit* comercial (Enzymatic Triglycerides Human GmbH, Germany), seguindo-se as instruções do fabricante. Para o teste, utilizaram-se 10µl de plasma de cada amostra ou do padrão e acrescentaram-se 1000µl do reagente. Posteriormente, mediu-se a absorbância das amostras num comprimento de onda de 500nm.

3.8 Determinação da composição corporal por análise da carcaça

As carcaças foram pesadas e cozidas em autoclave por 1 hora em 1 KGF e posteriormente trituradas em liquidificador com o dobro da quantidade de água que o peso do animal. Adicionaram-se às alíquotas de 5 gramas de cada carcaça 2 ml de KOH (30%) e essas misturas homogeneizadas e colocadas em banho-maria a 70° C por 15 minutos. Foram acrescentados às amostras 3 ml de etanol que permaneceram 1 hora e 45 minutos à 70° C. Após essas duas horas, colocaram-se os tubos no gelo e adicionaram-se 2,5 mL de H₂SO₄ (6N) e as misturas foram homogeneizadas. Para a extração da gordura, foram acrescentados 8 mL de éter de petróleo aos tubos e a mistura homogeneizada num agitador orbital por 10 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 1500 rpm a 10° C. Separou-se o sobrenadante, com auxílio de pipeta Pasteur, em outro tubo e o restante da mistura foi novamente processado até a obtenção de um volume maior do sobrenadante, deixado em tubos abertos durante 48 horas para que o éter de petróleo evapore, sobrando somente a gordura que, então, foi pesada (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957).

3.9 Isolamento de RNA do BATi e análise de RNAm por PCR em tempo real

Ao RNA total extraído do tecido adiposo marrom utilizou-se TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) (500µl), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria. Determinou-se a purificação do RNA pelo cálculo das absorbâncias de

260nm e 280nm e pela corrida em gel de agarose corado com brometo de etídeo. O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0µg), utilizando-se transcriptase reversa ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) em termociclador Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA) a 70° C por 5 min seguido de 25 ° C por 5 min, 42 ° C por 60 min e 4 ° C por 30 min. O cDNA transcrito foi utilizado para a avaliação da expressão do RNAm dos seguintes genes por PCR em tempo real: ciclofilina A (Cyclo-A) usada como controle interno; ARβ₂ e ARβ₃. As sequências dos primers utilizados são apresentadas na tabela 1.

O valor relativo à amplificação do RNAm referente a cada gene estudado foi avaliado através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector Rotor-Gene 6000 (Corbert, Austrália), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Para a preparação das reações utilizou-se diferentes concentrações de primers e DNAc, dependendo do gene avaliado, sempre somando 15uL. Os ciclos utilizados foram: 5 min à 95° C (Hot Start); 30s à 95° C, 30s à 60° C e 40s à 72° C por 40 ciclos seguidos pelo protocolo de *melting curve* para verificar a especificidade da geração do fragmento amplificado.

Tabela 1. Sequência dos primers para PCR em tempo real.

Primer	Sense	Antisense
ARβ ₂	5'-TGCCAAGTTCGAGCGACTAC-3'	5'-CACACGCCAAGGAGATTATGA-3'
ARβ ₃	5'-TCCTTCTACCTTCCCCTCCTT-3'	5'-GCGCTTAGCCACAACGAACAC-3'
Ciclo A	5'-GCCGATGACGAGCCCTTG-3'	5'-TGCCGCCAGTGCCATTATG-3'

3.10 Determinação da eficiência das reações de amplificação dos receptores adrenérgicos β

Para este estudo, determinou-se a eficiência das amplificações, uma vez que as comparações foram feitas entre genes distintos. Realizou-se amplificações para cada gene utilizando-se 0,75; 1,5; 3,0; 6,0µl de DNAc como template. A quantificação de DNAc, em escala logarítmica, foi plotada vs. Ct (threshold cycle). A quantificação relativa da expressão gênica de referência foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do ΔΔCt como previamente descrito por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). O

método do $\Delta\Delta\text{Ct}$ se baseia numa amostra calibradora que serve de referência para o cálculo da expressão relativa de todas as outras amostras. Esse método considera o fato da eficiência da amplificação da amostra calibradora e das demais ser a mesma. Para a comparação da expressão relativa do RNAm dos receptores adrenérgicos β_2 vs. β_3 em uma mesma linhagem e para comparação da expressão de cada uma dessas isoformas entre animais controles e nocaute, também utilizou-se o método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Para essas comparações, a quantificação relativa do C57 foi determinada designando-se a sua expressão como 1 (um), ou seja, a expressão do C57 utilizada como amostra calibradora. Os resultados foram expressos usando o método comparativo cycle threshold (Ct). Calculou-se os valores do ΔCt em várias amostras para cada gene de interesse como valores de $\text{Ct}_{\text{gene de interesse}}$ menos $\text{Ct}_{\text{gene reporter}}$. O cálculo da relativa mudança dos níveis de expressão gênica de um gene específico ($\Delta\Delta\text{Ct}$) foi realizada pela subtração do ΔCt do grupo controle. Determinou-se os valores e as variações da seguinte maneira: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ com $\Delta\Delta\text{Ct}$. Os valores de Ct obtidos foram normalizados com o controle interno e os resultados foram expressos em “vezes de indução”.

Protocolo 2: Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese induzida pelo frio.

Para a determinação da resposta dos animais no frio, foram estudados os seguintes grupos:

C57 (n=16): animais selvagens da linhagem C57;

KO β_1 (n=13): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_1 da linhagem C57;

FVB (n=12): animais selvagens da linhagem FVB;

KO β_2 (n=9): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_2 da linhagem FVB.

Para determinar a sensibilidade ao frio, os animais tiveram sua temperatura central medida durante exposição ao frio (4° C). Além disso, mediu-se o consumo de oxigênio desses animais durante exposição a diferentes temperaturas, a fim de se estudar a resposta

metabólica ao frio. Avaliou-se a capacidade termogênica do BAT dos animais diretamente durante a estimulação com NE ou outro agonista adrenérgico especificado.

3.11 Exposição ao frio

Determinou-se a sensibilidade ao frio nos animais nocaute como descrito em ENERBÄCK *et al*, 1997. Os animais tiveram sua temperatura corporal medida utilizando-se um termômetro de alta precisão com uma sonda retal de 1mm de diâmetro (Y4000, YSI, Yellow Springs OH). As medidas foram feitas inicialmente à temperatura ambiente. Depois os animais foram colocados em gaiolas separadas e expostos ao frio de 4° C em uma câmara com temperatura controlada (Eletrolab, São Paulo, SP), por três horas. Mediu-se a temperatura corporal a cada hora.

3.12 Consumo de oxigênio durante exposição ao frio

Realizou-se a determinação da resposta metabólica ao frio através da medida de consumo de oxigênio durante a exposição dos animais a temperaturas crescentes. O consumo de oxigênio em repouso (VO_2) foi medido como descrito no item 3.3. Os animais foram expostos a diferentes temperaturas (5° C, 15° C, 25° C, 30° C, 32° C, 34° C e 36° C) e a medida de consumo de O_2 foi realizada durante 1 hora a cada temperatura.

3.13 Resposta térmica do BAT à infusão de NE

A capacidade termogênica do BAT foi determinada como descrito em RIBEIRO *et al*, 2001. Brevemente, os camundongos foram anestesiados com uretana (560 mg/kg; i.p.) e cloralose (38 mg/kg; i.p.) pela manhã e, durante todo o experimento, foram mantidos sobre um colchão aquecido (30° C) a fim de evitar queda excessiva da temperatura corpórea ao longo do experimento. A fim de garantir que o colchão aquecido não elevasse a temperatura corporal dos animais, mas sim, impedisse apenas a queda excessiva da temperatura corporal, realizou-se a infusão de salina nas mesmas condições.

Assim, a temperatura central e do BAT caiu lentamente ao longo de 30 minutos. Após profundamente anestesiados, inseriu-se uma cânula de polietileno (PE-50) na veia jugular esquerda dos animais, usada posteriormente para infusão de NE (4mg/ml). A temperatura do BAT interscapular (BATi) dos camundongos foi medida, fazendo uso de um termistor pré-calibrado YSI 427 (YSI; Yellow Springs OH) colocado sob o BAT e preso firmemente por sutura. Mediu-se a temperatura central por um termistor colônico YSI 423. Conectaram-se as sondas a um termômetro de precisão (YSI Precision 4000A Thermometer, YSI) e as temperaturas registradas a cada minuto. A temperatura do BAT foi medida durante 10 minutos para obtenção de uma linha basal e então, iniciou-se a infusão de NE. Realizou-se a infusão de NE (6–8 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) por meio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus modelo 2274, Holliston, MA) por 30 minutos nos camundongos. Os dados foram organizados em função do tempo e expressos em termos de variação máxima da temperatura do BAT ($\Delta^\circ\text{C}$).

3.14 Resposta térmica do BAT à infusão de dobutamina

A fim de se verificar o papel receptor β_1 na ativação da termogênese do BAT, fez-se a medida da liberação de calor pelo BAT, conforme descrito anteriormente no item 3.14, durante a infusão de Dobutamina, um agonista específico para o receptor β_1 (TUTTLE e MILLS, 1975). Os dados foram organizados em função do tempo e expressos em termos de variação máxima da temperatura do BAT ($\Delta^\circ\text{C}$).

Análises Estatísticas

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos foi testada pela Anova One-way, seguido do teste Student-Newman-Keuls para detectar diferenças entre os grupos. Para a realização dos testes estatísticos e construção dos gráficos foi utilizado o software Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todos os testes $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os resultados foram expressos como média e DP.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da composição corporal e desenvolvimento da obesidade

Com objetivo de determinar o papel dos receptores adrenérgicos na regulação do peso corporal, os animais $KO\beta_1$ e animais $KO\beta_2$ foram tratados com dieta hipercalórica por 22 semanas.

Como podemos notar na Figura 2, os animais de todos os grupos estudados apresentavam peso corporal similar no início do experimento. Ao longo do tratamento, não houve diferença no ganho de peso corporal dos C57 quando comparados com os $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão. Já a dieta hipercalórica induziu aumento significativo no peso corporal tanto dos animais C57 Hiper quanto dos animais $KO\beta_1$ Hiper.

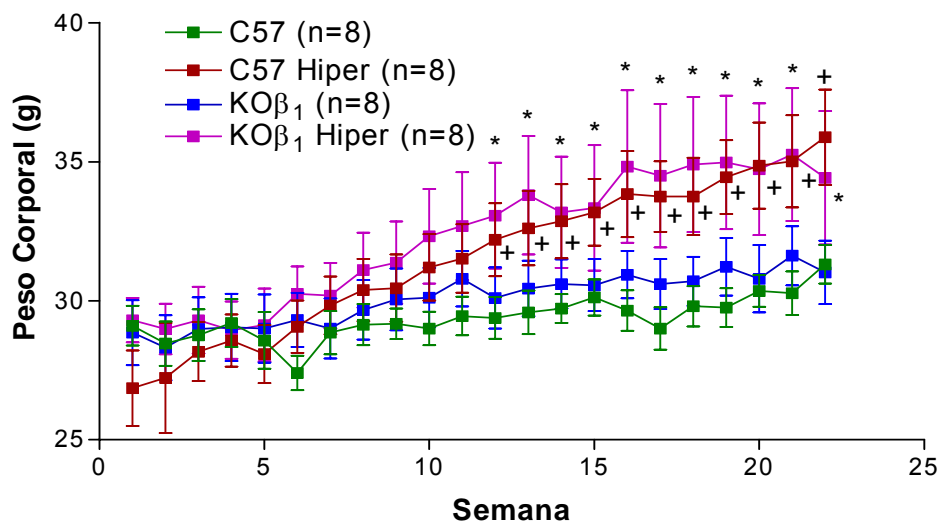


Figura 2. Peso dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. $KO\beta_1$ com $p < 0,001$; + vs. C57 com $p < 0,001$.

No entanto, a ausência do receptor β_1 não causou maior aumento de ganho de peso induzido pelo tratamento com dieta hipercalórica, como podemos confirmar na Figura 3. De fato, o ganho de peso corporal nos animais C57 Hiper foi similar ao ganho de peso nos animais $KO\beta_1$ Hiper.

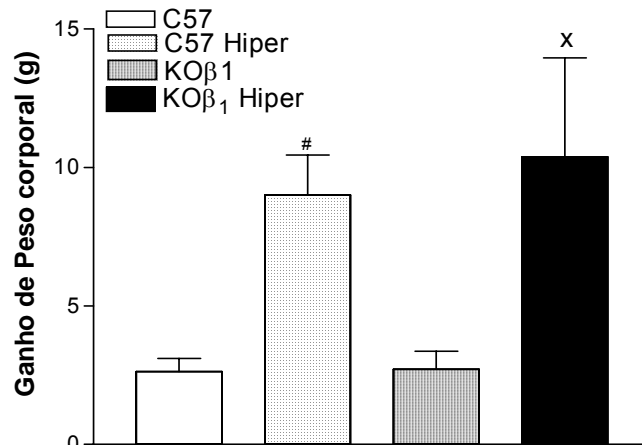


Figura 3. Ganho de peso dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou hipercalórica ao final do tratamento. Os valores estão expressos como média \pm DP. # vs. C57 com $p < 0,01$; x vs. $KO\beta_1$ com $p < 0,05$.

