

GUSTAVO WERPEL FERNANDES

**PAPEL DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1 NO DESENVOLVIMENTO DA
DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Medicina Translacional da
Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre.

São Paulo

2013

GUSTAVO WERPEL FERNANDES

**PAPEL DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1 NO DESENVOLVIMENTO DA
DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Medicina Translacional da Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Dr. Antônio Carlos Bianco.

Co-orientador(a): Dra. Miriam Oliveira Ribeiro

São Paulo

2013

Fernandes, Gustavo Werpel

Papel do receptor adrenérgico β 1 no desenvolvimento da doença hepática não alcoólica./ Fernandes Gustavo Werpel. -- São Paulo, 2013. xiv, 54f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Role of adrenergic receptor β 1 in the development of non alcoholic disease.

1. Agonistas de Receptores Adrenérgicos β 1. 2. Fígado Gorduroso. 3. Obesidade. 4. Metabolismo de Lipídeos. 5. Camundongos Endogâmicos C57BL.

GUSTAVO WERPEL FERNANDES

PAPEL DO RECEPTOR ADRENÉRGICO β_1 NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Medicina Translacional da
Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira (Titular - USP)

Dr. Marcelo Augusto Christoffolete (Titular - UFABC)

Dra. Vera de Moura Azevedo Farah (Titular - UNIFESP)

Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros (Suplente - MACKENZIE)

Dissertação aprovado em Fevereiro de 2013.

São Paulo

2013

Dedico esse trabalho aos meus pais e orientadores, exemplos de personalidade e maturidade, que com o passar dos tempos, estiveram sempre ao meu lado me apoiando e inspirando a trabalhar no que eu mais amo.

AGRADECIMENTO

A Dra. Miriam Oliveira Ribeiro pela amizade, pelos diversos ensinamentos, pela força concebida nesta jornada, e por acreditar neste trabalho.

Ao Dr. Antonio Carlos Bianco pelas orientações, oportunidade e por acreditar neste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Augusto Christoffolete pelos ensinamentos, atenção e paciência.

A Dra. Patrícia Chakur Brum, Dra Cecília Helena de Azevedo e Dra Marisa Passarelli pela colaboração deste trabalho.

As alunas Barbara Bocco e Cícera Pimenta, pela participação, pela parceria, e pela disposição que sempre demonstram.

A minha amada família pelo carinho, incentivo e suporte em todos os momentos.

Ao Grupo da Dra Miriam Oliveira Ribeiro, pela força no trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FERNANDES, G.W. **Papel dos receptores adrenérgicos β_1 no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Medicina Translacional, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

A obesidade é uma epidemia mundial e está associada com a síndrome metabólica (SM), um conjunto de anormalidades que incluem resistência à insulina, obesidade abdominal, diabetes mellitus, dislipidemia e doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Atualmente a DHGNA é conhecida como a manifestação da SM no fígado e inclui um espectro de patologias hepáticas, variando de esteatose hepática até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Animais com nocaute para as três isoformas de receptor adrenérgico β (TKO) são obesos e sensíveis ao frio, demonstrando que estes receptores estão envolvidos na regulação do metabolismo energético e, conseqüentemente, na manutenção do peso corporal. No entanto, as funções específicas de cada uma das isoformas dos receptores adrenérgicos β no metabolismo lipídico e o desenvolvimento da obesidade ainda não foram totalmente elucidadas. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o papel de receptor adrenérgico β_1 no desenvolvimento da obesidade e da DHGNA. Camundongos que apresentam nocaute para o receptor adrenérgico β_1 e os seus respectivos controles foram tratados com dieta rica em gordura (40%) por ~ 45 dias. O peso corporal e consumo de ração foram registrados diariamente. Durante o tratamento os testes de tolerância à insulina e glicose foram realizados e ao final do tratamento os níveis de triglicérides e colesterol plasmáticos foram medidos. Amostras de tecido adiposo branco e fígado foram removidas e imediatamente congeladas (-70°C) para análise da expressão de vários genes e proteínas relacionados com o metabolismo lipídico através dos métodos de PCR em tempo real e Western Blotting. Outras amostras foram fixadas em formol (10%) para posterior análise histológica. Nossos resultados mostraram que a inativação do gene do receptor adrenérgicos β_1 leva ao desenvolvimento da obesidade após o tratamento com dieta com alto teor de gordura, bem como a intolerância à glicose, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Além disso, esses animais apresentaram o fígado com esteatose severa e fibrose, caracterizando a EHNA. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da ENHA nesses animais envolvem aumento na síntese de triglicérides e redução na síntese e exportação de VLDL pelo fígado, com conseqüente acúmulo de lipídios neste tecido. Além disso, a via de síntese e captura de colesterol e a via de exportação de colesterol encontram-se estimuladas nos camundongos KO β_1 tratados com dieta hipercalórica. A via de regulação da sinalização da insulina também parece estar prejudicada nos animais KO β_1 mesmo na ausência da obesidade, sugerindo papel importante do Sistema Nervoso Simpático no metabolismo de glicose. Tomados em conjunto, os dados obtidos no presente estudo mostram que o receptor adrenérgico β_1 apresenta papel fundamental na regulação do gasto energético e no peso corporal. Além disso, o receptor adrenérgico β_1 pode estar

relacionado com o desenvolvimento de DHGNA e com a homeostase glicêmica e lipídica, através da regulação da via de sinalização de insulina

Palavra-chave: receptor adrenérgico β_1 , obesidade, metabolismo lipídico, esteatose.

ABSTRACT

FERNANDES, G.W. **Role of adrenergic receptor β_1 in the development of non alcoholic disease.** 2013. Master's Thesis in Science - Medicina Translacional, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

Obesity is a worldwide epidemic and is associated with metabolic syndrome (MS), a set of abnormalities including insulin resistance, abdominal obesity, diabetes mellitus, dyslipidemia, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Currently, NAFLD is known as the manifestation of MS in the liver and includes a spectrum of liver pathologies, ranging from hepatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Knockout animals for all three isoforms of β adrenergic receptor (TKO) are obese and cold-sensitive, demonstrating that these receptors are involved in regulation of energy metabolism and, consequently, the maintenance of body weight. However, the specific functions of each isoforms of β -adrenergic receptors in lipid metabolism and the development of obesity has not yet been fully elucidated. The objective of this study was to determine the role of β_1 adrenergic receptor in the development of obesity and NAFLD. Mice that exhibit knockout for the β_1 adrenergic receptor and their respective controls were treated with high-fat diet (40%) for ~ 45 days. Body weight and feed intake were recorded daily. During treatment, insulin and glucose tolerance tests were performed and at the end of treatment the levels of plasma triglycerides and cholesterol were measured. Samples of white adipose tissue and liver were removed and immediately frozen (-70°C) for analysis of the expression of several genes and proteins related to lipid metabolism through the methods of real-time PCR and Western Blotting. Other samples were fixed in formol (10%) for subsequent histological analysis. Our results show that the inactivation of β_1 adrenergic receptor gene leads to the development of obesity when placed with high fat diet as well as impaired glucose tolerance, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Furthermore, these animals showed severe liver steatosis and fibrosis, featuring NASH. The mechanisms involved in the development of NASH in these animals involve increased synthesis of triglycerides and reduced synthesis and export of VLDL by the liver, with consequent accumulation of lipids in this tissue. Furthermore, the cholesterol synthesis and capture pathway and cholesterol export pathway are stimulated in β_1 KO mice treated with high fat diet. The pathway of insulin signaling regulation also appears to be impaired in animals β_1 KO even in the absence of obesity, suggesting an important role of the sympathetic nervous system in the metabolism of glucose. Taken together, the data obtained in this study show that the β_1 adrenergic receptor has key role the regulation of energy expenditure and body weight. Furthermore, the β_1 adrenergic receptor can be related to the development of NAFLD and lipid and glucose homeostasis by regulating the insulin-signaling pathway.

Key-words: β_1 adrenergic receptor, obesity, lipid metabolism, steatosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Face citoplasmática da membrana, com o receptor adrenérgico Alfa e Beta.....	9
Figura 2. A) Peso Corporal; B) Δ Peso corporal dos camundongos C57 e camundongos KO β ₁ tratados com dieta padrão ou hipercalórica durante 45 dias.....	20
Figura 3. Área estimada do adipócito epididimal individual.....	21
Figura 4. A) Consumo de ração diário dos camundongos C57 e camundongos KO β ₁ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica ; B) Consumo de calorias diário dos camundongos C57 e camundongos KO β ₁ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica.....	21
Figura 5 A) Teste de tolerância à glicose: dos camundongos C57 e KO β ₁ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. B) Área sob a curva do GTT. C) Teste de tolerância à insulina: dos camundongos C57 e KO β ₁ tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. D) Área sob a curva do ITT.....	23
Figura 6. Histologia do fígado. A) C57 corado com HE; B) KO β ₁ corado com HE; C) C57 HIPER corado com Masson; D) e E) KO β ₁ HIPER corado com Masson.....	25
Figura 7.) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-1c. B) Determinação do nível de RNAm do gene ChREBP. C) Determinação do nível de RNAm do gene ACC. D) Determinação do nível de RNAm do gene FAS.....	26
Figura 8. A) Determinação do nível de RNAm do gene SCD1. B) Determinação do nível de RNAm do gene PPAR γ . C) Determinação do nível de RNAm do gene DGAT 2. D) Determinação da expressão da proteína DGAT2.....	28
Figura 9. A) Determinação do nível de RNAm do gene MTTP. B) Determinação da expressão da proteína MTTP. C) Determinação do nível de RNAm do gene SORT1.....	29
Figura 10. A) Determinação do nível de RNAm do gene LDL-R. B) Determinação da expressão da proteína LDL-R. C) Determinação do nível de RNAm do gene PCSK9.....	30
Figura 11. A) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP 2. B) Determinação do nível de RNAm do gene LXR. C) Determinação do nível de RNAm do gene ABCA 1. D) Determinação do nível de RNAm do gene TNF - α	32
Figura 12. A) Determinação do nível de RNAm do gene PPAR γ (Tecido Adiposo Branco). B) Determinação do nível de RNAm do gene Resistina (Tecido Adiposo Branco. C) Determinação do nível de RNAm do gene Adiponectina (Tecido Adiposo Branco).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers para PCR em tempo real.....	17
Tabela 2. Ausência do receptor adrenérgico β_1 no metabolismo lipídico de animais tratados com dieta padrão ou dieta hipercalórica.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SM- Síndrome Metabólica

DHGNA- Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

EHNA- Esteatohepatite Não Alcoólica

HDL- Lipoproteína de alta densidade

IDL- Lipoproteína de densidade intermediária

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

VLDL- lipoproteína de densidade muito baixa

sdLDL- Lipoproteína de baixa densidade pequena e densa

NE- noradrenalina

SNS- sistema nervoso simpático

AMPc- adenosina monofosfato 3',5'-cíclico

PKA- proteína kinase dependente de cAMP

ALT- Alanina Aminotransferase

AASLD- American Association for the Study of Liver Diseases

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

SREBP - Proteína de ligação do elemento regulado por esterol

ChREBP- Proteína de ligação do elemento de resposta do carboidrato

ACC- Acetil CoA Carboxilase

FAS/FASN- Ácido Graxo Sintase

SCD1- Esteroil-Coenzima A dessaturase

DGAT2- Diacil-glicerol Aciltransferase 2

ApoB - Apolipoproteínas-B

ApoE - Apolipoproteínas-E

SORT- Sortilins

MTTP- Proteína Microssomal de Transferência de Triglicerídeos

LPL- Lipases de lipoproteínas

CETP- Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

HL- Lipase Hepática

LDL-R- Receptor de LDL

ACAT- Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

HMG CoA- Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

PCSK9- Proproteína Convertase Subtilisina/ Kexin Tipo 9

LXR- Receptor X do fígado

ABCA1- Cassete A1 ligador de ATP

BAT- Tecido Adiposo Marron

WAT- Tecido Adiposo Branco

KO- Nocaute

TKO- Triplo Nocaute

KO $\beta_1^{-/-}$ - Nocaute para o receptor adrenérgico beta 1

LHS- Lipase hormônio sensível

IPGTT – Teste de tolerância a Glicose (intraperitonal)

IPITT – Teste de tolerância a Insulina (intraperitonal)

GTT (AU)- Área sob a curva do GTT

ITT (AU)- Área sob a curva do ITT

HE- Hematoxilina/Eosina

PPAR γ – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PCR- reação de Polimerização em cadeia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Síndrome Metabólica e o Desenvolvimento da DHGNA.....	1
1.1.1. DHGNA e o metabolismo de lipídios e lipoproteínas	3
1.2. Receptores adrenérgicos	8
1.2.1. Receptores adrenérgicos e metabolismo.....	10
2- OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos específicos	13
3- MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais	14
3.2. Dieta Hipercalórica	15
3.3. Teste de tolerância à glicose (IPGTT)	15
3.4. Teste de tolerância à insulina (IPITT)	15
3.5. Medida de colesterol plasmático	16
3.6. Medida de triglicérides plasmáticos	16
3.7. Análise de RNAm por PCR em tempo real	16
3.8. Western Blotting.....	18
3.9. Histologia.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Determinação da composição corporal e desenvolvimento da obesidade.....	20
4.2. Papel dos receptores β adrenérgicos no metabolismo.....	22
4.2.1. Homeostase da Glicose.....	23
4.2.2. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides nos camundongos $KO\beta_1$	23
4.3. Histologia Hepática.....	25
4.4. Determinação da expressão gênica nos camundongos $KO\beta_1$	26
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome Metabólica e o Desenvolvimento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

A obesidade pode ser definida como um distúrbio multifatorial caracterizado pela deposição excessiva de gordura nos tecidos e está diretamente relacionada ao desenvolvimento da Síndrome Metabólica (SM). A SM pode ser compreendida como um conjunto de fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças e distúrbios cardiovasculares, tais como aumento nos níveis de triglicérides, diminuição nos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL), desenvolvimento de hipertensão arterial, aumento da glicemia em jejum e resistência à insulina, o que pode preceder o desenvolvimento de diabetes tipo II (ALBERTI, ZIMMET & SHAW, 2006; HELLERSTEIN & PARKS, 2007; RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2010; DODSON *et al.*, 2011).