Resultados semelhantes foram observados quando avaliamos o papel dos receptores β_2 , no desenvolvimento da obesidade. Na figura 4 podemos observar que os animais FVB tratados com dieta hipercalórica ganharam mais peso quando comparados aos animais tratados com dieta padrão.

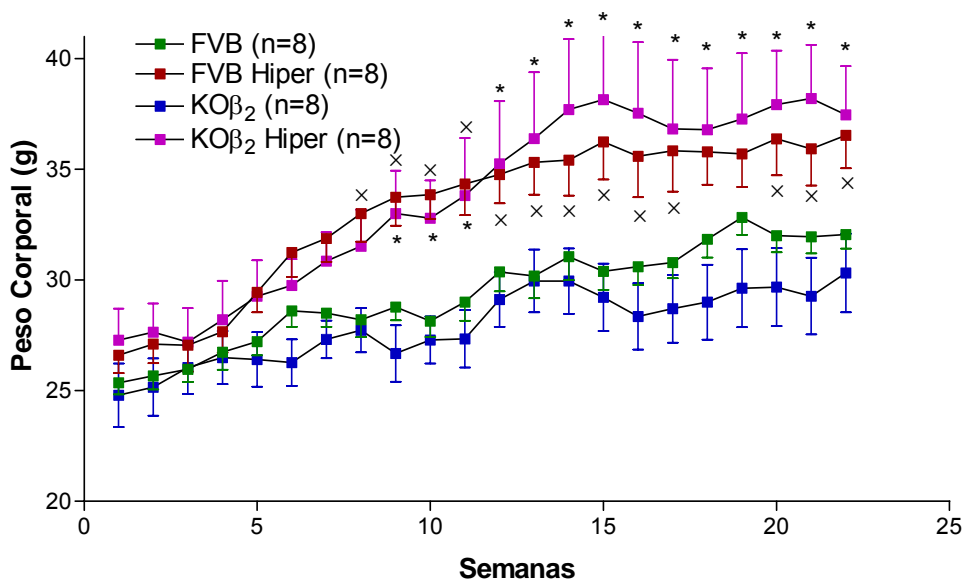


Figura 4. Peso dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. $KO\beta_2$ com $p < 0,001$; x vs. FVB com $p < 0,001$.

No entanto, os camundongos $KO\beta_2$ se comportaram de forma semelhante aos animais selvagens, ou seja, os $KO\beta_2$ ganharam tanto peso quanto os FVB quando tratados com dieta padrão ou hipercalórica, sugerindo que a ausência dos receptores β_2 não piora o ganho de peso durante a ingestão de dieta rica em gordura (figura 5).

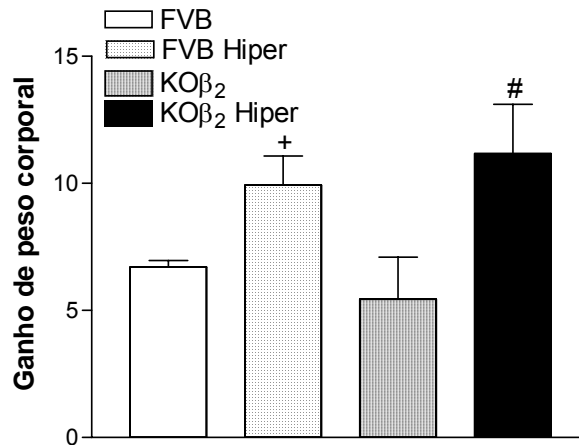


Figura 5. Ganho de peso dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão ou hipercalórica ao final do tratamento. Os valores estão expressos como média \pm DP. + vs. FVB com $p < 0,001$; # vs. $KO\beta_2$ com $p < 0,05$.

Para confirmar que os animais tratados com dieta hipercalórica estavam realmente ingerindo mais calorias, mediu-se a ingestão alimentar. Os camundongos tratados com dieta padrão e tratados com dieta hipercalórica apresentaram consumo alimentar similar, como podemos observar nas Figuras 6 e 7. Apesar de numericamente inferior não há diferença significativa entre os grupos alimentados com dieta padrão e com dieta hipercalórica. Dessa forma, os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram um aumento na ingestão de calorias, uma vez que a dieta hipercalórica apresenta 4,7cal/g de calorias contra 1,8cal/g da dieta padrão, isto é, os animais tratados com dieta hipercalórica consumiram ~14 calorias diárias vs. ~7,2 calorias da ração padrão.

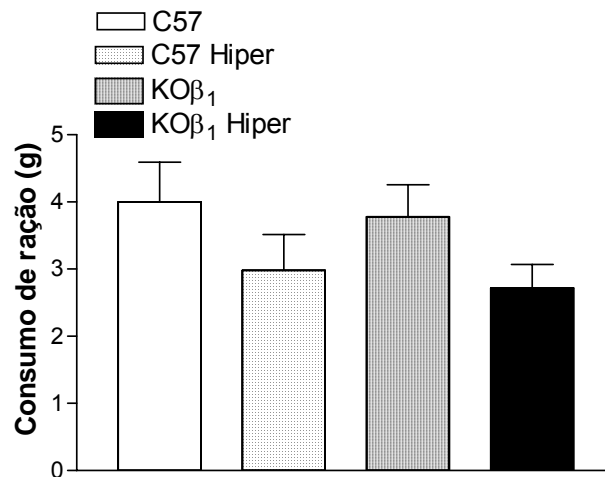


Figura 6. Consumo de ração diário dos camundongos C57 e KOβ₁ tratados com dieta padrão ou dieta hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média ± DP.

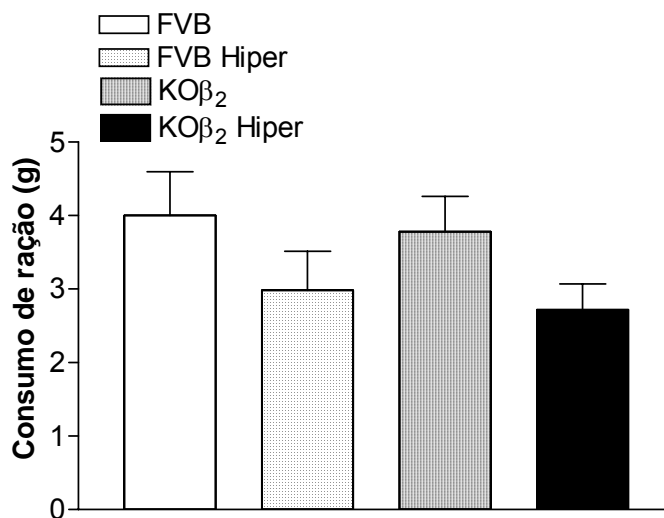


Figura 7. Consumo de ração dos camundongos FVB e KOβ₂ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média ± DP.

A fim de determinar se o ganho de peso corporal ocorreu pelo aumento da quantidade total de massa gorda dos animais, analisou-se as alterações na composição corporal dos animais tratados com a dieta rica em gordura por meio da análise da carcaça.

Como esperado, a ingestão de dieta hipercalórica aumentou significativamente a quantidade de gordura corporal dos animais C57 Hiper e FVB Hiper (Figura 8). No entanto, apesar do tratamento com dieta hipercalórica nos animais KOβ₁ ter induzido

maior quantidade de gordura corporal do que os animais $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão, este aumento foi significativamente menor do que nos animais C57 tratados com dieta hipercalórica. Se o receptor β_1 é importante para a termogênese induzida pela dieta, esperávamos observar alguma diferença no ganho de massa gorda corporal destes animais o que não ocorreu.

A quantidade de massa gorda nos animais $KO\beta_2$ Hiper foi semelhante ao dos animais FVB Hiper (Figura 9).

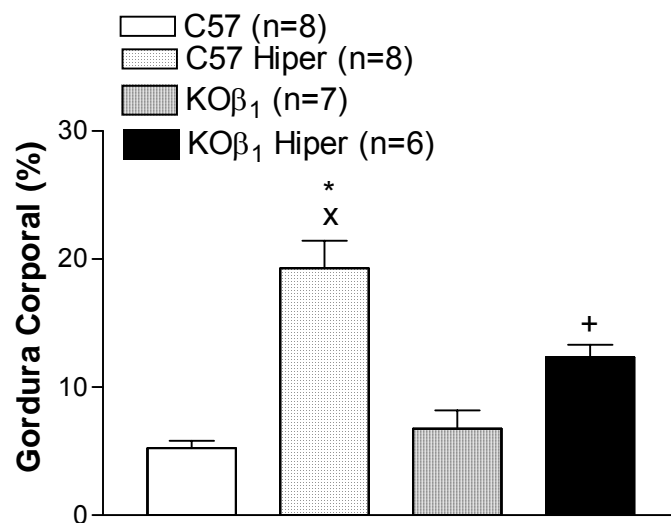


Figura 8. Porcentagem de gordura corporal total dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou hipercalórica ao final do tratamento. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57 com $p < 0,001$; x vs. $KO\beta_1$ Hiper com $p < 0,01$; + vs. $KO\beta_1$ com $p < 0,05$.

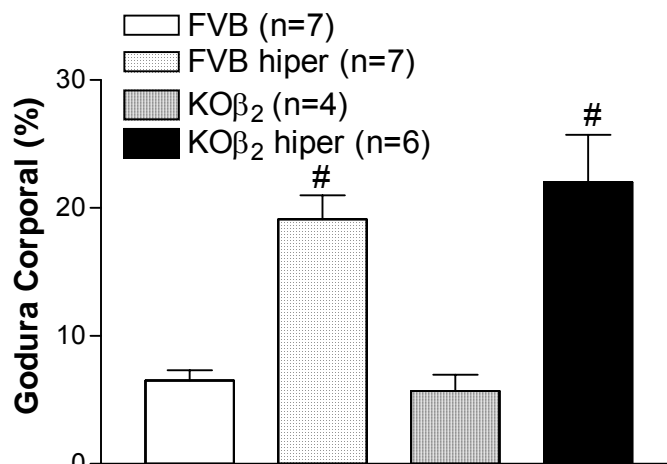


Figura 9. Porcentagem de gordura corporal total dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão ou hipercalórica final do tratamento. Os valores estão expressos como média \pm DP. # vs. FVB e $KO\beta_2$ com $p < 0,001$.

4.2 Papel dos receptores β adrenérgicos no metabolismo

A dieta hipercalórica sabidamente aumenta o consumo de oxigênio. E, de fato, os animais C57 Hiper e FVB Hiper apresentam maior consumo de oxigênio quando comparados com os animais C57 e FVB, como podemos ver nas Figuras 10 e 11. Quando medimos o consumo de oxigênio nos animais $KO\beta_1$ Hiper, surpreendentemente, observamos que a dieta hipercalórica não foi capaz de induzir o aumento no metabolismo como observado nos animais C57 (Figura 10) . Resultados semelhantes aos observados com o $KO\beta_1$ foram encontrados nos animais $KO\beta_2$ (Figura 11).

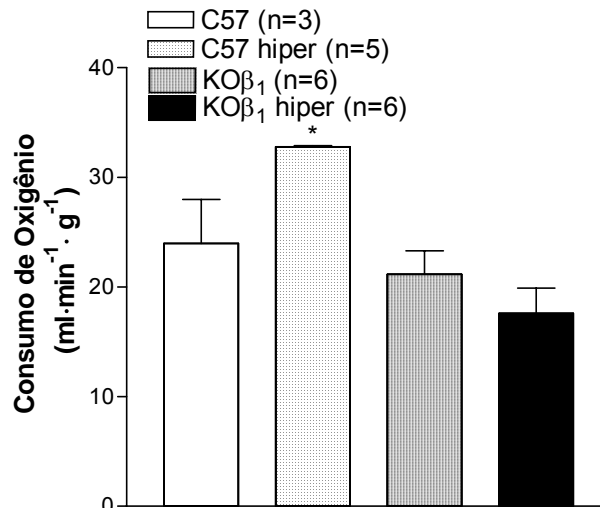


Figura 10. Consumo de Oxigênio (VO₂) dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57, $KO\beta_1$, $KO\beta_1$ Hiper com $p < 0,01$.

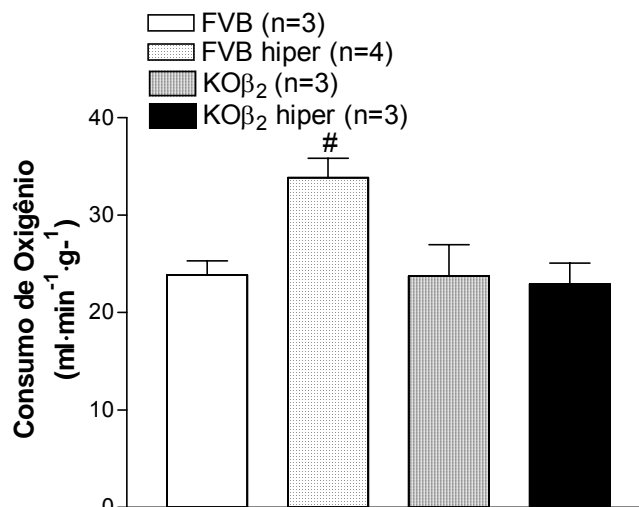


Figura 11. Consumo de Oxigênio (VO₂) dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica durante 22 semanas. Os valores estão expressos como média \pm DP. # vs. FVB, $KO\beta_2$ e $KO\beta_2$ Hiper com $p < 0,001$.