Nos últimos anos a Síndrome Metabólica passou a ser classificado como epidemia de ordem mundial, devido ao aumento significativo da prevalência de tal distúrbio em diversas populações, tanto em crianças quanto em indivíduos adultos (HELLERSTEIN & PARKS, 2007).

Dentre os diversos componentes associados à Síndrome Metabólica a obesidade, resistência à insulina, hipertensão arterial, dislipidemia, apoptose e níveis alterados de adiponectina e citocinas apresentam-se como distúrbios centrais para o desenvolvimento de outras condições patológicas relacionadas ao metabolismo, tal como a Doença Hepática Gordurosa Não alcoólica (DHGNA) (SUBRAMANIAN *et al.*, 2011).

A DHGNA é uma desordem hepática comum nos países ocidentais, que afeta pelo menos um quarto da população geral. (RECTOR *et al.*, 2008; LAZO & CLARK, 2008). A DHGNA costumava ser uma doença exclusiva de adultos, porém nos dias de hoje esta se tornando uma questão significativa de saúde também na obesidade infantil. A obesidade infantil aumentou significativamente nas últimas três décadas (JANSSEN *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2005), e impulsionou a prevalência da DHGNA em adolescentes (BARSHOP *et al.*, 2008). Essa doença é atualmente definida pela American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) como o aumento da deposição de gordura no tecido hepático, o que pode ser determinado a partir da observação dos hepatócitos por microscopia óptica e determinação da

porcentagem de gordura presente nestas células (NEUSCHWANDER-TETRI & CALDWELL, 2003). Trata-se de uma patologia que ocorre em indivíduos que não consomem álcool em quantidades danosas ao fígado. A origem do termo DHGNA foi criada com o propósito de incorporar uma gama de patologias hepáticas, variando de esteatose hepática macrovesicular simples até Esteatohepatite Não-Alcoolica (EHNA). A esteatose simples é considerada benigna e não progressiva, enquanto a EHNA é caracterizada por lesão nos hepatócitos, inflamação, fibrose e pode levar a cirrose, carcinoma hepatocelular e falência hepática (NEUSCHWANDER-TETRI & CALDWELL, 2003). Em relação às características clínicas, na maioria dos pacientes é assintomática, por isso a DHGNA é, geralmente, diagnosticada através de alterações bioquímicas séricas de enzimas do fígado em exames de rotina. Um dos indicadores de diagnóstico conhecidos é a Alanina Aminotransferase (ALT), que representa um importante índice de detecção de lesões no tecido hepático (FUJITA *et al.*, 2009). Por apresentar uma interação não linear de seus fatores, sua aparição e progressão ainda não são profundamente compreendidas, necessitando de estudos futuros para entender sua natureza multi-fatorial.

Em pacientes que apresentam a DHGNA, o fígado produz diversos fatores aterogênicos, como citocinas e lipoproteínas “ruins”. Deste modo, a gordura hepática está associada com o aumento dos níveis séricos de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e triglicérides, combinado com a redução dos níveis de lipoproteína de densidade alta (HDL), representando uma ameaça para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MUSUNURU, 2010). Existem diversas evidências sugerindo que a DHGNA está associado com o aumento de incidência de doenças cardiovasculares, tanto em pacientes não diabéticos como em pacientes que possuem diabetes mellitus tipo 2 (KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2008).

1.1.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) e o metabolismo de lipídios e lipoproteínas

A patogênese da DHGNA, como um modelo de “*two-hits*” foi inicialmente proposto por Day e James (1998). Primeiramente, a resistência à insulina causa o acúmulo de triglicérides nos hepatócitos pela incapacidade do fígado de regular a lipogênese na transição entre estado de jejum e alimentado, levando assim ao desenvolvimento da DHGNA. De fato, diversos estudos observam aumento da lipogênese hepática na presença de esteatose hepática. A lipogênese aumentada pode levar tanto ao aumento na síntese de triglicérides como a redução da oxidação de ácidos graxos através da produção de malonil-CoA (BROWNING & HORTON, 2004).

Em um segundo momento, insultos celulares como oxidação lipídica, estresse oxidativo e inflamação resultam na EHNA. Neste estágio da doença verificam-se disfunções na homeostase lipídica, além de liberação de adipocitocinas e de citocinas pró-inflamatórias, tal como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (FON TACER & ROZMAN, 2011). A β – oxidação de ácidos graxos no fígado aumenta em pacientes com EHNA (SANYAL *et al.*, 2001), porém a síntese de ácidos graxos é maior.

A resistência à insulina é um dos principais fatores associados ao desenvolvimento da DHGNA e está diretamente relacionada à concentração plasmática de LDL pequena e densa (sdLDL), que é um importante índice para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, considerando seu alto potencial aterogênico (LUCERO *et al.*, 2011; SUGINO *et al.*, 2011). O desajuste do metabolismo lipídico na gordura hepática está associado ao aumento da síntese de triglicérides com consequente elevação significativa na produção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), a lipoproteína característica da Síndrome Metabólica (CALI *et al.*, 2007). Elevados níveis de VLDL correlacionam-se fortemente com obesidade e Síndrome Metabólica e são considerados como fator chave de distúrbios metabólicos.

O fígado exerce um papel fundamental no metabolismo de lipídios, promovendo a síntese de triglicérides que pode ocorrer a partir das proteínas e dos carboidratos, e a oxidação dos ácidos graxos para o fornecimento de energia aos diversos sistemas corporais (GUYTON & HALL, 2006). Uma das principais funções do fígado é manter a glicose do plasma dentro dos limites fisiológicos independente do estado nutricional do animal.

Desta forma, caso haja ingestão de carboidratos em quantidade superior ao necessário para suprir as necessidades energéticas, ocorre conversão destes em ácidos graxos, por um processo conhecido como lipogênese *de novo*. A síntese de ácido graxo *de novo* é a via metabólica que converte o excesso de carboidrato em ácidos graxos, que posteriormente são esterificados na forma de triglicérides, os quais podem ser armazenados como gotículas lipídicas no interior dos hepatócitos ou incorporados dentro das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), e secretadas no sangue.

O processo de síntese de ácido graxo é responsivo a fatores hormonais, genéticos e, principalmente, nutricionais, sendo por essas razões considerado extremamente importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade (POLACOW & LANCHÁ JUNIOR, 2007). Pesquisas em humanos obesos com EHNA demonstraram que cerca de 60% dos triglicérides do fígado vêm de ácidos graxos livres, 25% da lipogênese *de novo*, e 15% da dieta (DONNELLY *et al.*, 2005).

Em indivíduos com DHGNA também se observa um aumento da lipogênese *de novo*. A insulina e a glicose são capazes de estimular a lipogênese, através dos fatores transcricionais, SREBP -1c (Proteína de ligação do elemento regulado por esterol - 1c) e ChREBP (Proteína de ligação do elemento de resposta do carboidrato), respectivamente (FOUFELLE & FERRÉ, 2002). Portanto, a hiperinsulinemia induz a expressão de SREBP-1c, mesmo em situação de resistência a insulina (SHIMANO *et al.*, 1997), elevando a transcrição gênica de enzimas envolvidas na síntese de ácido graxo. Dentre essas se pode destacar a Acetil CoA Carboxilase (ACC), responsável pela conversão da Acetil CoA em Malonil CoA, e a Ácido Graxo Sintase (FAS/FASN) que, por sua vez, atua na conversão de Malonil CoA em Palmitato, sendo responsável pela ocorrência da última etapa da síntese de ácidos graxos (HORTON, GOLDSTEIN & BROWN, 2002; ZHAO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Em animais transgênicos, a super expressão do SREBP-1c leva à esteatose por aumento na lipogênese (SHIMANO *et al.*, 1997). Em contraste, a inativação do gene do SREBP-1c resulta na redução de 50% dos triglicérides em camundongos ob/ob (YAHAGI *et al.*, 2002).

Por sua vez, o fator de transcrição ChREBP, o fator transcricional ativado pela glicose, promove a ativação de genes das enzimas responsáveis pelos processos de glicólise, lipogênese e gliconeogênese, sendo responsivo ao aumento da glicemia. (JUMP *et al.*, 2005;

IIZUKA & HORIKAWA, 2008). Em camundongos ob/ob, a inibição do gene ChREBP melhora o quadro de resistência à insulina assim como a esteatose hepática (DENTIN *et al.*, 2006).

Assim, a glicose pode ser considerada um dos fatores estimuladores da lipogênese por atuar na sua conversão em Acetil CoA por meio da via glicolítica e também por estimular a liberação de insulina, que é considerada o principal hormônio estimulador da lipogênese (POLACOW & LANCHÁ JUNIOR, 2007).

A formação e acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático envolve a atuação de diversas enzimas, dentre as quais se pode destacar a Esteroil-Coenzima A dessaturase (SCD1) e a Diacil-glicerol Aciltransferase 2 (DGAT2). A SCD1 exerce um papel essencial na dessaturação de ácidos graxos, resultando na produção de gorduras monoinsaturadas. Em roedores e em humanos, a atividade dessa enzima é maior em tecidos com alta capacidade lipogênica, tais como o tecido adiposo branco e o fígado. O aumento na sua expressão promove uma elevação da dessaturação de ácidos graxos e da produção de triglicerídeos, eventos relacionados à obesidade e a outros caracteres da Síndrome Metabólica (FLOWERS *et al.*, 2006).

Por sua vez, o DGAT 2 catalisa a última etapa na biossíntese de triglicérides no hepatócito e encontra-se aumentada no fígado gorduroso (CHEOL *et al.*, 2007). No entanto, apesar do aumento da síntese e deposição de triglicérides no fígado serem uma das principais características dessa doença, este acúmulo parece ser hepatoprotetor, uma vez que a evolução da DHGNA para a EHNA está relacionada com o fato do fígado não ser capaz de sintetizar triglicérides a partir da grande quantidade de ácidos graxos acumulados, resultando na diminuição da expressão de DGAT2 nesse estágio da doença (FON TACER & ROZMAN, 2011).

Tendo em vista que as lipoproteínas produzidas pelo fígado são fonte de triglicérides e colesterol para outros tecidos e que a homeostase lipídica encontra-se corrompida devido a DHGNA, nesta condição o fígado aumenta a secreção de VLDL no plasma levando, conseqüentemente, ao aumento do nível de triglicérides plasmático.

Dentre os elementos relacionados à produção e exportação dos triglicérides no fígado, pode-se destacar a síntese dos receptores Sortilin 1. Estes receptores interagem com as Apolipoproteínas-B 100 (ApoB 100) no Complexo de Golgi promovendo a síntese e exportação de VLDL e a regulação dos níveis plasmáticos de LDL (FON TACER & ROZMAN, 2011). Além disso, a Proteína Microssomal de Transferência de Triglicerídeos (MTTP) é extremamente

importante, pois ela é responsável pela formação de VLDL no fígado, de forma que a sua diminuição leva a defeitos nos mecanismos de exportação de triglicérides e colesterol dos hepatócitos (FON TACER & ROZMAN, 2011) pelo bloqueio da secreção de VLDL com aumentos ainda maiores de triglicérides no fígado. Estudos demonstraram que a dieta hipercalórica induz a metilação da MTTP com consequente redução no seu nível de RNAm (CHANG *et al.*, 2010). De fato, camundongos que não conseguem secretar VLDL devido ao *knockout* da MTTP no fígado, exibem níveis significativamente reduzidos de triglicérides no plasma e desenvolvem esteatose hepática (BJÖRKEGREN *et al.*, 2002; RAABE *et al.*, 1999), entretanto sem inflamação e resistência a insulina (MINEHIRA *et al.*, 2008).

Na progressão de esteatose hepática simples para EHNA os processos de exportação de lipoproteínas sofrem alterações, reduzindo a secreção de VLDL para o plasma (FON TACER & ROZMAN, 2011). Uma vez que as moléculas de VLDL são secretadas no plasma pelos hepatócitos, as enzimas denominadas lipases de lipoproteínas (LPL) hidrolisam o conteúdo de triglicérides da VLDL, deixando a partícula progressivamente menor, mais densa, promovendo a formação de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), com o conteúdo de colesterol relativamente alto (TULENKO & SUMNER, 2002). A Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP) também participa dessa cascata de eventos transferindo ésteres de colesterol e triglicérides entre as moléculas de VLDL e LDL. Já a Lipase Hepática (HL) promove a formação da sdLDL a partir de LDL (PACKARD & SHEPHERD, 1997; PETERSEN *et al.*, 2010; LUCERO *et al.*, 2011).

Assim, a CETP reduz a VLDL na circulação e aumenta os níveis plasmáticos de colesterol. Pacientes com esteatose hepática apresentam atividade da CETP elevada, o que pode explicar as alterações nos níveis das lipoproteínas plasmáticas observadas nesses indivíduos (LUCERO *et al.*, 2011). Outros estudos mostram que pacientes com aumento anormal na concentração de lipoproteínas plasmáticas, apresentam resistência a insulina (ADIELS *et al.*, 2008; HAIDARI *et al.*, 2002).