A obesidade induzida por dietas hipercalóricas altera o metabolismo de glicose (COOKE *et al*, 2001). Portanto, a fim de compreender melhor os efeitos da dieta hipercalórica sobre o metabolismo dos animais com nocaute para os receptores β_1 e β_2 , mediram-se a resposta glicêmica frente a uma sobrecarga de glicose (GTT) e frente a uma sobrecarga de insulina (ITT).

Como podemos observar na figura 12 e 13, os animais C57 Hiper e FVB Hiper apresentaram glicemia de jejum significativamente mais alta quando comparados com os animais dos demais grupos. Esses animais, quando comparados aos grupos C57 e FVB, apresentaram maior glicemia aos 90 e 120 minutos após a injeção de glicose sugerindo que a dieta tenha induzido a intolerância à glicose.

Os animais $KO\beta_1$ e $KO\beta_2$ apresentaram aumento na glicemia significativamente menor quando comparados aos demais grupos após a injeção de glicose, mostrando que nesses animais há uma melhor metabolização da glicose.

Já nos animais dos grupos $KO\beta_1$ Hiper e $KO\beta_2$ Hiper não houve o aumento na glicemia de jejum observado nos animais C57 Hiper e FVB Hiper. Além disso, esses grupos apresentaram glicemia significativamente mais baixa aos 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose.

Esses dados mostram que a ausência do receptor β_1 e β_2 preveniu a intolerância à glicose induzida pela dieta hipercalórica.

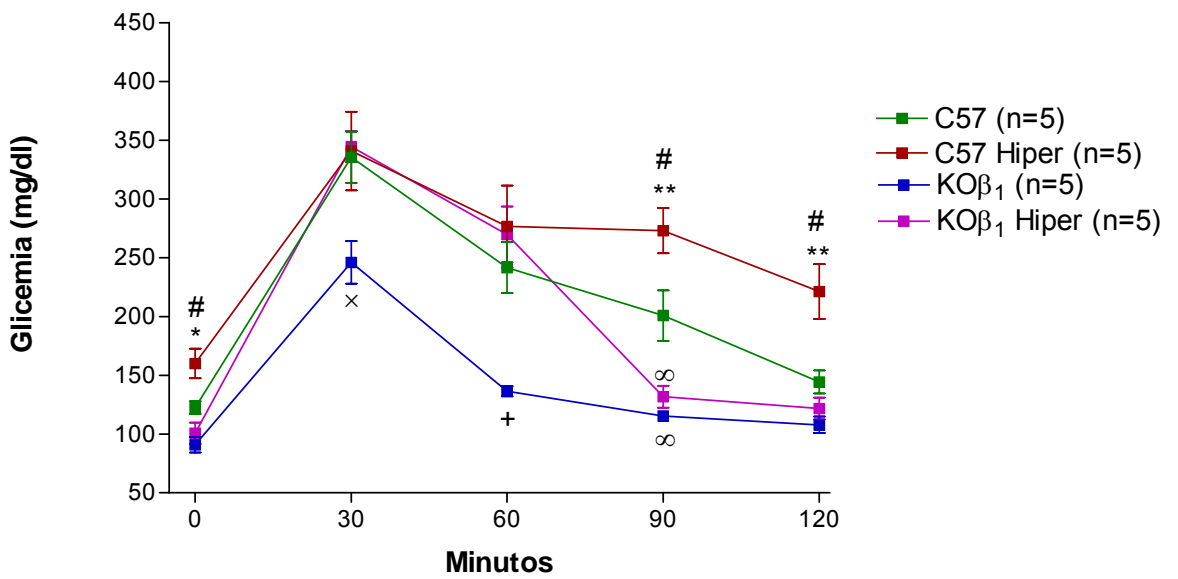


Figura 12. Teste de tolerância à glicose (GTT): dos camundongos C57 e KOβ₁ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medida da glicemia no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos como média ± DP. * vs. KOβ₁ com p<0,001; # vs. C57, KOβ₁ Hiper com p<0,01; x vs. C57, C57 Hiper e KOβ₁ Hiper com p<0,05, + vs. C57, C57 Hiper e KOβ₁ Hiper com p<0,01; ∞ vs. C57 com p<0,01; ** vs. KOβ₁ e KOβ₁ Hiper com p<0,001.

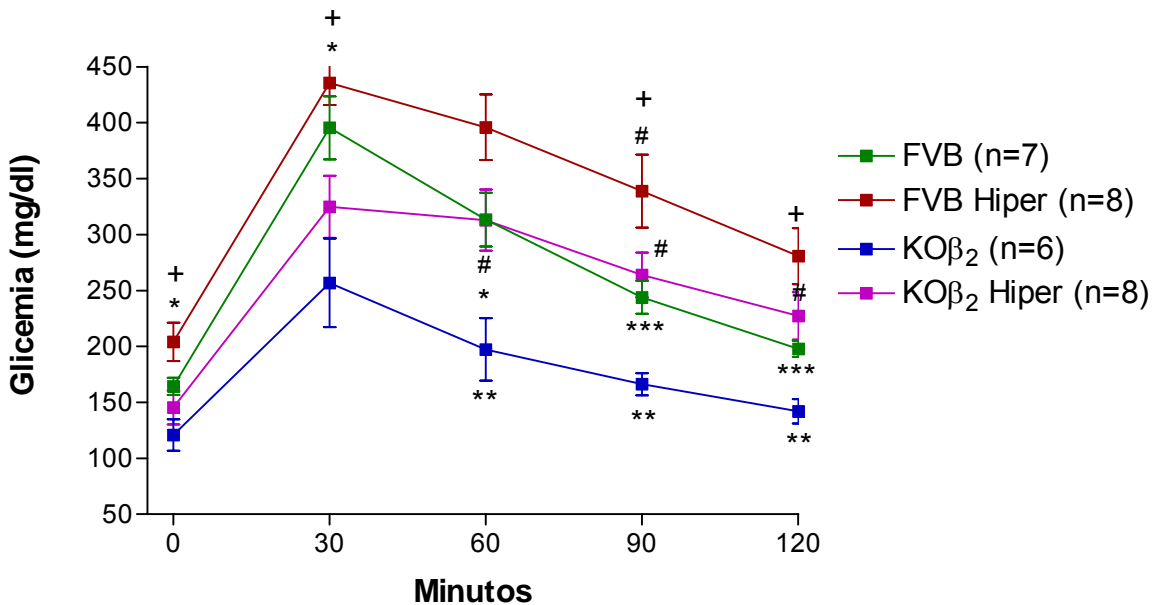


Figura 13. Teste de tolerância à glicose (GTT): dos camundongos FVB e KOβ₂ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medidas de glicemia nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos como média ± DP. * vs. KOβ₂ com p<0,01; + vs. KOβ₂ Hiper com p<0,05; # vs. KOβ₂ com p<0,05; ** vs. FVB Hiper com p<0,001; *** vs. FVB Hiper com p<0,05.

O teste de tolerância à insulina (ITT) nos animais $KO\beta_1$ confirmou os achados do GTT. Como podemos observar na Figura 14, os animais C57 Hiper apresentaram menor tolerância à insulina quando comparados aos outros grupos estudados. A ausência do receptor β_1 preveniu a intolerância à insulina induzida pela dieta hipercalórica.

A prevenção da intolerância à insulina induzida pela dieta hipercalórica observada nos animais $KO\beta_1$, não ocorre com os animais $KO\beta_2$. Os animais do grupo $KO\beta_2$ apresentam uma maior sensibilidade à insulina quando comparados aos animais FVB que, no entanto foi revertida pela dieta hipercalórica (Figura 15).

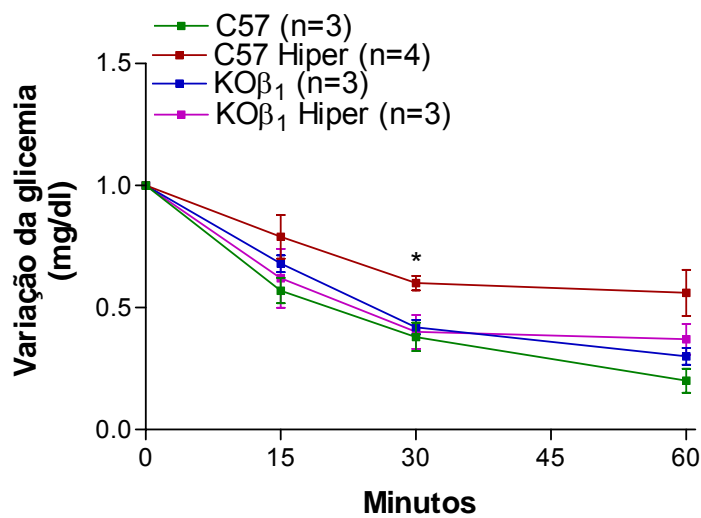


Figura 14. Teste de tolerância à insulina (ITT): dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medidas de glicemia nos tempos 0 (basal), 30 e 60 minutos. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57, $KO\beta_1$ e $KO\beta_1$ Hiper com $p < 0,05$.

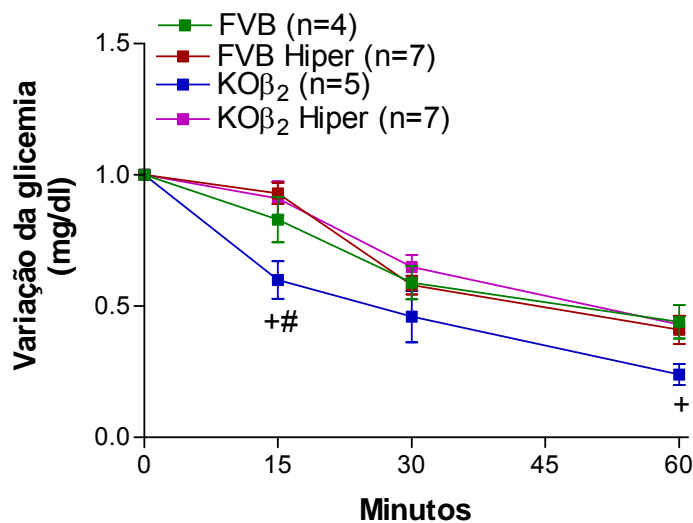


Figura 15. Teste de tolerância à insulina (ITT): dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medidas de glicemia nos tempos 0, 30, 60 minutos. Os valores estão expressos como média \pm DP. + vs. FVB e FVB Hiper com $p < 0,05$; # vs. $KO\beta_2$ com $p < 0,01$.

O metabolismo de colesterol e triglicérides encontram-se alterados nos animais estudados. A figura 16 mostra que a dieta hipercalórica aumentou os níveis plasmáticos de colesterol nos animais C57 Hiper em relação ao C57, como esperado. Interessante notar que os animais $KO\beta_1$, mesmo tratados com dieta padrão, apresentaram colesterol plasmático significativamente mais alto que os animais C57. Além disso, o aumento no colesterol plasmático induzido pela dieta hipercalórica foi maior nos animais $KO\beta_1$ Hiper do que nos animais C57 Hiper. Os níveis de triglicérides plasmáticos nos animais C57 não foram alterados pela dieta hipercalórica. Já os animais $KO\beta_1$ Hiper apresentaram aumento significativo nesse parâmetro, mostrando que a ausência do receptor β_1 aumenta a suscetibilidade dos animais a trigliceridemia induzida pela dieta hipercalórica (Figura 17).

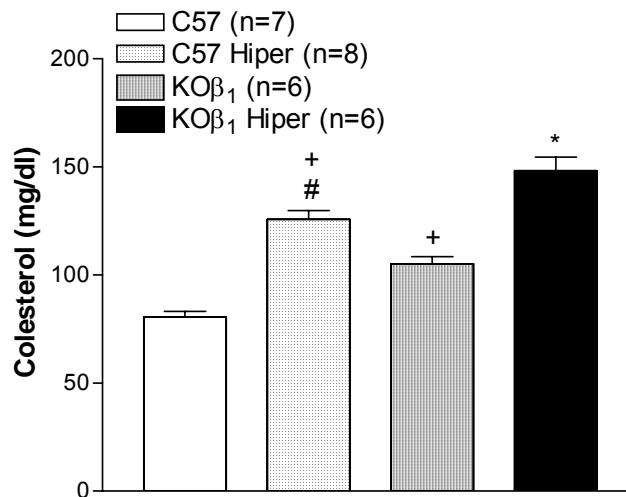


Figura 16. Níveis plasmáticos de colesterol dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. + vs C57 com $p < 0,001$, # vs. $KO\beta_1$ com $p < 0,01$; * vs. C57 e C57 Hiper e $KO\beta_1$ com $p < 0,001$.

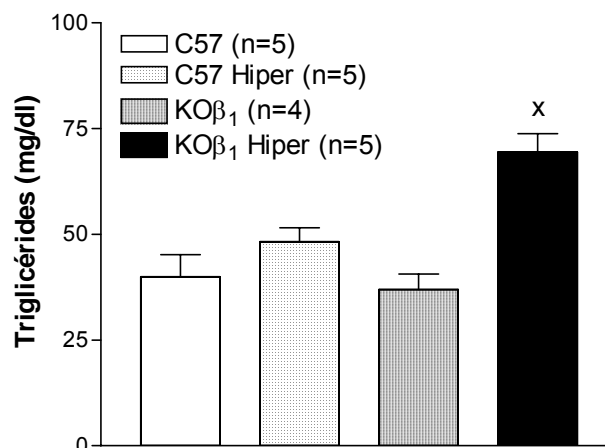


Figura 17. Níveis de triglicérides plasmáticos dos camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. x vs. C57; C57 Hiper e $KO\beta_1$ com $p < 0,001$.