Apesar dos mecanismos que relacionam o metabolismo hepático de lipídios à resistência à insulina não serem totalmente elucidados, é sabido que a hiperinsulinemia está relacionada à síntese de enzimas que desempenham funções essenciais no metabolismo. A resistência à insulina ocasiona o aumento da secreção de VLDL, com consequente aumento de

LDL no plasma (ZOLTOWSKA *et al.*, 2001), que posteriormente será absorvido pelo fígado através do receptor LDL (LDL-R) (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

As lipoproteínas são fonte de colesterol para o fígado (GINSBERG, ZHANG & HERNANDEZ-ONO, 2005). O colesterol é indispensável, porém, prejudicial em excesso na célula. O nível intracelular de colesterol é regulado por um grande número de mecanismos envolvidos na sua síntese, captura, catabolismo, e exportação.

O receptor de LDL (LDL-R) tem a capacidade de reconhecer dois ligantes: a apoB e a apoE, o que faz com que este receptor consiga remover da circulação as LDL, as VLDL e as IDL (Goldstein *et al.*, 1995). O nível de LDL do plasma é determinado pela relação entre sua produção e remoção do plasma pelos hepatócitos por meio dos receptores para LDL presentes a membrana plasmática dessas células. A regulação da expressão dos LDL-R na membrana dos hepatócitos é realizada por um *feedback* negativo transcricional mediado pelos níveis de colesterol intracelular (GOLDSTEIN & BROWN, 2009). O aumento da concentração de colesterol nas células ativa mecanismos envolvidos na regulação da formação de colesterol livre. Desta forma, o excesso de colesterol intracelular vai induzir: 1) diminuição da síntese endógena de colesterol por inibição da HMG-CoA redutase; 2) aumento da taxa de esterificação de colesterol intracelular pela enzima ACAT (acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) e 3) inibição da expressão do gene que codifica o LDL-R, através de elementos responsivos a esteróide (SRE, Sterol Regulatory Element) localizados a montante do gene e que são especificamente reconhecidos pelas SREBP (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; RIFAI *et al.*, 1999).

A PCSK9 (Proteína Convertase Subtilisina/ Kexin Tipo 9) também é uma proteína importante no metabolismo de colesterol. Ela aumenta a degradação do receptor LDL, resultando no acúmulo de LDL no plasma. Estudos recentes tem sugerido uma nova terapia contra a hipercolesterolemia, através da inibição da PCSK9. Pacientes com perda de função da PCSK9 apresentaram níveis de LDL reduzidos no plasma (ABIFADEL *et al.*, 2003).

Dois grandes reguladores importantes do metabolismo do colesterol são SREBP-2 (Proteína de ligação do elemento regulado por esterol - 2) e LXR (receptor X do fígado). Quando os níveis intracelulares de colesterol são reduzidos, a SREBP-2 induz a captura e biossíntese do colesterol no fígado (BROWN & GOLDSTEIN, 1997). Em contraste, o excesso de colesterol intracelular inibe o SREBP-2 e ativa o LXR, que por sua vez promove a exportação e eliminação do colesterol (PEET, JANOWSKI & MANGELSDORF *et al.*, 1998). LXR são receptores

nucleares que controlam o metabolismo lipídico. Receptores nucleares apresentam um destaque crucial no papel de lipídios relacionado ao desenvolvimento da DHGNA (MOREAU *et al.*, 2009). Em roedores, o LXR promove o efluxo, transporte e excreção celular de colesterol (PEET *et al.*, 1998). O mesmo receptor também realiza a ativação do SREPB-1c através da insulina, induzindo a síntese de ácido graxo no fígado (CHEN *et al.*, 2004), sugerindo um novo mecanismo a qual LXR promove a formação de gordura hepática (ZHOU *et al.*, 2008).

Outro importante alvo do LXR é o ABCA1 (cassete A1 ligador de ATP), envolvido na via de transporte de colesterol de tecidos periféricos para o fígado, mediando o transporte da lipoproteína HDL (ZHAO & DAHLMAN-WRIGHT, 2010). Estudos anteriores demonstram que a superexpressão hepática do ABCA1 aumenta os níveis de colesterol HDL (WELLINGTON *et al.*, 2003)

Dessa forma, a DHGNA e os diversos aspectos patológicos estão associados à expressão e atuação conjunta de diferentes fatores, que apresentam funções essenciais no metabolismo lipídico, evidenciando a importância do estudo para a compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento e progressão de tal doença.

1.2. Receptores adrenérgicos

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} (GARDNER & SHOBACK, 2007), β_1 , β_2 e β_3 . (COLLINS & SURWIT, 2005). Tais receptores são proteínas transmembranas com uma porção amino terminal extracelular e uma porção carboxi terminal intracelular (Figura 1). 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 (GARDNER & SHOBACK, 2007). Estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como desenvolvimento, comportamento, tônus do músculo liso, funcionamento cardíaco e metabolismo energético (JIMENEZ *et al.*, 2002).

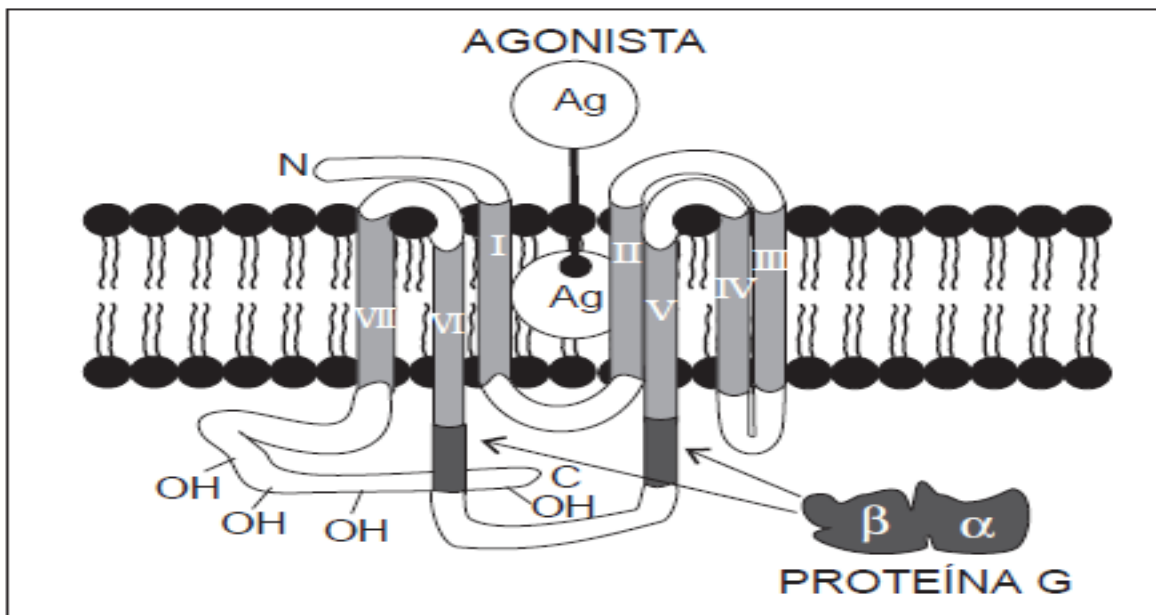


Figura 1: Face citoplasmática da membrana, com os pontos de contato para a proteína G. Ligado a esta proteína se encontra o receptor adrenérgico Alfa e Beta. (SIMONETTI, VALINETTI & FERREIRA, 1997).

Os receptores adrenérgicos α_1 medeiam a vasoconstrição do músculo liso vascular, glicogenólise e gliconeogênese no fígado (GARDNER & SHOBACK, 2007). Já o receptor α_2 tem o papel de inibir a lipólise no tecido adiposo branco e a termogênese no tecido adiposo marrom (BAT) por estar acoplado à proteína G inibitória, levando a uma inibição da ativação da adenilil ciclase e redução da formação de cAMP (GARDNER & SHOBACK, 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 (GARDNER & SHOBACK, 2007). Já os receptores adrenérgicos β_2 causam relaxamento do músculo liso, resultando em broncodilatação e vasodilatação, aumentam glicogenólise e gliconeogênese no fígado e aumentam a secreção de insulina e glucagon nas ilhotas pancreáticas (GARDNER & SHOBACK, 2007). Os receptores adrenérgicos β_3 podem estar envolvidos na estimulação do gasto energético e na lipólise no BAT e no tecido adiposo branco (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).

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 (triplo nocaute ou TKO). Os camundongos TKO apresentam redução do gasto energético em temperatura ambiente, obesidade moderada em dieta normal e sensibilidade à obesidade induzida pela dieta (JIMENEZ *et al.*, 2002).

1.2.1. Receptores adrenérgicos e metabolismo

O aumento da deposição de gordura nos tecidos está associado à diferença entre a ingestão e o gasto energético. Tal desbalanço pode estar relacionado ao aumento da ingestão calórica, considerando a quantidade e a qualidade do alimento ingerido, e à diminuição do gasto energético, que pode ser decorrente do desenvolvimento de desordens metabólicas, as quais geram ineficiências na mobilização dos lipídios, resultando no aumento de peso corporal e, conseqüentemente, no surgimento de diversos distúrbios relacionados (BACHMAN *et al.*, 2002).

Considerando a influência do balanço energético para o aumento de peso corporal e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da obesidade e das alterações decorrentes da mesma, torna-se extremamente importante compreender os processos e fatores relacionados ao metabolismo energético.

O gasto energético pode ocorrer a partir de diferentes mecanismos, como a termogênese obrigatória, a termogênese facultativa e a realização de exercícios físicos. A termogênese obrigatória promove o gasto energético mínimo necessário para suprir as necessidades fisiológicas do organismo. Já a termogênese facultativa é o aumento do gasto energético sob demanda como exposição ao frio ou e dieta (BACHMAN *et al.*, 2002).

A termogênese facultativa ou adaptativa ocorre em diferentes tecidos, incluindo o tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco, músculo-esquelético e fígado, os quais controlam o balanço energético por meio do aumento ou diminuição da liberação da energia em forma de calor (LOWELL & BACHMAN, 2003).

Os receptores β_1 e β_2 são receptores de alta afinidade e, portanto, mesmo em baixas concentrações, a noradrenalina (NE) circulante pode ligar e ativar esses receptores. 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 consequente 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 consequente 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 consequente síntese de ATP. Para compensar essa liberação de prótons, a célula aumenta o consumo de oxigênio para manter a síntese de ATP pela célula (JANSKÝ, 1995; LOWELL & SPIEGELMAN, 2000; RIBEIRO *et al*, 2001; BACHMAN *et al*, 2002; BOSS *et al*, 1998; LEAVER & PAPPONI, 2002; NICHOLLS & LOCKE, 1984; NICHOLLS & RIAL, 1999; SKULACHEV, 1998).

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 meciem os efeitos sistêmicos da NE, tais como ativação parcial da lipólise, regulação do fluxo sanguíneo e da proliferação celular (ATGIÉ, D'ALLAIRE & BUKOWIECKI, 1997).

Vários mecanismos moleculares têm sido envolvidos na dessensibilização desses receptores. 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 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 & MALBON, 1988).

O receptor β_1 tem poucos sítios de fosforilação e não apresentam dois resíduos de tirosina, como implicados na *downregulation* do β_2 (VALIQUETTE *et al*, 1990), sendo, portanto, menos sensível à dessensibilização do que o β_2 . Quando camundongos são tratados com dieta hipercalórica por um longo período, ocorre intensa estimulação simpática, o que faria

com que os receptores adrenérgicos 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 tecidos pode variar durante diferentes condições fisiológicas como composição da dieta, a idade dos animais e a exposição ao frio, desempenhando papel fundamental no balanço energético a partir do controle de diversos processos, tais como a lipólise, a lipogênese, a glicogenólise e a gliconeogênese (HIMM-HAGEN, 1990).

As funções específicas de cada uma das isoformas dos receptores adrenérgicos β no metabolismo lipídico e no desenvolvimento da obesidade ainda não foram totalmente elucidadas.

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel do receptor adrenérgico β_1 no desenvolvimento da síndrome metabólica.

Determinar o papel do receptor adrenérgico β_1 no desenvolvimento da DHGNA.

2.1 Objetivos específicos

1) Determinar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DHGNA nos animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 , como metabolismo de ácidos graxos, triglicérides e colesterol, e homeostase glicêmica.

2) Estudar a determinação gênica envolvidas no desenvolvimento da DHGNA nos camundongos $KO\beta_1$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 10 camundongos machos que apresentaram nocaute para o receptor adrenérgico β_1 ($KO\beta_1^{-/-}$), doados pela Profa. Dra. Patrícia Chakur 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 10 camundongos machos da linhagem C57/BL6 para os animais $KO\beta_1^{-/-}$. 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. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie, com processo CEUA N° 060/10/2009.

Protocolo 1: Papel dos receptor adrenérgico β_1 no desenvolvimento da DHGNA induzida pela dieta e no desenvolvimento da obesidade.

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

C57 (n=5): animais selvagens da linhagem C57, tratados com dieta padrão (1,8Cal/g);

C57 Hiper (n=5): animais selvagens da linhagem C57, tratados com dieta hipercalórica (7,52Cal/g);

$KO\beta_1$ (n=5): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_1 da linhagem C57, tratados com dieta padrão (1,8Cal/g);

$KO\beta_1$ Hiper (n=5): animais com nocaute para receptor adrenérgico β_1 da linhagem C57, tratados com dieta hipercalórica (7,52Cal/g);

Os animais foram alimentados com ração hipercalórica durante 45 dias, tempo necessário para tornarem-se obesos. Durante esse período, mediram-se diariamente o peso corporal e o consumo de ração. Além disso, realizaram-se testes de tolerância à glicose e à insulina para traçar o perfil metabólico. Os animais foram mortos 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. Também foram retirados o fígado e o tecido adiposo epididimal, para posterior análise histológica, determinação de RNAm PCR em tempo real e Western Blotting.