Os animais $KO\beta_2$ apresentam colesterol plasmático semelhante ao dos animais FVB tratados com a dieta padrão. A dieta hipercalórica aumentou significativamente o colesterol plasmático nos camundongos FVB e $KO\beta_2$ de forma semelhante, não havendo diferença entre os grupos, sugerindo que a ausência desse receptor não altera o metabolismo de colesterol (Figura 18). Os níveis de triglicérides plasmáticos dos animais do grupo FVB Hiper foram significativamente maiores quando comparados com os do grupo FVB. Surpreendentemente, os animais $KO\beta_2$ e $KO\beta_2$ Hiper apresentaram níveis de triglicérides plasmáticos significativamente mais baixos do que os animais FVB e FVB Hiper (Figura 19).

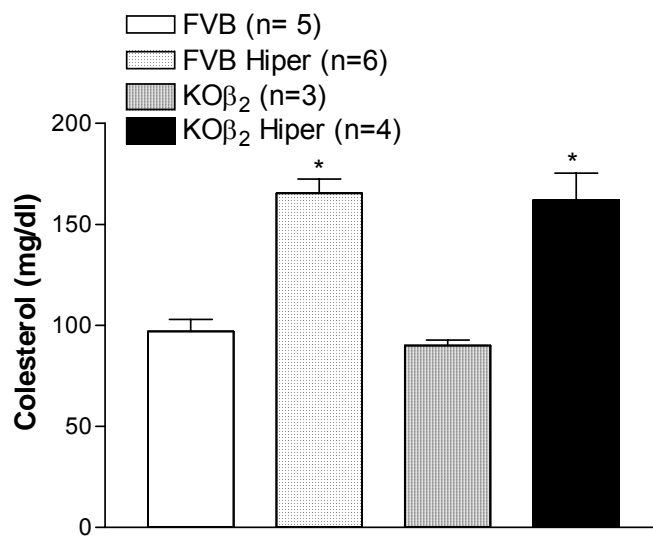


Figura 18. Níveis plasmáticos de colesterol dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. FVB e $KO\beta_2$ com $p < 0,05$.

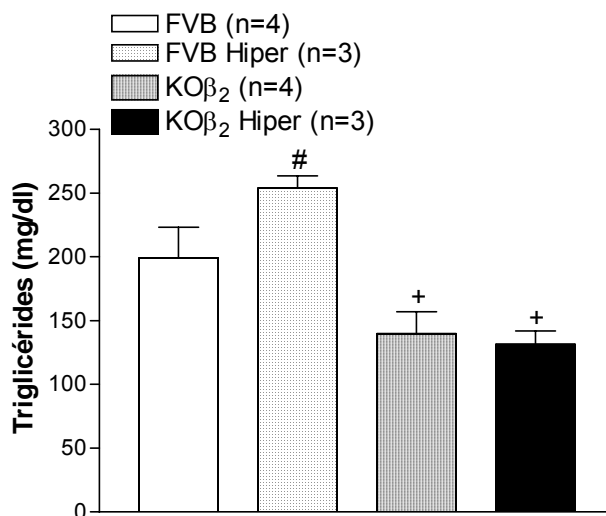


Figura 19. Níveis plasmáticos de triglicérides dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. # vs. FVB, $KO\beta_2$ e $KO\beta_2$ Hiper com $p < 0,01$; + vs. FVB com $p < 0,05$.

4.3 Resposta termogênica ao frio

Os dados até agora obtidos indicam que os receptores adrenérgicos β_1 e β_2 não são relevantes no desenvolvimento da obesidade, uma vez que os animais com nocaute para estes receptores ganham tanto peso quanto os animais selvagens quando alimentados com dieta rica em gordura. Mas, se estes receptores não são importantes na termogênese induzida pela dieta, será que eles apresentariam papel relevante na termogênese induzida pelo frio? A fim de responder a esta pergunta, decidiu-se, inicialmente testar a resistência dos animais alimentados com dieta padrão ao frio. Para tanto, os camundongos foram expostos a 4° C durante três horas e observaram-se sua capacidade de manter constante a sua temperatura corporal.

A Figura 20 mostra que os camundongos C57 apresentaram na primeira hora uma queda na temperatura que foi normalizada após a segunda hora. No entanto, quando os camundongos KO β_1 foram expostos ao frio, observou-se uma queda brusca da sua temperatura corporal depois de 3 horas, sendo necessário retirá-los do frio para evitar sua morte.

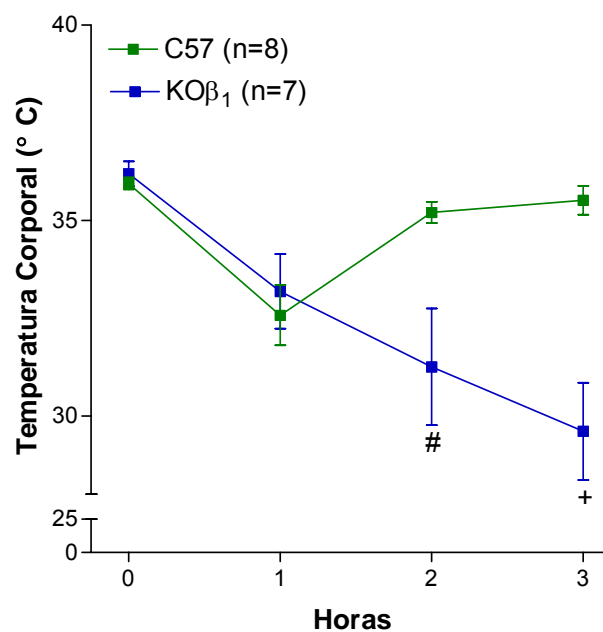


Figura 20. Exposição ao frio dos camundongos C57 e KO β_1 . A temperatura corporal foi medida antes do início do experimento e depois a cada hora. Os valores estão expressos como média \pm DP. [#] vs. C57 com $p < 0,05$; ⁺ vs. C57 com $p < 0,001$.

Na figura 21, está representada a queda total da temperatura corporal dos animais após as três horas de exposição ao frio. Esses dados indicam claramente que estes são animais sensíveis ao frio mostrando que os receptores β_1 são fundamentais na resposta aguda do BAT em manter a temperatura corporal.

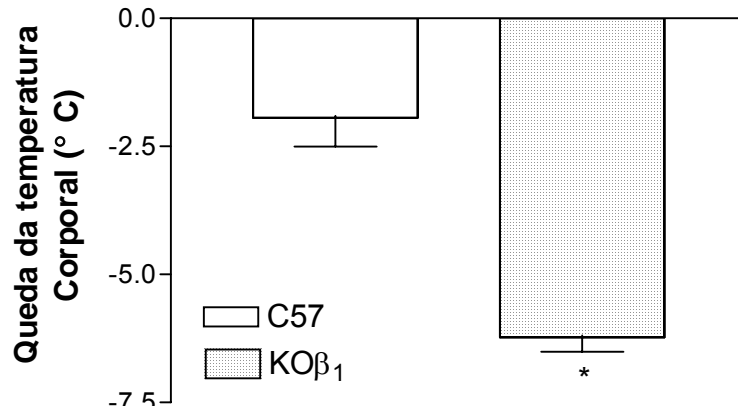


Figura 21. Queda da temperatura corporal após 3 horas de exposição ao frio. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57, com $p < 0,001$.

O mesmo experimento realizado com animais FVB e KO β_2 mostrou que os receptores β_2 apresentam pouca relevância na manutenção da temperatura corpórea durante exposição ao frio. Como podemos ver na Figura 22, os animais KO β_2 apresentam uma tendência no aumento da temperatura corporal à 25° C. Ao longo do experimento a temperatura corporal de ambos os grupos se manteve estável ao longo de todo o período de permanência em 4° C.

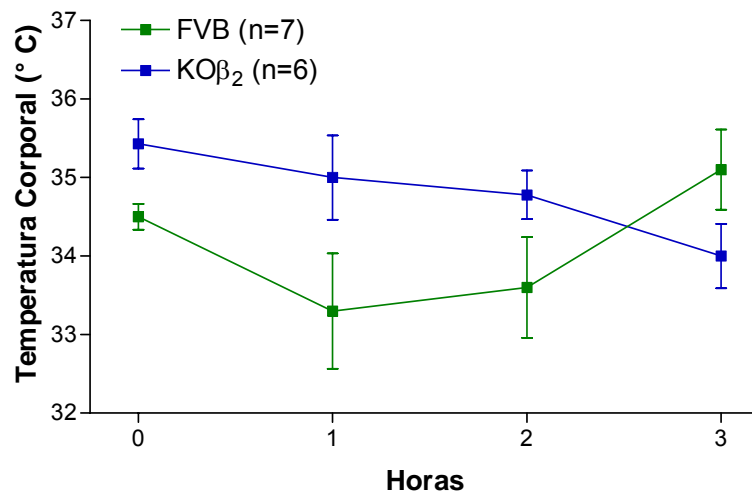


Figura 22. Exposição ao frio dos camundongos FVB e KO β_2 . A temperatura foi medida antes da aclimação e depois a cada hora. Os valores estão expressos como média \pm DP.

Na figura 23 está representada a queda total da temperatura corporal dos animais após as três horas de exposição ao frio. Esses dados indicam que esta isoforma β_2 tem papel pouco importante na termoregulação.

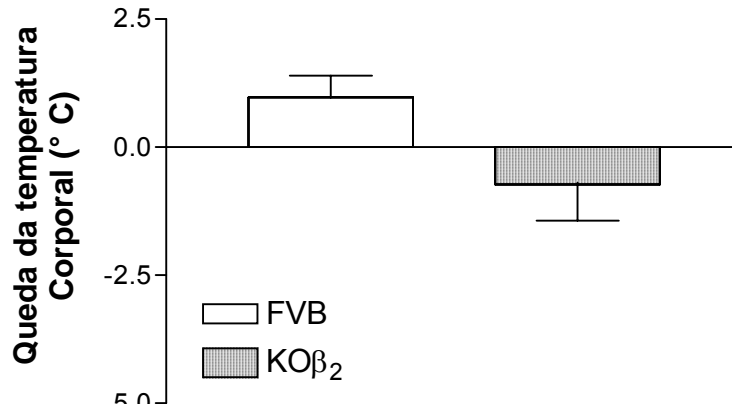


Figura 23. Queda da temperatura corporal dos camundongos FVB e KO β_2 após 3 horas de exposição ao frio. Os valores estão expressos como média \pm DP.

Estes dados indicam que a ativação da termogênese facultativa pelo frio está prejudicada em animais que não apresentam o receptor β_1 . A fim de confirmar estes achados, mediu-se o consumo de oxigênio dos animais em temperaturas crescentes. Quando um animal selvagem é exposto ao frio, seu gasto energético é aumentado a fim de manter a temperatura corporal. Esperava-se que os animais KO β_1 apresentassem algum defeito nesta resposta e, de fato como podemos ver na Figura 24, o consumo de oxigênio aumenta significativamente nos animais C57 em temperaturas mais baixas. No entanto, os animais KO β_1 , embora aumentem seu consumo de oxigênio em resposta ao frio, o fazem significativamente menos do que os animais selvagens.

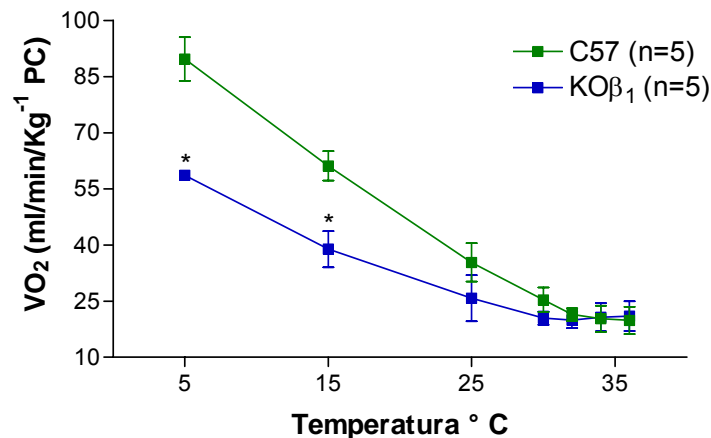


Figura 24. Consumo de oxigênio dos camundongos C57 e KO β_1 durante exposição a diferentes temperaturas (5, 15, 25, 30, 32, 34 e 36°C). Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57 com $p < 0,001$.

Confirmando os dados do aumento da temperatura dos animais $KO\beta_2$ quando expostos ao frio, o aumento no consumo de oxigênio durante a exposição a diferentes temperaturas foi semelhante nos animais FVB e em $KO\beta_2$ (Figura 25).

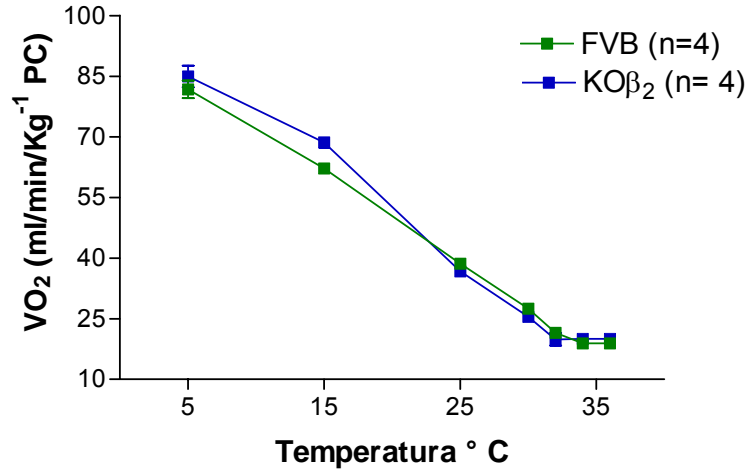


Figura 25. Consumo de oxigênio dos camundongos FVB e $KO\beta_2$ durante exposição a diferentes temperaturas (5, 15, 25, 30, 32, 34 e $36^{\circ}C$). Os valores estão expressos como média \pm DP.

Com base nos resultados de exposição ao frio, é razoável supor que o receptor β_1 apresenta papel importante na resposta aguda do BAT frente ao estímulo do frio. A fim de determinar a capacidade termogênica do BAT, infundiu-se NE i.v. por 30 minutos em animais C57 e $KO\beta_1$ anestesiados e mediu-se a temperatura do BAT. Como se vê na Figura 26, enquanto a temperatura do BAT dos camundongos C57 aumenta em cerca de $1,7^{\circ}C$, em camundongos $KO\beta_1$ o aumento é de apenas $0,5^{\circ}C$. Este achado comprova a importância dos receptores β_1 na termogênese induzida pelo frio.

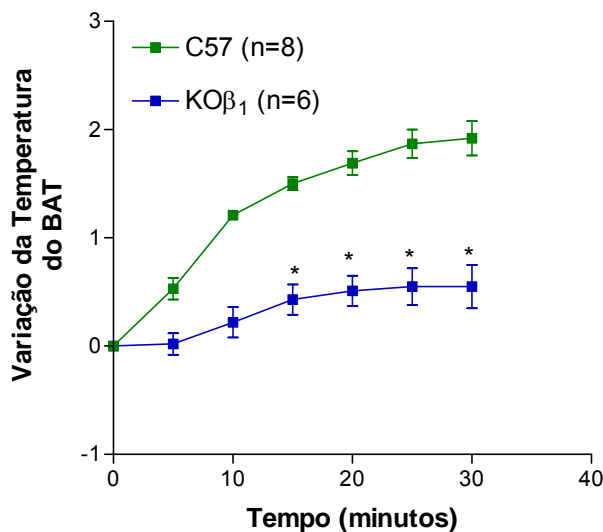


Figura 26. Delta da temperatura do BAT após infusão de NE nos camundongos C57 e $KO\beta_1$. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57 com $p < 0,004$.

A pequena importância do receptor β_2 na termogênese induzida pelo frio foi confirmada pela infusão de NE nos animais $KO\beta_2$. O aumento da temperatura do BAT dos $KO\beta_2$ não foi menor do que nos animais FVB (Figura 27).

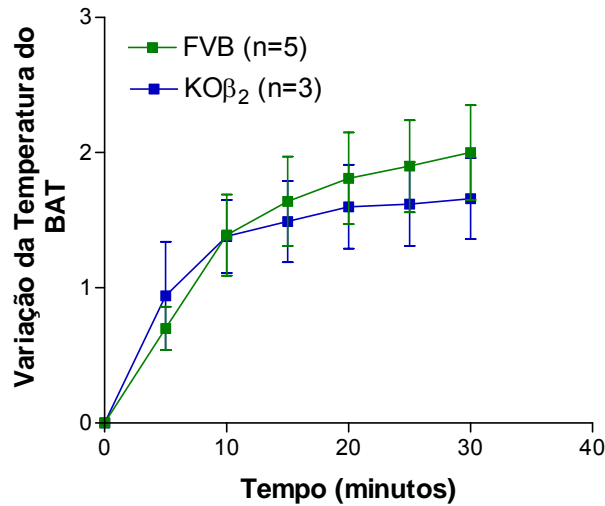


Figura 27. Delta da temperatura do BAT após infusão de NE nos camundongos FVB e $KO\beta_2$. Os valores estão expressos como média \pm DP.

Como na ausência do receptor adrenérgico β_2 houve aumento da temperatura corporal similar ao FVB após exposição ao frio e após infusão de NE, poderia ter ocorrido um aumento compensatório ou uma superexpressão de outra isoforma de receptor β adrenérgico que ocasionaria este aumento. Para saber se foi esse o caso e dada a importância do receptor β_1 em mediar a termogênese induzida pelo frio, infundiu-se dobutamina, um agonista específico para receptor β_1 adrenérgico (TUTTLE e MILLS, 1975). Nos animais C57, a dobutamina foi tão eficiente em aumentar a temperatura do BAT quanto à NE (Figura 28). Já nos animais $KO\beta_1$, a temperatura do BAT diminuiu.

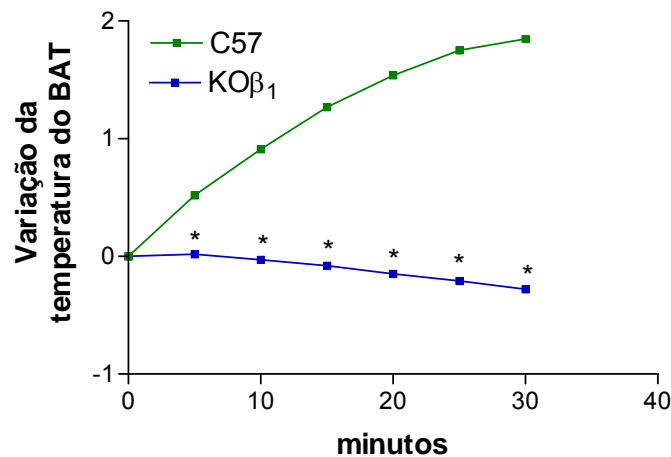


Figura 28. Delta da temperatura do BAT após infusão de Dobutamina nos camundongos C57 e $KO\beta_1$. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. C57 com $p < 0,004$.

Já nos animais $KO\beta_2$ o aumento na temperatura do BAT induzida pela dobutamina, foi semelhante ao observado nos animais FVB, assim como em resposta à infusão de NE (Figura 29). Tais dados indicam que a resposta termogênica do BAT é mediada pelo receptor β_1 . Além disso, sugerem que não ocorreu uma maior atividade de outras isoformas como forma de mecanismo compensatório em resposta ao nocaute do receptor β_1 ou β_2 .

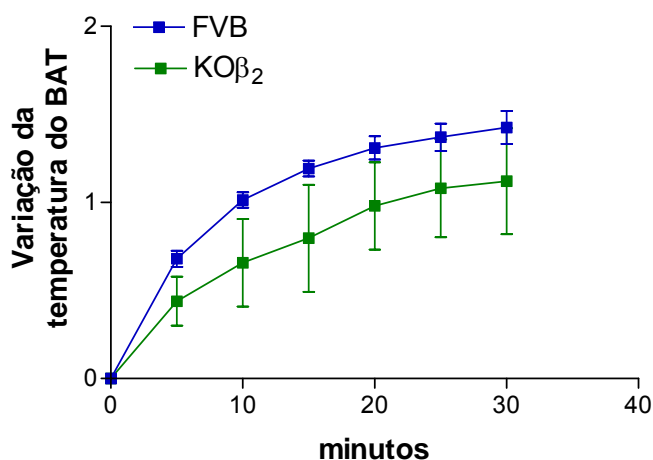


Figura 29. Delta da temperatura do BAT após infusão de Dobutamina nos camundongos FVB e $KO\beta_2$. Os valores estão expressos como média \pm DP.

4.4 Níveis de RNAm das isoformas de receptores adrenérgicos β em animais nocaute.

Para confirmar que o nocaute de uma isoforma de receptor β adrenérgico não induziu o aumento de outras isoformas como um mecanismo compensatório, avaliou-se os níveis de RNAm para o receptor β_3 nos animais $KO\beta_2$ e os níveis de RNAm para os receptores β_2 e β_3 nos animais $KO\beta_1$, por reação de polimerização em cadeia em tempo real.

Os animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 não apresentam aumento nos níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_2 , quando comparado com os camundongos C57. O tratamento com dieta hipercalórica aumenta os níveis da isoforma β_2 tanto nos animais C57 Hiper quanto nos animais $KO\beta_1$ Hiper, porém este aumento não é maior na ausência do receptor adrenérgico β_1 (Figura 30).

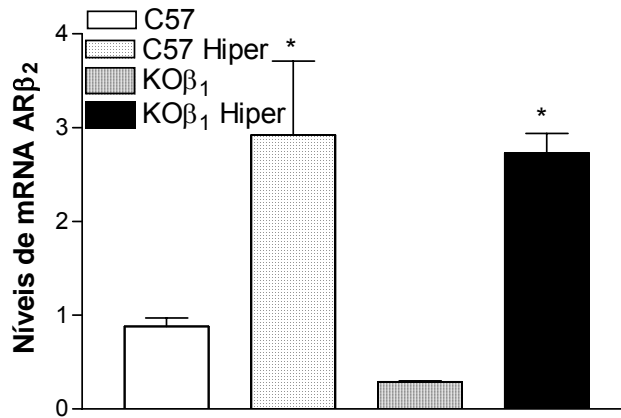


Figura 30. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_2 no BAT de camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. *vs C57 e $KO\beta_1$ com $p < 0,05$.

Diferentemente do que ocorreu com a expressão do receptor adrenérgico β_2 , quando investigamos os níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 em animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 observamos que, embora não seja significativo, houve uma clara tendência de aumento compensatório dessa isoforma em animais $KO\beta_1$ em relação aos animais C57. Após o tratamento com dieta hipercalórica, não houve um aumento dos níveis de β_3 (Figura 31).

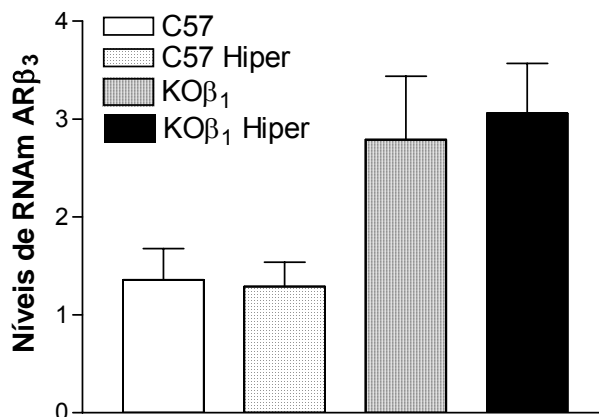


Figura 31. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 no BAT de camundongos C57 e $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP.

Já os animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_2 , não apresentaram aumento nos níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 , quando comparado com o grupo FVB. A dieta hipercalórica aumentou os níveis de RNAm do receptor β_3 nos animais $KO\beta_2$ em relação aos animais tratados com dieta padrão e também com relação ao grupo FVB Hiper, que não apresentou aumento dos níveis de RNAm para essa isoforma (Figura 32).

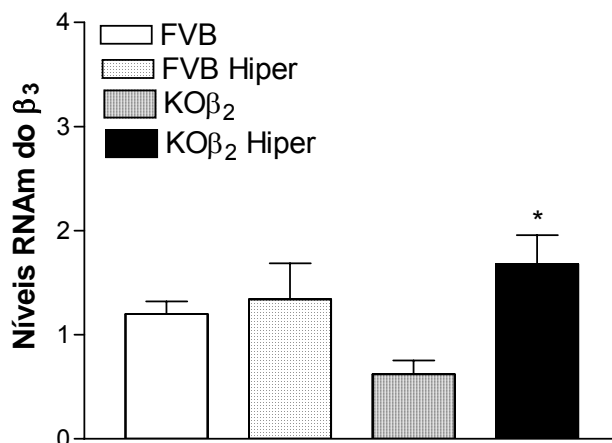


Figura 32. Níveis de RNAm do receptor adrenérgico β_3 no BAT de camundongos FVB e $KO\beta_2$ tratados com dieta padrão com dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm DP. * vs. $KO\beta_2$ com $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os vários subtipos de receptor adrenérgico β desempenham diferentes papéis na mediação das ações do Sistema Nervoso Simpático, tais como desenvolvimento, comportamento, tônus do músculo liso, funcionamento cardíaco e metabolismo energético (JIMENEZ *et al*, 2002).

Sem dúvida que um dos papéis importantes destes receptores é a regulação da termogênese facultativa induzida pela dieta e pelo frio. De fato, animais que apresentam nocaute para os três subtipos: β_1 , β_2 e β_3 (TKO) desenvolvem obesidade além de serem sensíveis ao frio. No entanto, o estabelecimento do papel de cada isoforma no desenvolvimento da obesidade abre caminho para uma possível forma de se ativar seletivamente os receptores adrenérgicos responsáveis pela estimulação do metabolismo energético. Assim, a descoberta de uma droga altamente seletiva para as isoformas alvo, poderia evitar ou corrigir a obesidade sem causar os efeitos indesejáveis dos outros receptores adrenérgicos como, por exemplo, aumento da pressão arterial e a estimulação cardíaca (HIMMS-HAGEN e DANFORTH, 1996).