3.2. Dieta hipercalórica

A dieta hipercalórica rica em gordura é produzida pela Rhostrer Ind. E Com. Ltda. e é constituída por 19,9% de proteína, 40% de gordura e 19% de carboidratos, totalizando 7,52Cal/g. A dieta padrão apresenta 1,8 Cal/g.

3.3. Teste de tolerância à glicose (IPGTT)

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).

3.4. Teste de tolerância à insulina (IPITT)

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).

3.5. 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.

3.6. 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.

3.7. Análise de RNAm por PCR em tempo real

A análise de RNAm extraído do fígado foi realizado com o auxílio da solução de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) (500µl), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop 2000c). 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 (3,0µg), utilizando-se o kit comercial SuperScrit™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR. Os ciclos utilizados foram: 5 min à 94°C (Hot Start); 30s à 94°C, 30s à 58°C e 45s à 72°C por 50 ciclos seguidos pelo protocolo de melting curve para verificar a especificidade da geração do fragmento amplificado. A expressão do gene foi determinada pelo método $\Delta \Delta C_t$, como descrita por Livak e Schmittgen (2001), e através do número de cópias.

A PCR em tempo real foi realizada com o auxílio do kit comercial QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia CA). O cDNA transcrito foi utilizado para a avaliação da expressão do RNAm dos seguintes genes por PCR em tempo real: GAPDH e ciclofilina B (Cyclo-B) usada como controle interno; SREBP-1c, ChREBP, ACL, ACC, FAS, SCD 1, PPAR γ , SORT 1, DGAT 2, MTTP, LDL-R, PCSK9, SREBP 2, LXR, TNF- α , Resistina e Adiponectina. As sequências dos primers utilizados são apresentadas na tabela 1.

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

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
Sortilin 1 - Sense	5'-CCCGGACTTCATCGCCAAG-3'
Sortilin 1 - Antisense	5'-ATGCTGGTGCCTATTGTTGGT-3'
PCSK9 - Sense	5'-TTGCCCATGTGGAGTACATT-3'
PCSK9 - Antisense	5'-GGGAGCGGTCTTCCTCTGT-3'
DGAT2 - Sense	5'-TTCCTGGCATAAGGCCCTATT-3'
DGAT2 - Antisense	5'-CGGAAGTTACCAGCCAACG-3'
Resistina - Sense	5'-ACAAGACTTCAACTCCCTGTTTC-3'
Resistina - Antisense	5'-CTGTCCAGCAATTTAAGCCAATG-3'
Adiponectina - Sense	5'-TGTTCTCTTAATCCTGCCCA-3'
Adiponectina - Antisense	5'-CCAACCTGCACAAGTTCCTT-3'
PPARA-Gama - Sense	5'-GGAAGACCACTCGCATTCCCTT-3'
PPARA-Gama - Antisense	5'-GTAATCAGCAACCATTGGGTCA-3'
LDL-R - Sense	5'-TCCAATCAATTCAGCTGTGG-3'
LDL-R - Antisense	5'-GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'
MTTP - Sense	5'-CTCTTGGCAGTGCTTTTTCTCT-3'
MTTP - Antisense	5'-GAGCTTGTATAGCCGCTCATT-3'
SREBP1-C - Sense	5'-AAGCAAATCACTGAAGGACCTGG-3'
SREBP1-C - Antisense	5'-AAAGACAAGGGGCTACTCTGGGAG-3'
SREBP2 - Sense	5'-CCGCTCTCGAATCCTTAT-3'
SREBP2 - Antisense	5'-CAGCACCTGACTCCAGTGAC-3'
ChREBP - Sense	5'-CCTCACTTCACTGTGCCTCA-3'
ChREBP - Antisense	5'-ACAGGGGTTGTTGTCTCTGG-3'
GAPDH - Sense	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
GAPDH - Antisense	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'
TNF - α - Sense	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
TNF - α - Antisense	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'
FAS - Sense	5' AAGTTGCCCGAGTCAGAGAACC 3'
FAS - Antisense	5' ATCCATAGAGCCCAGCCTTCCATC 3'
SCD1 - Sense	5' GCGATACACTCTGGTGCTCA 3'
SCD1 - Antisense	5' CCCAGGGAAACCAGGATATT 3'
ACS - Sense	5' GGAACTACAGGCAACCCCAAAG 3'
ACS - Antisense	5' CTTGAGGTCGTCCATAAGCAGC 3'
LXRalpha - Sense	5' TGGGCTCCGAATCCTCTTAGA 3'
LXRalpha - Antisense	5' TGGTCCTCAAATAAGATCCTTGG 3'

Cyclophilin B- Sense	5' ATGTGGTTTTTCGGCAAAGTT 3'
Cyclophilin B - Antisense	5' TGACATCCTTCAGTGGCTTG 3'
ACC- sense	5' AAGTCCTTGGTCGGGAAGTATACA 3
ACC - antisense	5' ACTCCCTCAAAGTCATCACAACA 3'

3.8. Western Blotting

Para a identificação de determinadas proteínas pelo método de Western Blot, os tecidos hepáticos foram adequadamente processados e submetidos à dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, com o auxílio do equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000c, em comprimento de onda de 560 nm. Em seguida, as amostras foram preparadas a partir da solubilização em Tampão de Amostra (SDS 2%; glicerol 10%; TRIS Base 0,0625 M pH 6,8; bromofenol blue 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%) e submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Ao término da corrida eletroforética, com o auxílio de um equipamento de transferência em sistema semi-seco, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon, Millipore Co, Bedford MA) em um campo elétrico. Após a etapa de transferência, realizou-se a incubação da membrana com a solução bloqueadora composta de 5% de Albumina Bovina diluída em TBST (Tris-Buffered Saline - Tween 20), por cerca de 1 hora seguido de incubação com o anticorpo primário, correspondente à proteína de interesse, diluído de acordo com as instruções apresentadas pelo fabricante e submetido à refrigeração por aproximadamente 12 horas. As proteínas analisadas foram: Proteína Microsomal de Transferência de Triglicerídeos (MTTP) (Santa Cruz Biotechnology), Receptor de Lipoproteína de Densidade Baixa(LDL-R) (Santa Cruz Biotechnology) e Diacil-glicerol Aciltransferase 2 (DGAT2) (ABCAM[®]).

Após tal período, a membrana foi submetida a sucessivas lavagens com TBST e, posteriormente, incubada com uma solução do anticorpo secundário por aproximadamente 1 hora. Em seguida, iniciou-se o processo de detecção da proteína de interesse por meio do processo de revelação, o qual foi realizado em câmara escura e envolveu a incubação da membrana em soluções contendo reagentes de quimioluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific), os quais reagem com a peroxidase conjugada ao

anticorpo secundário (HRP) e promovem a produção de luminescência proporcionalmente à quantidade da proteína de interesse, possibilitando a detecção desta.

3.9. Histologia

Depois da dissecação cuidadosa, os tecidos hepático e adiposo foram imersos em uma solução *buffer* de formol e fixados por 24 horas. Os tecidos incorporados na parafina foram seccionados e processados. As amostras foram coradas por Masson ou por Hematoxilina/Eosina (HE), e em seguida foram analisadas. A área do adipócito branco foi estimada por análise de imagens tiradas em amplificação de 200X. Imagens foram impressas e cortadas, e a área de pelo menos 40 adipócitos por animal foi estimado.

Análises Estatísticas

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos foi testada pela Anova, 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 EP.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da composição corporal e desenvolvimento da obesidade

Com objetivo de determinar o papel do receptor adrenérgico β_1 na regulação do peso corporal, os animais $KO\beta_1$ foram tratados com dieta hipercalórica por 45 dias.

Como podemos notar na Figura 2A, os animais de todos os grupos estudados apresentavam peso corporal similar no início do experimento. Ao longo do tratamento, fica evidente que o tratamento com dieta hipercalórica induziu um maior ganho de peso tanto nos grupos $KO\beta_1$ Hiper quanto C57 Hiper (Figura 2B). No entanto, os animais pertencentes ao grupo $KO\beta_1$ Hiper ganharam significativamente mais peso assim como exibiram aumento dos adipócitos brancos quando comparados com os demais grupos (Figura 3).

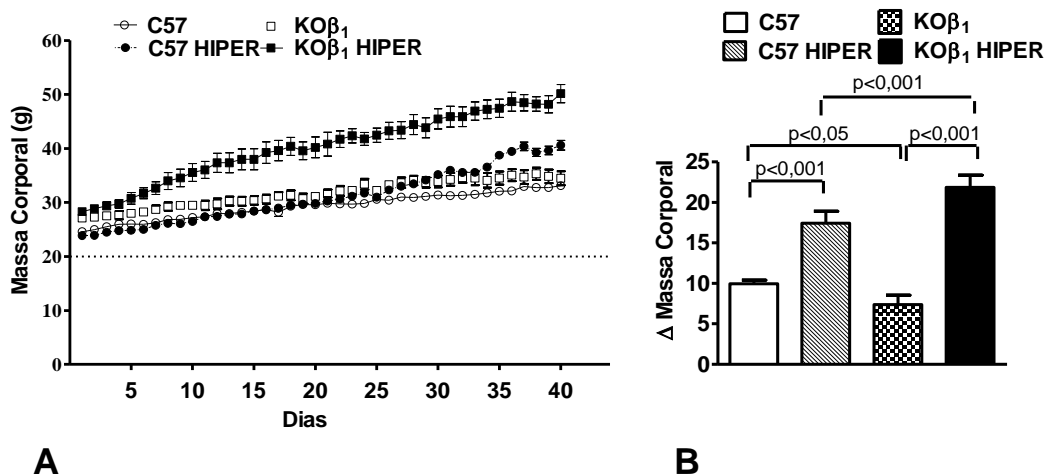


Figura 2. A) Peso Corporal de camundongos $KO\beta_1$ e C57 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. ($KO\beta_1$ Hiper, $p<0,001$); B) Δ Peso corporal dos camundongos C57 e camundongos $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão ou hipercalórica durante 45 dias. Os valores estão expressos como média \pm EP.

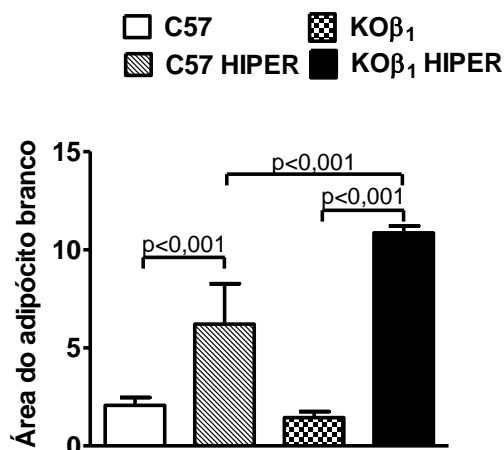


Figura 3. Área estimada do adipócito epididimal individual; 40 células de cada grupo foram analisadas. Os valores estão expressos como média ± EP.

Para confirmar que os animais tratados com dieta hipercalórica estavam realmente ingerindo mais calorias, nós mensuramos a ingestão alimentar. Os camundongos tratados com dieta padrão e tratados com dieta hipercalórica apresentaram consumo alimentar similar, como podemos observar na Figura 4A. 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 7.52Cal/g de calorias contra 1,8cal/g da dieta padrão (Figura 4B).

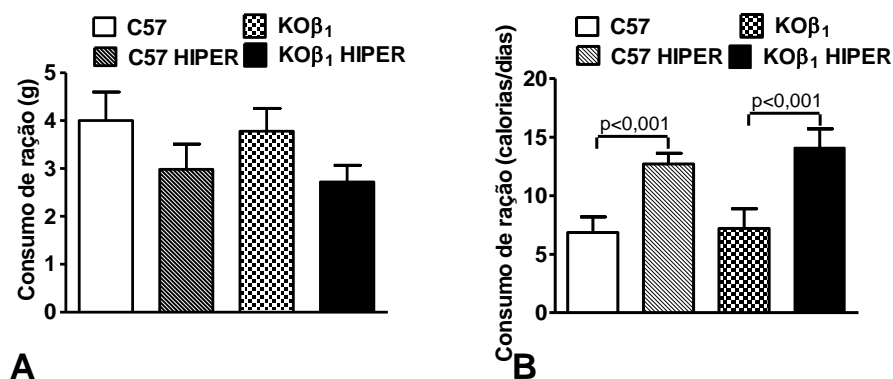


Figura 4.A) Consumo de ração diário dos camundongos C57 e camundongos KOβ₁ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica ; B) Consumo de calorias diário dos camundongos C57 e camundongos KOβ₁ durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica. Os valores estão expressos como média ± EP.

4.2. Papel do receptor adrenérgico β_1 no metabolismo

A fim de compreender melhor os efeitos da dieta hipercalórica sobre o metabolismo dos animais com nocaute para o receptor β_1 , nós medimos a resposta glicêmica frente a uma sobrecarga de glicose (GTT) e frente a uma sobrecarga de insulina (ITT).

4.2.1. Homeostase da Glicose

A glicemia de jejum e a tolerância à glicose foram semelhantes entre os animais C57 e $KO\beta_1$ alimentados com a ração padrão (Figura 5A e 5B). O tratamento com ração hipercalórica induziu hiperglicemia de jejum e intolerância à glicose em ambos os grupos animais, porém mais intensamente nos camundongos $KO\beta_1$ (Figura 5A e 5B). A sensibilidade a insulina foi significativamente reduzida nos animais $KO\beta_1$ independente da ingestão calórica, quando comparado com os animais selvagens.