Nesse sentido, modelos de nocaute para apenas uma das isoformas constitui ferramentas importantes na compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção dos estoques energéticos.

Neste estudo avaliou-se o papel das isoformas β_1 e β_2 de receptores adrenérgicos, em estimular a termogênese facultativa induzida pela dieta ou pelo frio.

Embora camundongos que não apresentam as três isoformas de receptor adrenérgico β sejam obesos, nossos dados mostraram que a ausência do receptor β_1 ou do receptor β_2 não piora a obesidade causada pelo aumento do consumo de calorias presentes na dieta hipercalórica administrada a camundongos $KO\beta_1$ ou $KO\beta_2$. Sugerindo, portanto, que as duas isoformas não são importantes na termogênese facultativa e, portanto, na regulação do peso corporal.

Como o BAT é o principal sítio de termogênese facultativa, nossos dados indicam que a termogênese induzida pela dieta não depende da ativação do BAT pelos receptores β_1 e β_2 .

Estudos anteriores indicam que é possível que a a termogênese induzida pela dieta seja independente do BAT. Animais com nocaute para o gene da UCP-1 ($UCP1-KO^{-/-}$) representam um modelo que explora mecanismos da termogênese que são independentes

do BAT, uma vez que nestes animais, a termogênese independente da UCP1 contribui com 20 a 40% da resposta total da termogênese induzida por vários agonistas seletivos dos receptores β . Portanto, é possível que a ativação da termogênese em animais UCP1-KO possa envolver oxidação lipídica por tecidos que não o adiposo marrom, como o fígado e músculo (GRANNEMAN *et al*, 2003). Além disso, esses animais apesar de sensíveis a exposição ao frio, apresentam gasto energético normal em temperatura ambiente, não são obesos e são resistentes a obesidade induzida pela dieta hipercalórica. A ausência de obesidade nestes animais sugere a existência de mecanismos alternativos de manutenção da massa corporal e que não estariam envolvidos na proteção da exposição ao frio (ENERBACK *et al*, 1997).

Por outro lado, camundongos nos quais o tecido adiposo marrom inteiro foi inativado pela toxina da difteria A (UCP-DTA) apresentaram obesidade maciça com dieta padrão (HAMANN, FLIER, LOWELL, 1996). Sendo possível, portanto, que o funcionamento prejudicial do BAT seja responsável por um defeito na termogênese induzida pela dieta em roedores (COLLINS *et al*, 1996), mas outros mecanismos parecem estar envolvidos. Assim, ainda não é claro o papel do BAT na termogênese induzida pela dieta.

Por outro lado, animais com nocaute para o receptor β_3 não desenvolvem obesidade significativa quando tratados com dieta hipercalórica (ROHRER, 1998). Assim, os estudos realizados em animais com nocaute para apenas uma das isoformas sugerem que os receptores β adrenérgicos não são importantes na mediação da termogênese induzida pela dieta. No entanto, quando as três isoformas são nocauteadas observa-se o desenvolvimento da obesidade. Assim, é possível que mecanismos compensatórios sejam ativados quando apenas uma das isoformas dos receptores β adrenérgicos estejam ausentes. Um deles é a adaptação compensatória que pode ocorrer em resposta à deficiência de uma isoforma do receptor, ou seja, a falta do receptor β_1 nos animais KO β_1 poderia levar a maior atividade das outras isoformas remanescentes, β_2 e β_3 , o que poderia compensar a ausência do receptor β_1 . O mesmo poderia ocorrer nos modelos KO β_2 (SUSULIC *et al*, 1995). A análise do RNAm para as isoformas β_2 e β_3 no BAT dos animais KO β_1 mostrou que não há aumento nos níveis de RNAm para o β_2 . Já o RNAm para os receptores β_3 não foi significativamente aumentado, embora haja uma clara tendência de aumento o que poderia explicar a ausência do desenvolvimento da obesidade.

No entanto, devemos lembrar que embora não haja alterações nos níveis de RNAm para os receptores adrenérgico, não significa que não tenha havido mudanças na sua atividade. Portanto, a existência de mecanismos compensatórios não pode ser descartada.

Outros mecanismos de regulação dos substratos energéticos podem compensar a menor atividade do BAT e da sinalização adrenérgica prejudicada pelo nocaute de seus receptores. Por exemplo, a leptina que também apresenta papel importante na lipólise e esse efeito exige funcionais receptores adrenérgicos β (ASSENSIO *et al*, 2008) e, dessa maneira, a termogênese poderia ser um importante mecanismo pelo qual a leptina regula a composição corporal. A produção de leptina está elevada em animais que se tornam obesos após o tratamento com dieta hipercalórica (HALAAS *et al*, 1997; HEYMSFIELD *et al*, 1999; LEVIN *et al*, 2002; LI *et al*, 1997; WIDDOWSON *et al*, 1997), mas apesar de aumentada, a resistência a leptina, causada pela redução no seu transporte através da barreira hematoencefálica (BANKS e FARRELL, 2003), poderia reduzir o gasto energético.

É intrigante que, apesar de não interferir no ganho de peso ou no ganho de massa gorda induzidos pela dieta hipercalórica, a ausência dos receptores β_1 e β_2 impediu o aumento no consumo de oxigênio induzido pela ingestão hipercalórica, normalmente observado em animais selvagens. Estes dados mostram que estes receptores são importantes para aumentar o consumo de oxigênio induzido pelo aumento na ingestão calórica. O aumento no consumo de oxigênio é conseqüente ao aumento no metabolismo energético. Como a dieta não foi capaz de induzir aumento no consumo de O_2 nos animais $KO\beta_1$ e $KO\beta_2$, é provável que os receptores β_1 e β_2 apresentem papel relevante nesta resposta fisiológica.

Assim, mesmo que haja uma compensação na expressão ou na atividade das outras isoformas de receptores β nos animais $KO\beta_1$ ou $KO\beta_2$, não foi suficiente para aumentar o metabolismo induzido pela dieta em ambos os modelos estudados. Sendo assim, duas possibilidades devem ser consideradas. A primeira é que não se observa mecanismos de compensação por outras isoformas e confirma-se a hipótese que as os receptores β_1 e β_2 não são relevantes para o desenvolvimento da obesidade. A segunda hipótese contempla a possibilidade de que ocorra compensação na atividade das outras isoformas impedindo o estabelecimento da obesidade. Desta forma, a regulação da quantidade de substrato energético prescinde do aumento no consumo de oxigênio, não ativando os mecanismos que são atualmente reconhecidos como envolvidos na termogênese induzida pela dieta.

Assim, este estudo sugere que o BAT tem importância relativa no desenvolvimento da obesidade e outros mecanismos sejam tão importantes quanto o aumento na atividade do BAT na regulação do peso corporal.

No entanto, a isoforma β_1 é fundamental para a termogênese induzida pelo frio, mas não a isoforma β_2 , uma vez que animais $KO\beta_1$ não mantêm sua temperatura corporal quando expostos ao frio, mas animais $KO\beta_2$, sim. Em conjunto, estes dados indicam que a termogênese induzida pela dieta é regulada por mecanismos diferentes da termogênese induzida pelo frio.

De fato, nos animais $KO\beta_1$, embora não haja piora no desenvolvimento da obesidade, o BAT destes animais encontra-se termogenicamente inativado, como demonstrado pela incapacidade de aumentar sua temperatura durante a infusão de NE. Este defeito é tão significativo que os animais $KO\beta_1$ entram em hipotermia quando expostos ao frio, o que os levaria à morte se não fossem retirados e aquecidos. Além disso, a resposta termogênica do BAT em resposta à infusão de dobutamina observada em animais selvagens e em $KO\beta_2$ foi totalmente abolida em animais $KO\beta_1$. Portanto, se há uma compensação pelo aumento na atividade dos outros receptores β no desenvolvimento da obesidade, isto não se observa na resposta ao frio, mostrando que a termogênese induzida pelo frio e induzida pela dieta são regulados por mecanismos distintos.

Os camundongos $KO\beta_1$ aumentam seu metabolismo energético em resposta ao frio, o qual pode ser creditado ao tremor muscular, chamada tremorigênese, que é a primeira linha de defesa dos animais contra o frio. No entanto, este aumento no metabolismo induzido pelo tremor muscular não é suficiente para manter a temperatura corporal. Essa observação é confirmada pelo VO_2 mais baixo dos animais quando expostos ao frio. Animais aclimatados ao frio apresentam um aumento no consumo de oxigênio mitocondrial (FLATMARK e PEDERSEN, 1975) via receptor β adrenérgico (PETTERSSON e VALLIN, 1976; FAIN *et al*, 1973; HEIM e HULL, 1966; FLAIM *et al*, 1977; FLINK e WILLIAMS, 1976). Nossos dados mostram que esta resposta fisiológica é principalmente mediada via o receptor adrenérgico β_1 . Diante destas observações é razoável supor que o BAT seja o principal regulador da temperatura corporal e esta resposta é mediada pelo receptor adrenérgico β_1 .

Embora o receptor β_1 seja fundamental na resposta termogênica ao frio, o receptor β_2 não parece contribuir nesta regulação. Os animais $KO\beta_2$ não apresentam diminuição da temperatura corporal em temperatura ambiente e mantêm sua temperatura corporal durante

a exposição ao frio. Portanto, estes receptores não desempenham importantes ações para ativar a termogênese induzida pelo frio. Essas observações são pertinentes, já que houve um aumento tanto da capacidade termogênica do BAT após infusão de NE quanto do VO_2 destes animais durante exposição ao frio.

Uma possível explicação para o fato da ausência da isoforma β_2 não piorar a obesidade e também não impedir o aquecimento do animal quando exposto ao frio é a de que esse receptor não desempenhe um papel significativo na atividade termogênica do adipócito marrom em si, mas provavelmente tenha papel importante na vasodilatação observada durante a ativação do BAT. Um aspecto importante nos mecanismos envolvidos na liberação de calor pelo BAT. O SNS induz vasodilatação a fim de levar prontamente o calor produzido pelo BAT para o cérebro, coração e pulmões, órgãos privilegiados quando se trata de estresse térmico. Não somente o BAT, mas também os vasos sanguíneos que irrigam este tecido são intensamente inervados pelo sistema nervoso simpático. De fato, estudo realizado em cultura de adipócito marrom demonstrou a ausência de RNAm para o receptor adrenérgico β_2 nestas células, sugerindo sua presença predominantemente nos vasos do tecido adiposo marrom (BENGSTSSON, CANNON, NEDERGAARD, 2000).

Como a obesidade está relacionada com aumento dos níveis de colesterol e triglicérides, bem como com a resistência à insulina e o desenvolvimento de diabetes, resolvemos investigar a relação dos receptores β adrenérgicos nestes parâmetros.

Os receptores β_1 e β_2 apresentam papel importante na manutenção dos níveis de colesterol plasmático total, uma vez que a ausência destas isoformas eleva significativamente este parâmetro nos animais $KO\beta_1$ e $KO\beta_2$ mesmo quando tratados com dieta padrão. Na verdade, a dieta rica em gordura não piora a colesterolemia observada nos animais $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão. A isoforma β_1 parece ter papel relevante também no metabolismo de triglicérides, uma vez que animais $KO\beta_1$ tratados com dieta rica em gordura, apresentam trigliceridemia significativamente mais alta, mas não quando tratados com dieta padrão. Surpreendentemente, a ausência da isoforma β_2 não só reduz os níveis de triglicérides plasmáticos nos animais tratados com dieta padrão, mas previne o aumento induzido pela dieta rica em gordura observada nos animais selvagens. Diversos estudos clínicos mostraram que a administração de beta bloqueadores a paciente eleva os níveis de colesterol total e suas frações (BELL, BAKRIS, MCGILL, 2008). No entanto, os mecanismos pelos quais o SNS influencia o metabolismo de colesterol não estão claros e permanecem a ser elucidados.

Embora as isoformas estudadas não aparentem ter papel no desenvolvimento da obesidade, elas parecem estar envolvidas em outros aspectos da síndrome metabólica, embora com ações aparentemente contraditórias. Os receptores adrenérgicos β_1 e β_2 apresentam papel importante na via de sinalização da insulina, uma vez que a ausência do receptor β_1 e β_2 melhorou a resposta glicêmica nos animais $KO\beta_1$ e $KO\beta_2$ frente à sobrecarga de glicose. Na verdade, a ausência destas isoformas de receptor adrenérgico preveniu a menor tolerância à glicose induzida pela dieta hipercalórica como observada nos animais selvagens (C57 Hiper e FVB Hiper).

Os dados da literatura sobre o papel dos receptores adrenérgicos no metabolismo de glicose são bastante inconclusivos. O tratamento de pacientes diabéticos com beta bloqueadores apresenta resultados contraditórios. O tratamento com metoprolol que bloqueia receptores β_1 pode piorar ou não alterar a resistência à insulina. Já o uso de carvedilol, que bloqueia tanto receptores β_2 quanto α_1 parece melhorar a resistência à insulina. Por outro lado, estudo em cultura de adipócitos marrons mostram que a noradrenalina aumenta a captação de glicose nas células induzida pela insulina. Este aumento pode ser mediado pelo receptor adrenérgico β_3 e β_1 , sem aparente contribuição dos outros receptores adrenérgicos β_2 , α_1 e α_2 (CHERNOGUBOVA, CANNON, BENGTTSSON, 2004), mostrando que existe uma interação entre os sistemas de sinalização da insulina e adrenérgico pelo menos no tecido adiposo marrom (BRONNIKOV *et al*, 1999; BENGTTSSON *et al*, 2000; KIKUCHI-UTSUMI *et al*, 1997; LINDQUIST *et al*, 2000; NIKAMI *et al*, 1996). Por outro lado, a estimulação β adrenérgica pode inibir a ativação do receptor de insulina (ISSAD *et al*, 1995; OBERMAIER *et al*, 1987; HÄRING *et al*, 1986; KLEIN *et al*, 1991), mas esta ação seria mediada pela isoforma β_3 (KLEIN *et al*, 1999).

Os resultados da literatura são altamente controversos e, portanto, o modelo de animais nocaute para os receptores adrenérgicos é interessante para se determinar o papel destes receptores e suas isoformas na regulação da glicemia. No entanto, essas perguntas permanecem a ser respondidas.

6 CONCLUSÕES

- O receptor adrenérgico β_2 não está envolvido na termogênese induzida pela dieta hipercalórica nem pelo frio;
- A ausência da isoforma β_1 em camundongos não piora o desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta hipercalórica;
- O receptor adrenérgico β_1 é fundamental para a ativação da termogênese facultativa induzida pelo frio;
- A termogênese induzida pela dieta é regulada por mecanismos distintos da termogênese induzida pelo frio;
- Os receptores adrenérgicos β_1 e β_2 são importante no metabolismo de colesterol e triglicérides;
- Os receptores adrenérgicos β_1 e β_2 são importante na regulação da glicemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCH, J-RS.; AINSWORTH, A. T.; CAWTHORNE, M. A.; PIERCY, V.; SENNITT, M. V.; THODY, V. E.; WILSON, C.; WILSON, S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. **Nature**, v. 309, n. 5964, p. 163-165, 1984.
- ATGIÉ, C.; D'ALLAIRE, F.; BUKOWIECKI, L. J. Role of β_3 -adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 273, n. 4Pt 1, p. C1136-C1142, 1997.
- ASENSIO, C.; JIMENEZ, M.; KUHNE, F.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; MUZZIN, P. The lack of β -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3490-3495, 2005.
- ASSENSIO, C. S.; ARSENIJEVIC, D.; LEHR, L.; GIACOBINO, J-P.; MUZZIN, P.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Effects of leptin on energy metabolism in Beta-less mice. **Int. J. Obesity.**, v. 32, n. 6, p. 936-942, 2008.
- BACHMAN, E. S.; DHILLON, H.; ZHANG, C. Y.; CINTI, S.; BIANCO, A. C.; KOBILKA, B. K.; LOWELL, B.B. β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 843-845, 2002.
- BANKS, W. A.; FARRELL, C. L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 1, p. E10-E15, 2003.
- BELL, D. S.; BAKRIS, G. L.; MCGRILL, J. B. Comparison of carvedilol and metoprolol on serum lipid concentration in diabetic hypertensive patients. **Diabetes Obes.**, 2008.
- BENGTSSON, T.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Differential adrenergic regulation of the gene expression of the β -adrenergic subtypes β_1 , β_2 and β_3 in Brown adipocytes. **Biochem. J.**, v. 347, n. 3, p. 643-651, 2000.
- BENOVIC, J. L.; BOUVIER, M.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 4, p. 405-428, 1988.
- BENOVIC, J. L.; DE BLASI, A.; STONE, W. C.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 235-240, 1989.
- BIANCO, A. C.; MAIA, A. L.; SILVA, W. S.; CHRISTOFFOLETE, M. A. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. **Bioscience Reports.**, v. 25, n. 3-4, p. 191-207, 2005.
- BLAAK, E. E.; VAN BLAAK, M. A.; KEMPEN, K. P. G.; SARIS, W. H. M. Role of alpha- and beta- adrenoceptors in sympathetically mediated thermogenesis. **Am. J. Physiol.**, v. 264, n. 1 Pt 1, p. E11-E17, 1993a.

BLAAK, E. E.; SARIS, W. M. H.; VAN BLAAK, M. A. Adrenoceptor subtypes mediating catecholamine induced thermogenesis in man. **Int. J. Obes.**, v. 17, n. 3, p. S78-S81, 1993b.

BOUVIER, M.; COLLINS, S.; O'DOWD, B. F.; CAMPBELL, P. T.; DE BLASI, A.; KOBILKA, B. K.; MACGREGOR, C.; IRONS, G. P.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 28, p. 16786-16792, 1989.

BOSS, O., MUZZIN, P., GIACOBINO, J. P. The uncoupling proteins, a review. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 139, n. 1, p. 1-9, 1998.

BRONNIKOV, G.; BENGTSSON, T.; KRAMAROVA, L.; GOLOZOUBOVA, V.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. β_1 to β_3 switch in control of cAMP during brown adipocyte development explains distinct β -adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4185-4197, 1999.

CANNON, B.; HEDIN, A.; NEDERGAARD, J. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. **FEBS Lett**, v. 50, n. 1, p. 129-132, 1982.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. **Essays. Biochem.**, v. 20, p. 110-164, 1985.

CARPÉNE, C.; GALITZKY, J.; COLLON, P.; ESCLAPEZ, F.; DAUZATS, M.; LAFONTAN, M. Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. **J. Pharmacol. Exp. Therm.**, v. 265, n. 1, p. 237-247, 1993.

CHAMPIGNY, O.; RICQUIER, D.; BLONDEL, O.; MAYERS, R. M.; BRISCOE, M. G.; HOLLOWAY, B. R. Beta 3-adrenergic receptor stimulation restores message and expression of brown-fat mitochondrial uncoupling protein in adult dogs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 23, p. 10779-10777, 1991.

CHAUDHRY, A.; LAHNERS, K. N.; GRANNEMAN, J. G. Perinatal changes in the coupling of beta 1-and beta 3 adrenergic receptors to Brown fat adenylyl cyclase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 261, n. 2, p. 633-637, 1992.

CHERNOGUBOVA, E.; CANNON, B.; BENGTSSON, T. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via β_3 -adrenoceptors through a cAMP, PKA and PI3-Kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 269-280, 2004.

CHINET, A. E., DECROUY, A., EVEN, P. C. Ca^{2+} dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle. **J. Physiol.**, v. 455, p. 663-678, 1992.

CINTI, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr. Metab. Cardiovas. Dis.**, v. 16, n. 6, p. 569-574, 2006.

COLLINS, S.; DANIEL, K. W.; ROHLFS, E. M.; RAMKUMAR, V.; TAYLOR, I. L. GETTYS T. W. Impaired expression and functional activity of the β 3- and β 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 518–527, 1994.

COLLINS, S.; KUHN, C. M.; PETRO, A. E.; SWICK, A. G.; CHRUNYK, B. A.; SURWIT, R. S. Role of leptin in fat regulation. **Nature**, v. 380, p. 677, 1996.

COLLINS, S.; DANIEL, K. W.; PETRO, A. E.; SURWIT, R. S. Strain-specific response to beta 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. **Endocrinology**, v. 138, p. 405-413, 1997.

COLLINS, S.; DANIEL, K. W.; ROHLFS, E. M. Depressed expression of adipocyte beta-adrenergic receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 23, p. 669-77, 1999.

COLLINS, S.; MARTIN, T. L.; SURWIT, R. S. ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiol. Behav.**, v. 81, n. 2, p. 243-248, 2004.

COLLINS, S.; SURWIT, R. S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 309-28, 2005.

CURCIO, C.; LOPES, A. M.; RIBEIRO, M. O.; FRANCOSE JR, O. A.; CARVALHO, S. D.; LIMA, F. B.; BICUDO, J. E.; BIANCO, A. C. Development of compensatory thermogenesis in response to overfeeding in hypothyroid rats. **Endocrinology**, v.140, n. 8, p. 3438-3443, 1999.

D'ALLAIRE, F.; ATGIÉ, C.; MAURIÈGE, P.; SIMARD, P. M.; BUKOWIECKI, L. J. Characterization of beta 1- and beta 3 –adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 114, n.2, p. 275-282, 1995.

DE MEIS, L. Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds—Energy transduction in biological membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 973, n. 2, p. 333–349, 1989.

DORNONVILLE DE LA COUR, C.; LINDQVIST, A.; EGECIOGLU, E.; TUNG, Y. C.; SURVE, V.; OHLSSON, C.; JANSSON, J. O.; ERLANDSON-ALBERTSSON, C.; DICKSON, S. L.; HAKANSON, R. Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomised mice. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 907-913, 2005.

DOSS, R. C.; PERKINS, J. P.; HARDEN, T. K. Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 23, p. 12281-12286, 1981.

ECHTAY, K. S.; WINKLER, E.; FRISCHMUTH, K.; KLINGENBERG, M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H^+ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 4, p. 1416-1421, 2001.

ENERBACK, S.; JACOBSSON, A.; SIMPSON, E. M.; GUERRA, C.; YAMASHITA, H.; KOZAK, L. P. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 90-94, 1997.

FAIN, J. N.; JACOBS, M. D.; CLEMENT-CORMIER, Y. C. Interrelationship of cyclic AMP, lipolysis, and respiration in brown fat cells. **Am. J. Physiol.**, v. 224, n. 2, p. 346-351, 1973.

FINK, S. A.; WILLIAMS, J. A. Adrenergic receptors mediating depolarization in brown adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 231, n. 3, p. 700-706, 1976.

FISHER, M. H.; AMEND, A. M.; BACH, T. J.; BARKER, J. M.; CANDELORE, M. R.; CARROL, D.; CASCIERI, M. A.; CHIU, S. H.; DENG, L.; FORREST, M. J.; HEGARTY-FRISCINO, B.; GUAN, X. M.; HOM, G. J.; HUTCHINS, J. E.; KELLY, L. J.; MATHVINK, R. J.; METZGER, J. M.; MILLER, R. R.; OK, H. O.; SAPERSTEIN, R.; STRADER, C. D.; STEARNS, R. A.; MACINTYRE, D. E.; *et al.* A selective human beta3 adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in rhesus monkeys. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 11, p. 2387-2393, 1998.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FLAIM, K. E.; HORWITZ, B. A.; HOROWITZ, J. M. Coupling of signals to brown fat: alpha-and beta-adrenergic responses in intact rats. **Am. J. Physiol.**, v. 232, n. 3, p. R101-R109, 1977.

FLATMARK, T.; PEDERSEN, J. I. Brown adipose tissue mitochondria. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 416, n. 1, p. 53-103, 1975.

FITZGERALD, P. A. Adrenal medulla & paraganglia. In: GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. San Francisco: The McGraw-Hill Companies, 2007. p. 429-432.

GHORBANI, M.; CLAUS, T. H.; HIMMS-HAGEN, J. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with β 3-adrenoceptor agonist. **Biochem. Pharmacol.**, v. 54, n. 1, p. 121-131, 1997.

GRANNEMAN, J. G. Norepinephrine and BRL 37344 stimulate adenylate cyclase by different receptors in rat brown adipose tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 254, n. 2, p. 508-513, 1990.

GRANNEMAN, J. G.; WITTY, C. J. CGP 12177A modulates brown fat adenylate cyclase activity by interacting with two distinct receptor sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 256, n. 2, p. 421-42, 1991.

GRANNEMAN, J. G. Effects of agonist exposure on the coupling of beta1 and beta3-adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Therm.**, v. 261, n. 2, p. 638-642, 1992.

GRANNEMAN, J. G.; BURNAZI, M.; ZHU, Z.; SCHWAMB, L. A. White adipose tissue contributes to UCP1- independent thermogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 6, p. E1230-E1236, 2003.

GOLOZOUBOVA, V.; HOHTOLA, E.; MATTHIAS, A.; JACOBSSON, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Only UCP-1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. **FASEB J.**, v. 15, n. 11, p. 2048-2050, 2001.

HADCOCK, J. R.; MALBON, C. C. Regulation of beta-adrenergic receptors by "permissive" hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 22, p. 5021-5025, 1988.

HALAAS, J. L.; BOOZER, C.; BLAIR-WEST, J.; FIDAHUSEIN, N.; DENTON, D. A.; FRIEDMAN, J. M. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 8878-8883, 1997.

HAMANAN, A.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes and hyperlipidemia. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 21-29, 1996.

HÄRING, H.; KIRSCH, D.; OBERMAIER, B.; ERMEL, B.; MACHICAO, F. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. **Biochem. J.**, v. 234, n. 1, p. 59-66, 1986.

HASSELBACH, W. The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 515, n. 1, p. 23-53, 1978.

HAUSDORFF, W. P.; BOUVIER, M.; O'DOWD, B. F.; IRONS, G. P.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 21, p. 12657-12665, 1989.

HEIM, T.; HULL, D. The effect of propranolol on the calorogenic response in brown adipose tissue of new-born rabbits to catecholamines, glucagons, corticotrophin and cold exposure. **J. Physiol.**, v. 187, n. 2, p. 271-283, 1966.

HEYMSFIELD, S.B.; GREENBERG, A.S.; FUJIOKA, K.; DIXON, R.M.; KUSHNER, R.; HUNT, T.; LUBINA, J.A.; PATENE, J.; SELF, B.; HUNT, P.; McCAMISH, M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. **Jama**, v. 282, n. 16, p. 1568-1575, 1999.