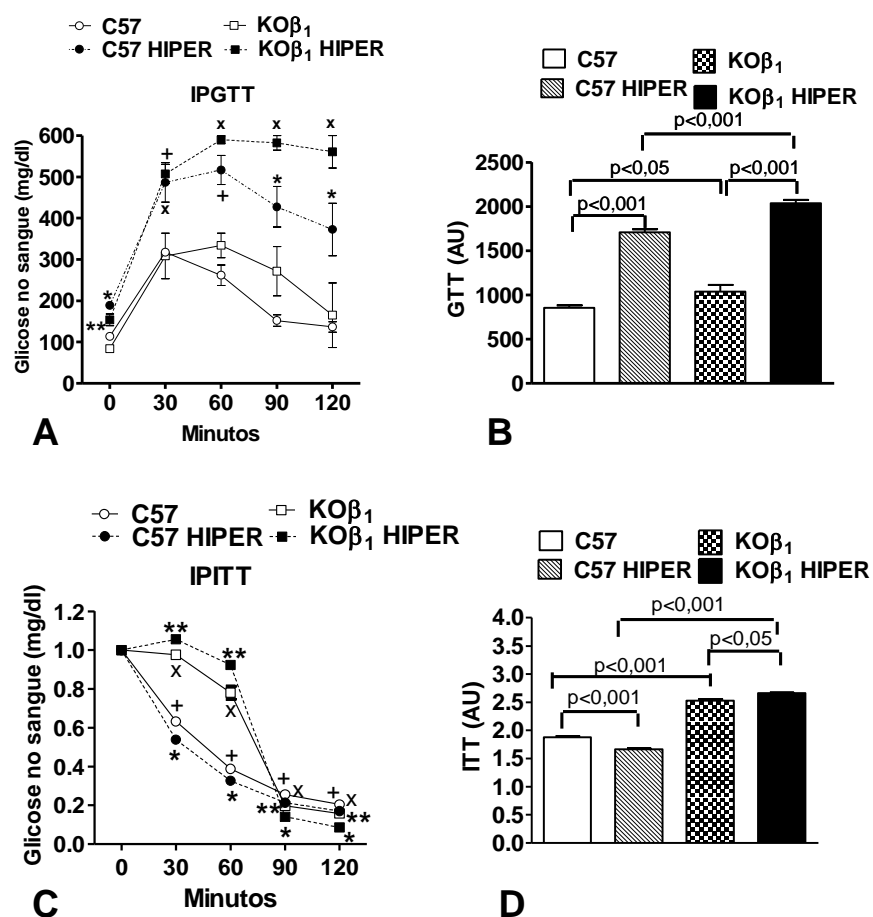


Figura 5. A) Teste de tolerância à glicose (IPGTT): dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medida da glicemia no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. B) Área sob a curva do GTT, em animais tratados com dieta padrão e dieta hipercalórica. C) Teste de tolerância à insulina (IPITT): dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica. Medida da glicemia no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. D) Área sob a curva do ITT, em animais tratados com dieta padrão e dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm EP. A) *P<0.05 vs C57, **P<0.05 vs KO β_1 , +P<0.001 vs C57, xP<0.001 vs KO β_1 ; C) *P<0.01 vs. C57; **P<0.01 vs KO β_1 ; xP<0.01 vs C57. Os valores estão expressos como média \pm EP.

4.2.2. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides nos camundongos KO β_1

Os níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos foram mensurados a fim de se avaliar o metabolismo de lipídios nos animais KO β_1 (Tabela 2). Camundongos KO β_1 não exibiram mudanças no colesterol plasmático ou nos níveis de triglicérides quando tratados com dieta padrão. Entretanto, quando alimentados com dieta hipercalórica, os camundongos KO β_1

exibiram uma elevação muito maior no colesterol plasmático e nos níveis de triglicérides, comparado com os camundongos C57.

Tabela 2. Ausência do receptor adrenérgico β_1 no metabolismo lipídico de animais tratados com dieta padrão ou dieta hipercalórica. Os valores estão expressos como média \pm EP (n=5).

Grupos	C57	C57 HIPER	KO β_1	KO β_1 HIPER
Colesterol	91.5 \pm 9.8	158.9 \pm 37.8 ^a	82.3 \pm 15.7	185.7 \pm 8.9 ^b
Triglicérides	100.1 \pm 8.1	163.7 \pm 5.1 ^a	107.2 \pm 9.1	203.9 \pm 12.1 ^{b,c}
^a P< 0.001 vs C57 ^b P< 0.01 vs KO β_1 ^c P<0.001 vs C57 HIPER				

4.3. Histologia Hepática

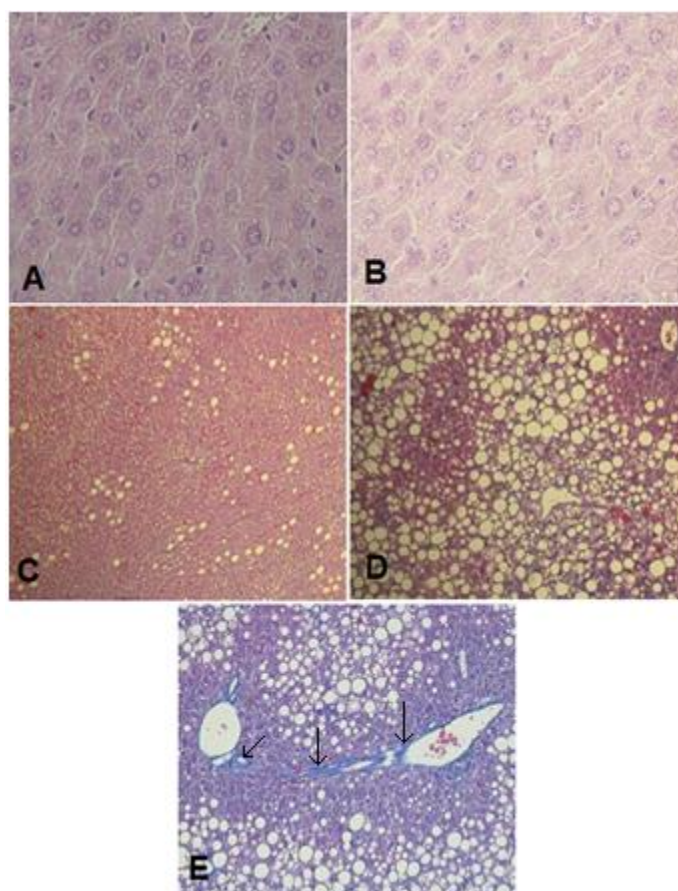


Figura 6. Histologia do fígado de camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercalórica.. A) C57 corado com HE; B) KO β_1 corado com HE; C) C57 HIPER corado com Masson; D) e E) KO β_1 HIPER corado com Masson. Amplificação 180 X.

A DHGNA pode ser determinada a partir da observação dos hepatócitos por microscopia óptica (NEUSCHWANDER-TETRI & CALDWELL, 2003). Como podemos observar na figura 6, verificamos que não existem diferenças na histologia hepática dos camundongos C57 e KO β_1 tratados com dieta padrão, apresentando fígado histologicamente saudável, sem presença de fibrose ou esteatose macrovesicular característicos da DHGNA. Fica evidente que o uso da ração hipercalórica induz esteatose hepática em animais C57 e KO β_1 , porém a presença de esteatose macrovesicular foi mais intensa nos animais KO β_1 do que nos animais C57. Nos animais KO β_1 , a DHGNA evoluiu para EHNA com presença de fibrose e ponte entre veias centro lobulares (Figura 6E), decorrente do acúmulo de colágeno nos

camundongos $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica. Assim, analisamos as expressões de RNA mensageiro dos camundongos $KO\beta_1$ relacionados ao perfil lipídico.

4.4. Determinação da expressão gênica nos camundongos $KO\beta_1$

Alguns fatores de transcrição exercem papel fundamental no metabolismo lipídico, regulando a síntese de outras proteínas relacionadas à lipogênese, tais como o SREBP-1c e o ChREBP. O tratamento com dieta hipercalórica não aumentou os níveis de RNA mensageiro para os genes dos fatores de transcrição SREBP-1c e ChREBP nos animais C57. No entanto, o mesmo tratamento elevou significativamente esses níveis nos animais $KO\beta_1$ (Figura 7A e B).

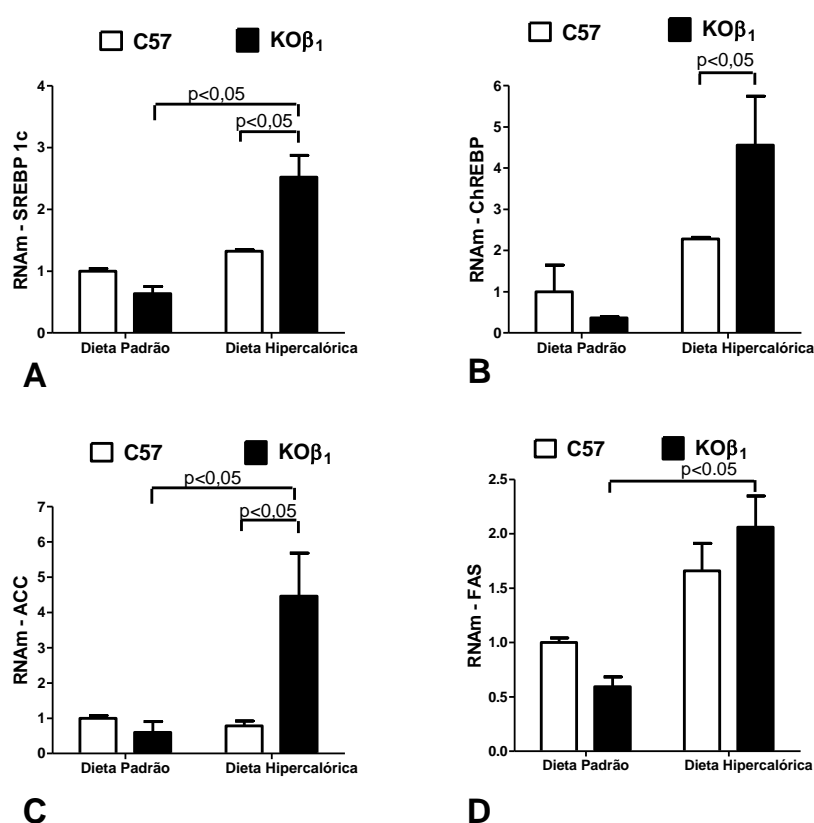


Figura 7. A) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-1c de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene ChREBP de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene ACC de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. D) Determinação do nível de RNAm do gene FAS de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. Os valores estão representados com Média \pm EP.

Tanto o SREBP-1c quanto o ChREBP desempenham papel essencial no processo de síntese e ativação de outras enzimas relacionadas à lipogênese, tais como a ACC e a FAS que participam da síntese de ácidos graxos, e a SCD 1 que dessatura o ácido graxo para sua conversão em triglicérides. Como podemos observar nas Figuras 7C, 7D e 8A, a dieta hipercalórica aumentou significativamente os níveis de RNAm para essas enzimas no fígado dos animais KO β ₁. Esse aumento não foi observado nos animais selvagens. Esses resultados mostram que o processo de lipogênese hepática encontra-se estimulado nos animais KO β ₁ tratados com dieta hipercalórica.

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) também regula acúmulo de ácidos graxos e o metabolismo de glicose, sendo um importante marcador de esteatose hepática (BROWNING & HORTON, 2004). Camundongos KO β ₁ tratados com dieta hipercalórica aumentaram significativamente os níveis de RNAm para esse receptor no fígado, em comparação com os demais grupos (Figura 8B).

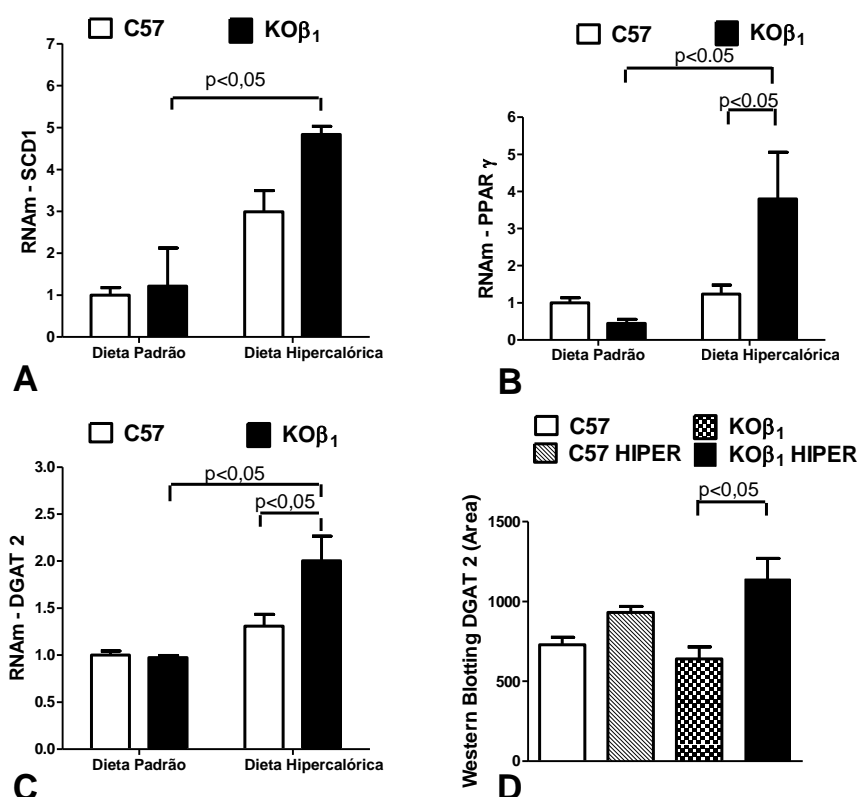


Figura 8. A) Determinação do nível de RNAm do gene SCD1 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene PPAR γ de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene DGAT 2 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. D) Determinação da expressão da proteína DGAT2 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por Western Blotting. Os valores estão representados com Média \pm EP.