HIMMS-HAGEN, J. **Thyroid hormones and thermogenesis**. London: Chapman and Hall, 1983, p.141-177.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 5, p. 69-94, 1985.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: role in thermoregulation, energy regulation and obesity. In: SCHONBAUM, E.; LOMAX, P. (ED.). **Thermoregulation: Physiology and Biochemistry**. New York: Pergamon, 1990, p. 327-341.

HIMMS-HAGEN, J.; CUI, J.; DANFORTH Jr, R.; TAATJES, D. J.; LANG, S. S.; WATERS, B. L.; CLAUS, T. H. Effects of CL 316, 243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissue in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. 4 pt 2, p. R1371-1382, 1994.

HIMMS-HAGEN, J.; DANFORTH Jr, E. The potential role of β 3- adrenoceptor agonist in the treatment of obesity and diabetes. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes**, v. 3, p. 59-65, 1996.

HOMBURGER, V.; PANTALONI, C.; LUCAS, M.; GOZLAN, H.; BOCKAERT, J. Beta adrenergic receptor repopulation of C6 glioma cells after irreversible blockade and down regulation. **J. Cell. Physiol.**, v. 121, n. 3, p. 589-597, 1984.

ISSAD, T.; COMBETTES, M.; FERRE, P. Isoproterenol inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor without increasing its serine/threonine phosphorylation. **Eur. J. Biochem.**, v. 234, n. 1, p. 108-115, 1995.

JANSKY', L. Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. **Physiol. Reû.**, v. 75, n. 2, p. 237-259, 1995.

JANSKÝ L.; VYBÍRAL, S.; TRUBACOVÁ, M.; OKROUHLÍK, J. Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 104, n. 2, p. 131-135, 2008.

JIMENEZ, M.; LEGER, B.; CANOLA, K.; LEHER, L.; ARBOIT, P.; SEYDOUX, J.; RUSSEL, A.; GIACOBINO, J. P.; MUZZIN, P.; PREITNER, F. β 1/ β 2/ β 3-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. **FEBS Lett**, v. 503, n. 1-3, p. 37-40, 2002.

KIKUCHI-UTSUMI, K.; KIKUCHI-UTSUMI, M.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Differential regulation of the expression of β 1-adrenergic subtype genes in brown adipose tissue. **Biochem. J.**, v. 322, p. 417-424, 1997.

KLEIN, H. H.; MATHAEI, S.; DRENKHAN, M.; RIES, W.; SCRIBA, P. C. The relationship between insulin binding, insulin activation of insulin-receptor tyrosine kinase, and insulin stimulation of glucose uptake in isolated rat adipocytes. Effects of isoprenaline. **Biochem. J.**, v. 274, n. Pt 3, p. 787-792, 1991.

KLEIN, J.; FASSHAUER, M.; ITO, M.; LOWELL B.; BENITO, M.; KAHN, R. β 3-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 49, p. 34795-34802, 1999.

KVEIBORQ, B.; CHRISTIANSEN, B.; MAJOR-PETERSEN, A.; TORP-PEDERSEN, C. Metabolic effects of beta-adrenoceptor antagonists with special emphasis on carvedilol. **Am. J. Cardiovasc. Drugs.**, v. 6, n. 4, p. 209-217, 2006.

LEAVER, E. V.; PAPPONI, P. β adrenergic potentiation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release in brown fat cells. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. C1016–C1024, 2002.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M.; CARROLL, K. M.; DARVISHZADEH, J. G.; LEE, J. I.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal splicing of the leptin receptor in *diabetic* mice. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 632-635, 1996.

LESNÁ, I.; VYBÍRAL, S.; JANSKÝ, L.; ZEMAN, V. Human nonshivering thermogenesis. **J. Therm. Biol.**, v. 24, p. 63-69, 1999.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. **Am. J. Physiol. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 283, n. 4, p. R941-R948, 2002.

LI, H.; MATHENY, M.; NICOLSON, M.; TUMER, N.; SCARPACE, P. J. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. **Diabetes**, v. 46, n. 12, p. 2035-2039, 1997.

LINDQUIST, J. M.; FREDRIKSSON, J. M.; REHNMARK, S.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. β_3 - and β_1 -Adrenergic Erk1/2 activation is Src but not Gi-mediated in brown adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22670–22677, 2000.

LIU, X.; PE'RUSSE, F.; BUKOWIECKI, L. J. Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adipose tissues. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. R914–R920, 1994.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. **Nature**, v. 404, p. 652-660, 2000.

MCCORMACK, J. G. The regulation of fatty acid synthesis in Brown adipose tissue by insulin. **Prog. Lipid. Res.**, v. 21, n. 3, p. 195-223, 1982.

MARETTE, A.; BUKOWIECKI, L. J. Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 4 Pt 1, p. C714– C721, 1989.

MORISHIMA, I.; THOMPSON, W. S.; ROBISON, G. A.; STRADS, S. J. Loss and restoration of sensitivity to epinephrine in cultured BHD cells: effect of inhibitors of RNA and protein synthesis. **Mol. Pharmacol.**, v. 18, n. 3, p. 370-378, 1980.

- NAKAZATO, M.; MURAKAMI, K.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 194-198, 2001.
- NANTEL, F.; BONIN, H.; EMORINE, L. J.; ZILBERFARB, V.; STROBERG, A. D.; BOUVIER, M.; MARULLO, S. The human beta3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. **Mol. Pharmacol.**, v. 43, p. 548-555, 1993.
- NANTEL, F.; MARULLO, S.; KRIEF, S.; STROBERG, A. D.; BOUVIER, M. Cell-specific down-regulation of the beta3-adrenergic receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13148-13155, 1994.
- NEDERGAARD, J.; LINDBERG, O. The brown fat cell. **Int. Rev. Cytol.**, v. 74, p. 187-286, 1982.
- NEDERGAARD, J.; BENDTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 293, n. 2, p. E444-E452, 2007.
- NIKAMI, H.; SHIMIZU, Y.; SUMIDA, M.; MINOKOSHI, Y.; YOSHIDA, T.; SAITO, M.; SHIMAZU, T. Expression of β 3-adrenoceptor and stimulation of glucose β 3-agonists in brown adipocyte primary culture. **J. Biochem.**, v. 119, n. 1, p. 120-125, 1996.
- NICHOLLS, D. G.; LOCKE, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 1-64, 1984.
- NICHOLLS, D. G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein UCP1. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, n. 5, p. 399-406, 1999.
- OBERMAIER, B.; ERMEL, B.; KIRSCH, D.; MUSHACK, J.; RATTENHUBER, E.; BIEMER, E.; MACHICAO, F.; HARING, H. U. Catecholamines and tumour promoting phorbol esters inhibit insulin receptor kinase and induce insulin resistance in isolated human adipocytes. **Diabetologia**, v. 30, n. 2, p. 93-99, 1987.
- OTTO, B.; CUNTZ, U.; FRUEHAUF, E.; WAWARTA, R.; FOLWACZNY, C.; RIEPL, R. L.; HEIMAN, M. L.; LEHNERT, P.; FICHTER, M.; TSCHÖP, M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 145, n. 5, p. 669-673, 2001.
- PETTERSSON, B.; VALLIN, I. Norepinephrine-induced shift in levels of adenosine 3':5'-monophosphate and ATP parallel to increased respiratory rate and lipolysis in isolated hamster brown-fat cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 62, n. 2, p. 383-390, 1976.
- PUIGSERVER, P.; PICO, C.; STOCK, M. J.; PALOU, A. Effects of selective beta-adrenoceptor stimulation on UCP synthesis in primary cultures of brown adipocytes. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 117, n. 1, p. 7-16, 1996.
- REHNMARK, S.; NECHAD, M.; HERRON, D.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Alpha- and beta-adrenergic induced of the expression of the uncoupling protein

thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. **J. Biol.Chem.**, v. 265, n. 27, p. 16464-16471, 1990.

RIBEIRO, M. O.; SUZY, D. C.; SCHULTZ, J. J.; CHIELLINI, G.; SCALAN, T. S.; BIANCO, A. C.; BRENT, G. A. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptative thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. **J. Clin. Invest.**, v.108, p. 97-105, 2001.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **J. Physiol.**, v. 529, n. Pt 1, p. 3-10, 2000.

ROHLFS, E.M.; DANIEL, K.W.; PERMONT, R.T.; KOZAK, L.P.; COLLINS, S. Regulation of the uncoupling protein gene (Ucp) by beta 1, beta 2, and beta 3-adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 18, p. 10723-10732, 1995.

ROHRER, D. K.; DESAI, K. H.; JASPER, J. R.; STEVENS, M. E.; REGULA, D. P. JR.; BARSH, G. S.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B. K. Targeted disruption of the mouse β 1-adrenergic receptor gene: Developmental and cardiovascular effects. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, n. 14, p. 7375-7380, 1996.

ROHRER, D. K. Physiological consequences of β -adrenergic receptor disruption. **J. Mol. Med.**, v. 76, n. 11, p. 764-772, 1998.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. **Metabolism**, v. 30, n. 7, p. 673-678, 1981.

ROTHWELL, N. J. Central control of brown adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 48, n. 2, p. 197-206, 1989.

SASAKI, N.; UCHIDA, E.; NIIYHAMA, M.; YOSHIDA, T.; SAITO, M. Anti-obesity effects of selective agonists to the beta 3-adrenergic receptor in dogs. II. Recruitment of thermogenic brown adipocytes and reduction of adiposity after chronic treatment with a beta 3-adrenergic agonist. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, n. 4, p. 465-469, 1998.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PROTER JR, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SELL, H.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. **Int J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 36, n. 11, p. 2098-2104, 2004.

SILVA, J. E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid**, v. 5, n. 6, p. 481-492, 1995.

SHIMIZU, Y.; NIKAMI, H.; SAITO, M. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 110, n. 5, p. 688-692, 1991.

SHIINTANI, M.; OGAWA, Y.; EBIHARA, K.; AIZAWA-ABE, M.; MIYANAGA, F.; TAKAYA, F. *et al.* Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel

orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. **Diabetes**, v. 50, p. 227-232, 2001.

SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1363, n. 2, p. 100–124, 1998.

SOLOVEVA, V.; GRAVES, R. A.; RASENICK, M. M.; SPIEGELMAN, B. M.; ROSS, S. R. Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. **Mol. Endocrinol.**, v. 11, n. 1, p. 27-38. PMID: 8994185, 1997.

STROSBERG, A. D. Association of beta 3-adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes:current status. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 18, n. 2, p. 449-454, 1997a.

STROSBERG, A. D. Towards the development and use of human-selective agonists for the pharmacologic treatment of obesity and diabetes. **J. Endocrinol.**, v. 155, n. 2, p. 221-222, 1997b.

SUSULIC, S. V.; FREDERICH, R. C.; LAWITTS, J.; TOZZO, E.; KAHN, B. B.; HARPER, M. E.; HIMMS-HAGEN, J.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B. Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 49, p. 29483–29492, 1995.

THEANDER-CARRILLO, C.; WIEDMER, P.; CETTOUR-ROSE, P.; NOGUEIRAS, R.; PEREZ-TILVE, D.; PFLUEGER, P.; CASTANEDA, T.R.; MUZZIN, P.; SCHÜRMAN, A.; SZANTO, I.; TSCHÖP, M.H.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1983-1993, 2006.

TSCHÖP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 908-913, 2000.

TSCHÖP, M.; WEYER, C.; TATARANNI, P. A.; DEVANARAYA, V.; RAVUSSIN, E.; HEIMAN, M. L. Circulation ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes**, v. 50, p. 707-709, 2001.

TUTTLE, R. R.; MILLS, J. Dobutamine: development of a new catecholamine to increase cardiac contractility. **Circ. Res.**, v. 36, n. 1, p. 184-196, 1975.

UKKOLA, O.; POYKKO, S. Ghrelin, growth and obesity. **Ann. Med.**, v. 34, p. 102-108, 2002.

WEIGLE, D. S. Appetite and the regulation of body composition. **FASEB J.**, v. 8, n. 3, p. 302-310, 1994.

WIDDOWSON, P. S.; UPTON, R.; BUCKINGHAM, R.; ARCH, J.; WILLIAMS, G. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rat diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1782-1785, 1997.

WILLIAMS, D. L.; CUMMINGS, D. E. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. **J. Nutr.**, v. 135, n. 15, p. 1320-1325, 2005.

WILSON, B. E.; MEYER, G. E.; CLEVELAND Jr, J. C.; WEIGLE, D. S. Identification of candidate genes for a factor regulating body weight in primates. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 6 Pt 2, p. R1148-R1155, 1990.

WITHERS, P. C. Measurement of VO_2 , VCO_2 , and evaporative water loss with a flow-through mask. **J. Appl. Physiol.**, v. 42, n. 1, p. 120–123, 1977.

VALIQUETTE, M.; BONIN, H.; HNATOWICH, M.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 13, p. 5089-5093, 1990.

ZHANG, Y. Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZHAO, J.; UNELIUS, L.; BENGTSSON, T.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Coexisting β -adrenoceptor subtypes:significance for thermogenic process in Brown fat cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 36, p. C969-C979, 1994.

ZHAO, J.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Thermogenesis is β_3 -but not β_1 -adrenergically mediated in rat Brown fat cells, even after cold acclimation. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 44, p. R2002-R2011, 1998.