A enzima DGAT2 participa da biossíntese de triglicérides no hepatócito a partir dos ácidos graxos (CHEOL *et al.*, 2007). Camundongos KO β_1 não apresentaram mudanças na expressão de RNAm (Figura 8C) ou da proteína (Figura 8D), quando tratados em dieta padrão. Em contrapartida, observamos que o tratamento com dieta hipercalórica aumentou significativamente a expressão do gene nos camundongos KO β_1 , comparado com os demais grupos.

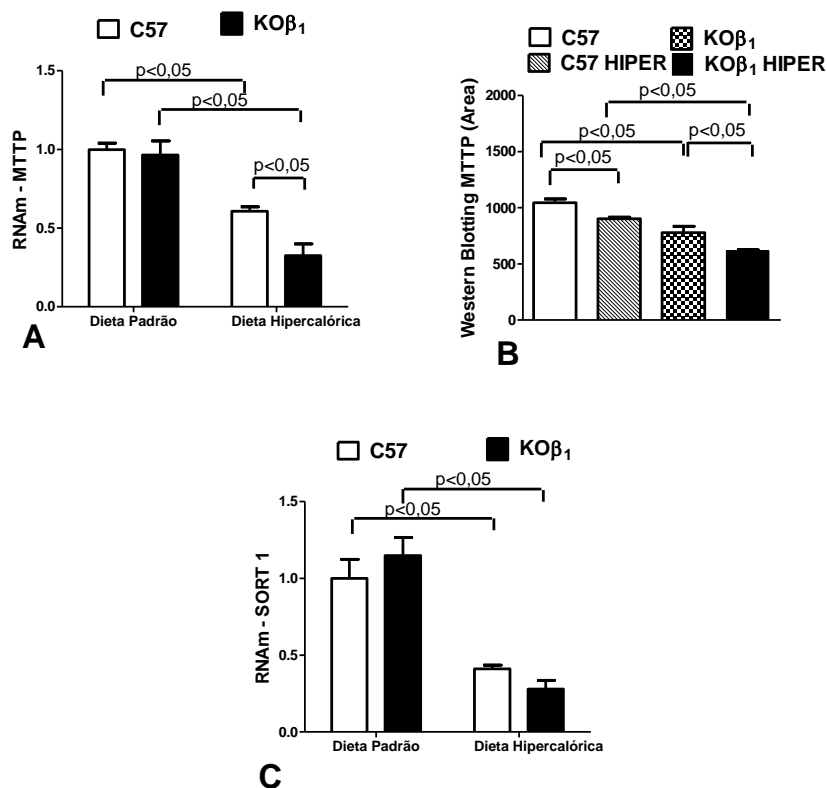


Figura 9. A) Determinação do nível de RNAm do gene MTTP de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação da expressão da proteína MTTP de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por Western Blotting. C) Determinação do nível de RNAm do gene SORT1 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. Os valores estão representados com Média \pm EP.

O acúmulo de triglicérides no fígado é considerado o principal gatilho para o desenvolvimento da DHGNA. A redução de expressão de proteínas relacionadas à síntese e exportação de lipoproteínas VLDL para o plasma resulta na formação de esteatose hepática. A partir da análise da expressão gênica dos receptores Sortilin 1, fundamentais na síntese e exportação de VLDL, podemos observar que os animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 não apresentaram diferenças na sua expressão quando comparados com os camundongos C57, pois o tratamento com dieta hipercalórica reduziu a expressão de forma significativa em ambos os grupos (Figura 9C).

Outra proteína associada à formação da molécula de VLDL no fígado é a MTTP. Nós observamos que a expressão de RNAm da MTTP foi semelhante entre os animais C57 e KO β_1 , tratados com ração padrão (Figura 9A). O tratamento com ração hipercalórica promoveu uma redução significativa nos níveis de RNAm em ambos os grupos, com uma redução mais

acentuada nos camundongos $KO\beta_1$. Surpreendentemente o Western Blotting da MTTP mostrou que camundongos $KO\beta_1$ apresentavam níveis significativamente reduzidos na expressão da proteína, em comparação aos C57 (Figura 9B). A redução de expressão da proteína MTTP nos animais tratados com dieta em gordura pode ser devido a metilação induzida pela ração hipercalórica (CHANG *et al.*, 2010), mas o receptor adrenérgico β_1 parece influenciar diretamente a expressão dessa proteína, uma vez que os animais $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão também apresentaram redução da MTTP.

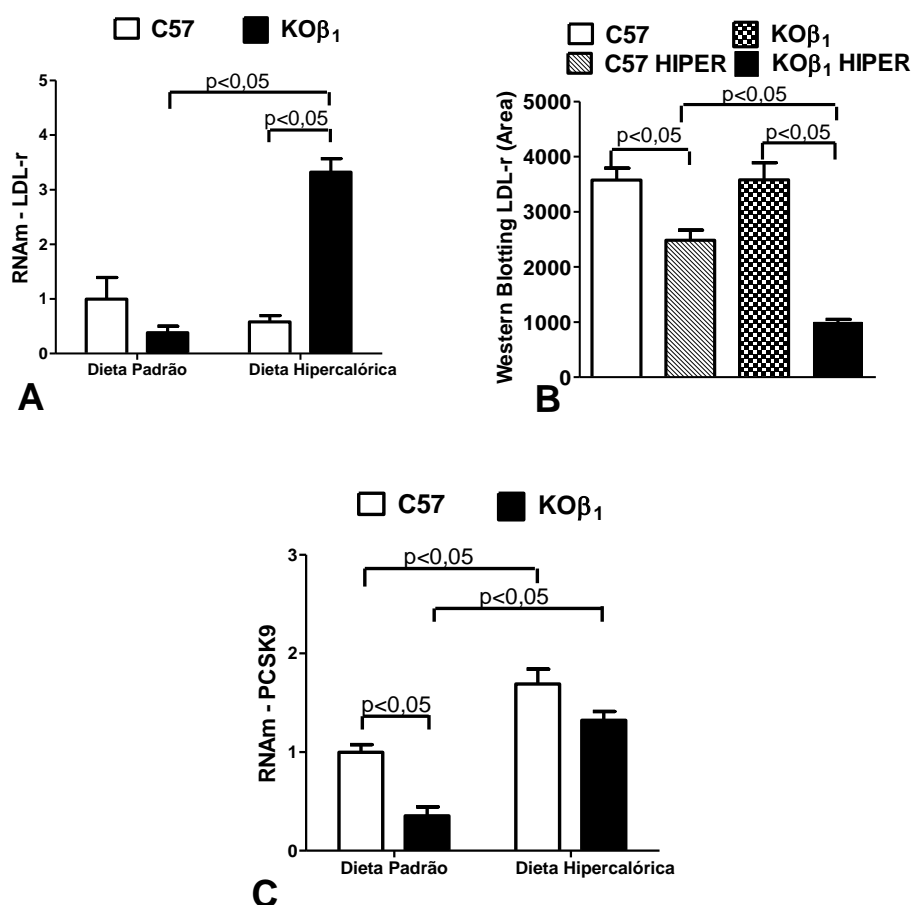


Figura 10. A) Determinação do nível de RNAm do gene LDL-r de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação da expressão da proteína LDL-r de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por Western Blotting. C) Determinação do nível de RNAm do gene PCSK9 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. Os valores estão representados com Média \pm EP.

Os receptores para LDL são responsáveis pela absorção de moléculas de LDL. Em animais obesos selvagens ocorre uma redução na expressão dessa proteína assim como nos seus níveis de RNAm. Como podemos observar na Figura 10 A. Camundongos $KO\beta_1$ não exibiram

mudanças nos níveis de RNAm quando tratados com dieta padrão. Entretanto, quando alimentados com dieta hipercalórica, os camundongos KO β_1 exibiram um aumento significativo na expressão desse gene, comparado com os camundongos C57.

A análise da expressão de LDL-R por Western Blotting evidenciou resultados diferentes dos apresentados anteriormente por qPCR. É evidente que o uso da ração hipercalórica reduziu os níveis de expressão protéica nos camundongos KO β_1 e C57, porém essa redução foi mais marcante nos animais desprovidos do receptor β_1 (Figura 10 B).

Dentre os mecanismos regulatórios da expressão de LDL-R, pode-se destacar a enzima PCSK9, responsável pela degradação desses receptores, resultando em um acúmulo de LDL no plasma. Fica evidente que o consumo de ração hipercalórica aumentou de forma acentuada a expressão do gene PCSK9 nos camundongos C57 e KO β_1 . Entretanto, quando alimentados com dieta padrão, os camundongos KO β_1 exibiram uma redução significativa nos níveis de RNAm (Figura 10 C).

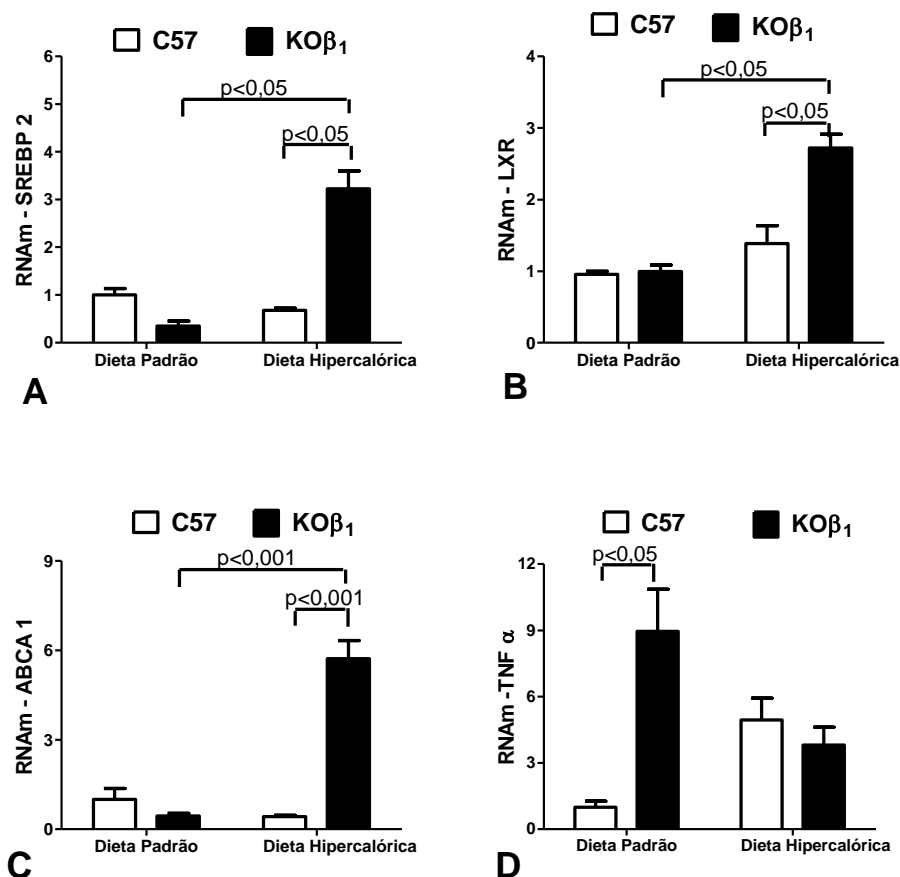


Figura 11. A) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP 2 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene LXR de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene ABCA 1 de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. D) Determinação do nível de RNAm do gene TNF - α de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. Os valores estão representados com Média \pm EP.

Três importantes genes envolvidos no metabolismo do colesterol (SREBP-2, LXR e ABCA1) no hepatócito foram analisados a fim de se determinar a influência do receptor adrenérgico β_1 no processo de síntese, captura, catabolismo e exportação de colesterol. O fator de transcrição SREBP-2 induz a captura e biossíntese do colesterol no fígado (BROWN e GOLDSTEIN, 1997). O LXR promove o efluxo, transporte e excreção de colesterol dos hepatócitos (PEET *et al.*, 1998). O ABCA1 medeia o transporte da lipoproteína HDL na via de transporte de colesterol de tecidos periféricos para o fígado, (ZHAO C e DAHLMAN-WRIGHT K, 2010). Animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica exibiram um aumento significativo na expressão desses genes em contraste com os animais selvagens (Figura 11A, 11B, 11C).

Estudos anteriores demonstram que o colesterol é um importante fator para a progressão de inflamação hepática (WOUTERS *et al.*, 2008). A EHNA é caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF – α (Figura 11D). Esta citocina é superexpressa em fígado de camundongos obesos e medeia a resistência a insulina (HOTAMISLIGIL, 2003; UYSAL *et al.*, 1997). Curiosamente, o grupo KO β_1 tratado com dieta padrão apresentou uma expressão significativamente elevada em relação ao grupo C57 tratado com dieta padrão.

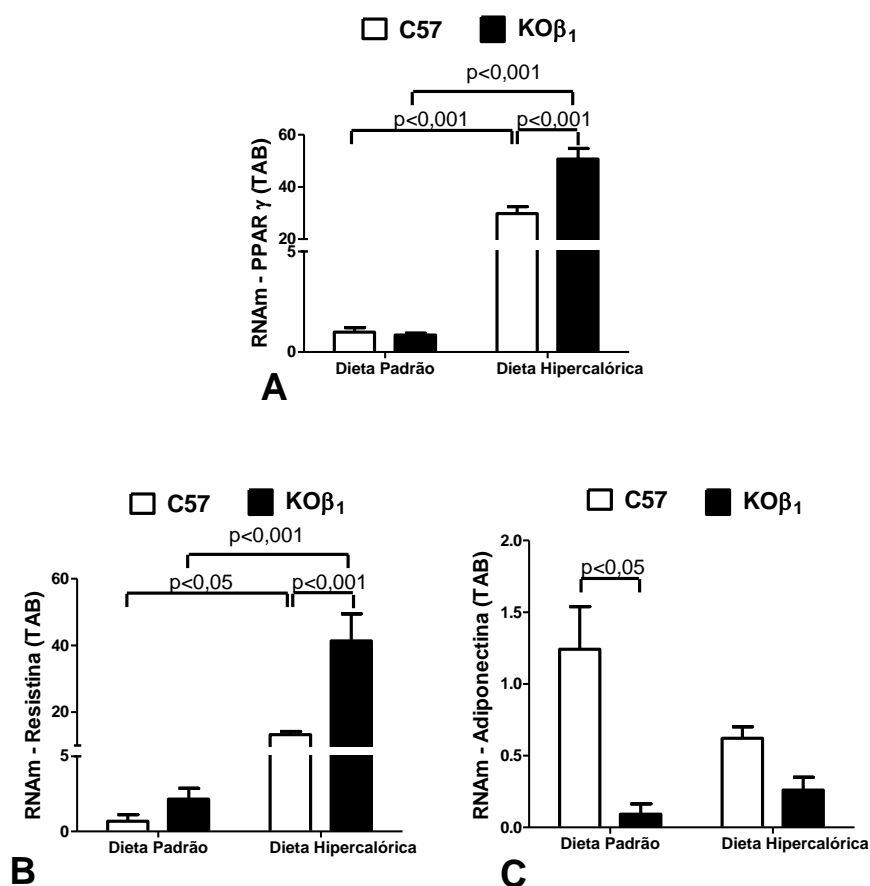


Figura 12. A) Determinação do nível de RNAm do gene PPAR γ (Tecido Adiposo Branco) de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene Resistina (Tecido Adiposo Branco) de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene Adiponectina (Tecido Adiposo Branco) de animais tratados com dieta hipercalórica e com dieta padrão, por PCR em tempo real. Os valores estão representados com Média \pm EP.

Por fim foram analisado os níveis de RNAm dos genes PPAR γ , Resistina e Adiponectina no tecido adiposo branco. Este tecido vem ganhando destaque nos últimos anos por

secretar substâncias de importante efeito biológico, consolidando a ideia de este órgão dinâmico estar envolvido em uma variedade de processos metabólicos, como o metabolismo lipídico.

O PPAR γ no tecido adiposo branco estimula a transcrição de diversos genes relacionada à adipogênese. A Resistina, assim como o TNF – α , é uma proteína pro-inflamatória que reduz a sensibilidade à insulina. Por outro lado, a adiponectina age como fator protetor de doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade insulínica (FONSECA-ALANIZ, 2006).

Os nossos resultados mostram que o tratamento com ração hipercalórica aumentou os níveis de RNAm do PPAR γ e da Resistina em ambos os grupos animais, porém mais intensamente nos camundongos KO β_1 (Figura 12A e 12B).

É interessante notar que o RNAm para a adiponectina apresentou-se significativamente reduzidos nos animais KO β_1 quando comparados aos animais selvagens quando alimentados com ração padrão. Esses resultados sugerem que o receptor adrenérgico β_1 parece influenciar diretamente a expressão dessa proteína. O tratamento com dieta hipercalórica reduziu o RNAm para essa proteína em animais selvagens, mas não em animais mutantes, (Figura 12C).

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 do metabolismo energético induzida pela dieta. De fato, animais que apresentam nocaute para os três subtipos: β_1 , β_2 e β_3 (TKO) desenvolvem obesidade além de outros parâmetros presente na síndrome metabólica. 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, e consequentemente lipídico. 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 & DANFORTH, 1996).

Neste sentido, modelos de nocaute para apenas uma das isoformas constitui ferramentas importantes na compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção do metabolismo lipídico e dos estoques energéticos.

Os nossos resultados mostraram que o receptor adrenérgico β_1 apresenta papel fundamental na regulação do metabolismo energético, uma vez que a ausência desta isoforma, levou ao desenvolvimento de obesidade severa em animais tratados com dieta hipercalórica. Além disso, os camundongos $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica mostraram alterações significativas nos parâmetros da síndrome metabólica como hiperglicemia, hipercolesterolemia, e hipertrigliceridemia, além de aumentarem o depósito de gordura no fígado e desenvolverem DHGNA.

De fato, camundongos $KO\beta_1$ apresentam o BAT termogenicamente inativo, já que o receptor adrenérgico β_1 apresenta função na mediação da termogênese facultativa, ativada através do SNS, sendo fundamental na regulação do gasto energético (UETA *et al*, 2012). Assumindo que o BAT é o principal sitio da termogênese facultativa, é seguro afirmar que a inativação do BAT contribui significativamente com o desenvolvimento da obesidade observada nesses animais. .

O acúmulo de gorduras no fígado é considerado o principal desencadeador do desenvolvimento de DHGNA e de alterações nas diversas enzimas e fatores de transcrição relacionados ao metabolismo lipídico. Assim, neste estudo avaliamos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DHGNA no modelo de camundongos $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica, com foco principal no metabolismo de gorduras pelo fígado.

Sabe-se que a adoção de dietas com diferentes conteúdos calóricos pode influenciar significativamente a expressão de fatores de transcrição que regulam o metabolismo hepático de gorduras, dentre os quais se destacam o SREBP-1c e o ChREBP que são responsivos aos níveis de insulina e de glicose, respectivamente (JUMP *et al.*, 2005).

O fator de transcrição SREBP-1c ativa diversas enzimas relacionadas à lipogênese, aumentando a síntese de ácidos graxos. A expressão elevada de SREBP1-c no tecido hepático, portanto, provoca o aumento na lipogênese e o desenvolvimento de esteatose hepática (FON TACER e ROZMAN, 2011). Em adição ao SREBP-1c, o ChREBP simultaneamente ativa a lipogênese através do piruvato quinase do fígado, regulador chave da glicólise e de todos os genes lipogênicos (UYED, YAMASHITA e KAWAGUCHI, 2002; YAMASHITA *et al.*, 2001). Dessa forma, a alta expressão de RNAm dos fatores de transcrição SREBP-1c, o ChREBP e o aumento das outras enzimas lipogênicas, tais como ACC, FASN e SCD-1 deve estar envolvida com a elevada esteatose hepática no fígado de animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica.

O acúmulo de ácidos graxos e estimulação de genes relacionados à adipogênese são regulados também pelos receptores nucleares $PPAR\gamma$. Estudos anteriores mostraram que animais tratados com ração hipercalórica apresentavam esteatose hepática, com o aumento significativo de RNAm de $PPAR\gamma$ (GAVRILOVA *et al.*, 2003; BROWNING e HORTON, 2004). Em concordância com esses resultados, animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica apresentaram um aumento significativo de RNAm de $PPAR\gamma$ em comparação com os animais C57 tratados com dieta hipercalórica.

A isoforma β_1 parece ter papel relevante no metabolismo de triglicérides, uma vez que animais $KO\beta_1$ tratados com dieta rica em gordura, apresentaram trigliceridemia significativamente mais alta em comparação com os animais C57. A DGAT 2 é uma enzima responsável pela etapa final de síntese de triglicérides no fígado. Os nossos resultados mostraram que animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica apresentaram um aumento significativo no RNAm da DGAT 2, o que também contribui para o acúmulo de gordura no

fígado. De fato Yamaguchi *et al.*(2007) mostraram que inibindo a DGAT 2, a síntese de triglicérides diminui com consequente melhora esteatose hepática em camundongos obesos com EHNA.

Sabe-se que na síndrome metabólica a homeostase lipídica encontra-se corrompida e nesta condição o fígado aumenta a secreção de VLDL no plasma e, conseqüentemente, o nível de triglicérides plasmático também se eleva (ADIELS *et al.*,2008). Surpreendentemente, nossos resultados mostraram que apesar dos níveis elevados de triglicérides no plasma, a síntese e exportação de VLDL do fígado estavam reduzidas nos animais KO β_1 , já que os níveis da expressão da proteína MTTP estavam significativamente diminuídos quando comparados com o grupo C57. A ausência da isoforma β_1 em conjunto com o uso da ração hipercalórica, que implica na metilação do RNAm para MTTP (CHANG *et al.*, 2010), explica o acúmulo agravado de triglicérides no fígado, desencadeando o desenvolvimento da DHGNA.

Os processos de exportação de lipoproteínas no tecido hepático também se encontraram alterados nos animais estudados. Os receptores Sortilin 1 atuam na síntese e exportação de VLDL e na regulação dos níveis plasmáticos de LDL (FON TACER & ROZMAN, 2011). Os resultados da expressão do gene SORT1 sugerem que os fatores nutricionais interferem diretamente na expressão gênica desses receptores. Os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram diminuição acentuada da expressão do receptor quando comparado aos tratados com dieta padrão, evidenciando que a exportação de triglicérides esteja comprometida nos animais tratados com dieta hipercalórica, explicando o acúmulo de triglicérides nos fígados desses camundongos.

Portanto, podemos concluir até o momento que no modelo de obesidade estudado observamos aumento na síntese de triglicérides e redução na síntese e na exportação de VLDL no fígado desses animais, constituindo no estímulo inicial para o desenvolvimento da EHNA.

O receptor β_1 apresenta papel importante também na manutenção dos níveis de colesterol plasmático total, uma vez que a ausência desta isoforma eleva significativamente este parâmetro nos animais KO β_1 quando tratados com dieta hipercalórica. 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).

As lipoproteínas são fonte de colesterol para o fígado (GINSBERG, ZHANG & HERNANDEZ-ONO, 2005). O nível de LDL do plasma é determinado pela relação entre sua

produção e remoção do plasma pelos hepatócitos por meio dos receptores para LDL. Nossos resultados mostraram que os níveis de RNAm do LDL-R estão significativamente aumentados nos animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica. Em contrapartida, a determinação da expressão de LDL-R por Western Blotting mostrou que os camundongos KO β_1 tratados com dieta hipercalórica reduziram significativamente a expressão da proteína em relação aos demais grupos. Mecanismos de retroalimentação do colesterol celular influenciam os níveis de LDL-R presentes nas membranas dos hepatócitos. O aumento dos níveis de colesterol hepático promove a diminuição da expressão de LDL-R. Nossos resultados mostraram que os animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica apresentavam nível de colesterol plasmático significativamente aumentado, estando de acordo com os resultados obtidos pelo Western Blotting.

Apesar de controverso com os resultados do qPCR, os resultados da expressão proteica de LDL-R podem ser explicados pelos mecanismos de regulação dos receptores LDL a nível proteico. Os LDL-R podem sofrer atuação da proteína PCSK9 que promove a degradação dos receptores de LDL ocasionando o aumento dos níveis de LDL no plasma (FON TACER & ROZMAN, 2011). De fato, camundongos KO β_1 tratados com dieta hipercalórica apresentaram um aumento significativo na expressão de RNAm de PCSK9.

Nossos resultados sugerem que o receptor adrenérgico β_1 pode exercer influência direta na regulação dos níveis de LDL plasmático, já que os animais KO β_1 tratados com dieta padrão apresentaram uma redução significativa na expressão de RNAm de PCSK9 em comparação com o grupo C57. Estudos anteriores demonstraram que deficiência na PCSK9 confere resistência a esteatose hepática (ZAID *et al.*, 2008). Em linha com esses estudos, nossos resultados mostraram que os animais KO β_1 tratados com dieta padrão não apresentavam esteatose hepática na histologia.

Ainda na via de colesterol os reguladores SREBP-2 e LXR foram estudados. Surpreendentemente, nossos resultados mostraram que ambos os genes apresentavam uma expressão de RNAm elevada nos animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica. Estudos anteriores mostraram que a ativação farmacológica do LXR também induz esteatose hepática e promove secreção de partículas de VLDL pelo fígado. A saber, o LXR ativa o fator SREBP-1c de maneira independente e promove lipogênese, além de ativa outros fatores lipogênicos como o ChREBP. (REPA *et al.*, 2000; SCHULTZ *et al.*, 2000; CHA e REPA, 2007). De acordo com esses estudos, além da insulina e da glicose, os animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica

apresentavam também a alta expressão de RNAm do LXR como indutor de fatores lipogênicos, favorecendo a elevada síntese de ácidos graxos. O LXR também exerce controle negativo sobre o receptor de LDL, mediando a captura de colesterol e induzindo a expressão da Idol, proteína degradadora induzível de LDLR (ZELCER *et al.*, 2009). A alta expressão de RNAm de LXR pode ser outro fator influente na degradação da proteína de LDL-R observada nos animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica.

Sabe-se que quando os níveis intracelulares de colesterol caem, o SREBP-2 induz a biossíntese e captura de lipoproteínas do plasma (BROWN e GOLDSTEIN, 1997). Em contraste, o excesso de colesterol extracelular inibe o SREBP-2 e ativa o LXR, que promove a exportação e o transporte de colesterol do fígado para o plasma (PEET, JANOWSKI e MANGELSDORF, 1998). Assim, nos nossos animais o RNAm para o SREBP-2 e para o LXR estavam aumentados e, portanto, a via de síntese e captura e a via de exportação encontraram-se estimuladas nos camundongos KO β_1 tratados com dieta hipercalórica. Esses dados sugerem que o receptor adrenérgico β_1 esteja diretamente relacionado com o metabolismo de colesterol.

Os animais KO β_1 tratados com dieta hipercalórica apresentaram uma expressão de RNAm significativamente elevada do gene ABCA1, proteína importante o transporte da lipoproteína HDL para o fígado em comparação com os outros grupos, porém isso pode ser explicado pela alta expressão de RNAm de LXR, que estimula a expressão de ABCA1, mediando a ativação (ZHAO C & DAHLMAN-WRIGHT K, 2010).

Estudos anteriores mostraram que a síntese de colesterol também pode ser ativada pelo TNF- α , que também inibe a eliminação de colesterol através dos ácidos da bile, que juntos contribuem no aumento do colesterol-LDL e redução de Colesterol-HDL (TACER *et al.*, 2007; FON TACER, POMPON & ROZMAN, 2010). Como a obesidade está relacionada com aumento dos níveis de colesterol e triglicérides, bem como o aumento de citocinas pró-inflamatórias e resistência à insulina, resolvemos investigar a relação do receptor adrenérgico β_1 nestes parâmetros.

O TNF- α é uma proteína com propriedades pró-inflamatórias secretadas por monócitos e adipócitos. Citocinas inflamatórias como o TNF- α são fundamentais no desenvolvimento de gordura hepática e subsequente dano no fígado por álcool (IIMURO *et al.*, 1997; YIN *et al.*, 1999). O TNF- α reduz a sensibilidade à insulina, já que em ratos obesos a neutralização do TNF- α causou melhora significativa na captação de glicose em resposta à

insulina, revelando sua relação com resistência insulínica na obesidade (HOTAMISLIĞLI, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993). Nossos resultados mostraram que os animais $KO\beta_1$, apesar de apresentarem o fígado histologicamente saudável, já possuem alteração em processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios, já que os animais $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão apresentaram níveis significativamente elevados de RNAm de TNF- α em comparação com os animais C57 tratados com dieta padrão. Esses resultados mostraram que o receptor adrenérgico β_1 contribui diretamente na redução a sensibilidade à insulina com consequentes causas para o desenvolvimento da DHGNA.

Apesar da hiperglicemia ser normalmente relacionada com a resistência à insulina, é possível que a hiperglicemia observada nos camundongos $KO\beta_1$ seja devido a um efeito direto da ausência do receptor adrenérgico β_1 . Estudo em cultura de adipócitos marrons mostra 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 & BENGTSSON, 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; BENGTSSON *et al*, 2000; KIKUCHI-UTSUMI *et al*, 1997; LINDQUIST *et al*, 2000; NIKAMI *et al*, 1996). O aumento na sensibilidade à insulina se dá por meio de aumento da oxidação de ácidos graxos, da captação e utilização da glicose no tecido adiposo e no músculo esquelético e de redução da produção hepática de glicose, levando a um melhor controle dos níveis séricos de glicose, de ácidos graxos livres e de triacilglicerol (RAJALA e SCHERER, 2003; MATTISON & JESEN, 2003). O presente estudo sugere que essa disfunção entre SNS e sinalização de insulina pode ser uma das causas para o desenvolvimento da DHGNA em camundongos $KO\beta_1$, já que esses animais apresentaram redução na sensibilidade à insulina visualizada no IPITT, além de distúrbios no metabolismo lipídico.

Nós também mostramos que os níveis de RNAm de adiponectina estavam significativamente reduzidos nos camundongos $KO\beta_1$ tratados com dieta padrão, sugerindo a influência direta do receptor adrenérgico β_1 na expressão de RNAm de adiponectina. A adiponectina é uma adipocina que age como fator protetor de doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade a insulina (OLOFSSON, STILLEMARCK-BILLTON & ASP, 2000). Em resumo, a resistência à insulina induz anormalidades lipídicas e consequentemente à DHGNA e a

ausência dos receptores adrenérgicos correlacionam-se positivamente com o agravamento desse quadro, já que existe uma associação entre baixos níveis da adiponectina com resistência à insulina e hiperinsulinemia. Por outro lado, somente os animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica apresentaram níveis de RNAm significativamente elevados para Resistina, que é uma proteína com características pro-inflamatórias, que normalmente apresenta-se mais elevada na obesidade. Além disso, ela promove resistência à insulina por meio de aumento da gliconeogênese hepática (RAJALA & SCHERER, 2003). Porém não é claro se a alta expressão de RNAm da resistina é decorrente da obesidade mais severa nos animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica ou se é decorrente da ausência do receptor adrenérgico β_1 , indicando a ação direta na expressão da Resistina.

Assim, nos mostramos que dentre os principais fatores que promovem o desenvolvimento da DHGNA nos animais com nocaute para o receptor adrenérgico β_1 tratados com dieta hipercalórica se destacam aumento no RNAm de enzimas lipogênicas e na produção de lipoproteínas no tecido hepático, ocasionando um desbalanço entre a síntese e exportação de triglicerídeos e colesterol para o plasma, e o conseqüente acúmulo de gordura no tecido hepático. No entanto, não é claro se essas alterações são decorrentes da ausência do receptor adrenérgico β_1 per se, ou se pela obesidade mais severa observada nos animais $KO\beta_1$ tratados com dieta hipercalórica.

Além disso, é possível que os receptores β_1 apresentem papel importante no metabolismo de glicose, já que os camundongos $KO\beta_1$ apresentaram alterações em diversas adipocinas envolvidas na sinalização da insulina nas células, apresentando sensibilidade reduzida a este hormônio, favorecendo o desenvolvimento de DHGNA.

6. CONCLUSÕES

A isoforma β_1 dos receptores adrenérgicos exerce papel fundamental na regulação do metabolismo energético, uma vez que sua ausência leva ao desenvolvimento de obesidade severa, síndrome metabólica e esteatohepatite não alcoólica.

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento na esteatohepatite são aumento da síntese e diminuição da exportação de gorduras do fígado.

Os processos de síntese e exportação de triglicerídeos e colesterol no fígado são dependentes do receptor adrenérgico β_1 .

O receptor adrenérgico β_1 parece ter papel fundamental na homeostase glicêmica e lipídica, através da sinalização de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RAB`ES, J. P. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. In: **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 154–156, 2003.

ADIELS, M.; OLOFSSON, S. O.; TASKINEN, M. R. *et al.* Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. In: **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p. 1225–1236, 2008.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. In: **Diabetic Medicine**. v. 23, n.5, p. 469-80, 2006.

ASENSIO, C.; JIMENEZ, M.; KUHNE, F.; ROHNER *et al.* The lack of β -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. In: **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3490-3495, 2005.

ATGIÉ, C.; D'ALLAIRE, F.; BUKOWIECKI, L.J. Role of β_3 -adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. In: **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 273, n. 4Pt 1, p. C1136-C1142, 1997.

BACHMAN, E.S.; DHILLON, H.; ZHANG, C.Y. *et al.* β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. In: **Science**, v. 297, n. 5582, p. 843-845, 2002.

BARSHOP, N. J.; SIRLIN, C. B.; SCHWIMMER, J. B. *et al.* Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. In: **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 13–24, 2008.

BELL, D.S.; BAKRIS, G.L.; MCGRILL, J.B. Comparison of carvedilol and metoprolol on serum lipid concentration in diabetic hypertensive patients. In: **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. In: **Biochem. J.**, v. 347, n. 3, p. 643-651, 2000.

BENOVIC, J.L.; BOUVIER, M.; CARON, M.G. *et al.* Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. In: **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 4, p. 405-428, 1988.

BENOVIC, J.L.; DE BLASI, A.; STONE, W.C. *et al.* Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. In: **Science**, v. 246, n. 4927, p. 235-240, 1989.

BJ`ORKEGREN, J.; BEIGNEUX, A.; BERGO, M. O. *et al.* Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5476–5483, 2002.

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

BOUVIER, M.; COLLINS, S.; O'DOWD, B.F. *et al.* Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorilation of the receptor and regulation of its mRNA level. In: **J.Biol.Chem.**, v. 264, n. 28, p. 16786-16792, 1989.

BRONNIKOV, G.; BENGTSSON, T.; KRAMAROVA, L. *et al.* β_1 to β_3 switch in control of cAMP during brown adipocyte development explains distinct β -adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. In: **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4185–4197, 1999.

BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. In: **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34–47, 1986.

BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. In: **Cell**, v. 89, n. 3 p. 331-340, 1997.

BROWNING, J. D. & HORTON, J. D., Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2004.

CALI, A. M. G.; ZERN, T. L.; TAKSALI, S. E. *et al.* Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state. In: **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 3093–3098, 2007.

CHA, J.-Y. & REPA, J. J. The liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: the carbohydrate-response element binding protein is a target gene of LXR. In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 1, p. 743–751, 2007.

CHANG, X.; YAN, H.; FEI, J. *et al.* Berberine reduces methylation of the MTP promoter and alleviates fatty liver induced by a high-fat diet in rats. In: **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 9, p. 2504–2515, 2010.

CHEN, G.; LIANG, G.; OU, J.; GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of SREBP-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 31, p. 11245–11250, 2004.

CHEOL, S. C.; SAVAGE, D. B.; KULKARNI, A. *et al.* Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet induced hepatic steatosis and insulin resistance. In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22678–22688, 2007.

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. In: **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 269-280, 2004.

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

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

DAY, C. P. & JAMES, O. F. W., “Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’?” In: **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842–845, 1998.

DENTIN, R.; BENHAMED, F.; HAINAULT, I. *et al.* Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. In: **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2159–2170, 2006.

DODSON, M. V.; MIR, P.; HAUSMAN, G. J. *et al.* Obesity, metabolic syndromes and adipocytes. In: **Journal of Lipids**, 2011.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 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. In: **J.Biol.Chem.**, v. 256, , n. 23, p. 12281-12286, 1981.

FLOWERS, M. T.; MIYAZAKI, M.; XUEQING, L. *et al.* Probing the role of stearoyl-CoA desaturase–1 in hepatic insulin resistance. In: **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, n. 6, p. 1478–1481, 2006.

FON TACER, K. & ROZMAN, D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. In: **Journal of Lipids**, v. 2011, p. 14, 2011.

FON TACER, K.; POMPON, D.; ROZMAN, D. Adaptation of cholesterol synthesis to fasting and TNF- α : profiling cholesterol intermediates in the liver, brain, and testis. In: **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.121, n. 3–5, p. 619–625, 2010.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* Revisão: O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. In: **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.2, p.216-229, 2006.

FOUFELLE, F. & FERRÉ, P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. In: **Biochemical Journal**, v. 366, n. 2, p. 377–391, 2002.

FUJITA, K.; NOZAKI, Y.; WADA, K. *et al.*. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. In: **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 772–780, 2009.

GARDNER, D.G.; SHOBACK, D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 8. ed. San Francisco: The McGraw-Hill Companies. Cap. 12, p.429-432: Catecholamine (Adrenergic) Receptors, 2007.

GAVRILOVA, O.; HALUZIK, M.; MATSUSUE, K. *et al.* Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. In: **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 34268–34276, 2003.

GINSBERG, H. N.; ZHANG, Y.-L.; HERNANDEZ-ONO, A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. In: **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 232–240, 2005.

GOLDSTEIN, J. L.; HOBBS, H.; BROWN, M. S. Familial Hypercholesterolemia. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, v. 7, p.1981-2030, 1995.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. In: **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 4, p. 431–438, 2009.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Metabolismo e Termorregulação. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 842-888, 2006.

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

HADARI, M.; LEUNG, N.; MAHBUB, F. *et al.* Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 31646–31655, 2002.

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

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

HELLERSTEIN, M. K. & PARKS, E. J. Obesity & Overweight. In: **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. 8th ed. San Francisco: The McGraw-Hill Companies. Cap. 21, p. 796-816, 2007.

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.; DANFORTH Jr, E. The potential role of β_3 - adrenoceptor agonist in the treatment of obesity and diabetes. In: **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes**, v. 3, p. 59-65, 1996.

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

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. In: **Journal of Clinical Investigation**. v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. In: **International Journal of Obesity**, v. 27, supplement 3, p. S53–S55, 2003.

HOTAMISLIGLI, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. In: **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.

IIMURO, Y.; GALLUCCI, R. M.; LUSTER, M.; KONO, H.; THURMAN, R. G. Antibodies to tumor necrosis factor α attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. In: **Hepatology**, v. 26, n. 6, p. 1530–1537, 1997.

IIZUKA, K.; HORIKAWA, Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. In: **Endocrine Journal**. v. 55, n. 4, p. 617–624, 2008.

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

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

JANSSEN, I.; KATZMARZYK, P. T.; BOYCE, W. F. *et al.* Comparison of overweight and obesity prevalence in school-aged youth from 34 countries and their relationships with physical activity and dietary patterns. In: **Obesity Reviews**, v. 6, n. 2, p. 123–132, 2005.

JIMENEZ, M.; LEGER, B.; CANOLA, K. *et al.*. $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ -adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. In: **Febs Lett**, v. 503, n. 1-3, p. 37-40, 2002.

JUMP, D. B.; BOTOLIN, D.; WANG, Y. *et al.*. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. In: **The Journal of Nutrition**. v. 135, p. 2503–2506, 2005.

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

KLEIN, H.H.; MATHAEI, S.; DRENKHAN, M. *et al.*. 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. In: **Biochem. J.**, v. 274, n. Pt 3, p. 787–792, 1991.

KLEIN, J.; FASSHAUER, M.; ITO, M. *et al.*. β 3-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. In: **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 49, p. 34795–34802, 1999.

KOTRONEN, A. & YKI-JÄRVINEN, H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. In: **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 27–38, 2008.

LAZO, M. & CLARK, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. In: **Seminars in Liver Disease**, v. 28, n. 4, p. 339–350, 2008.

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

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. In: **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUCERO, D.; ZAGO, V.; LÓPEZ, G. I. *et al.*. Does non-alcoholic fatty liver impair alterations of plasma lipoproteins and associated factors in metabolic syndrome? In: **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 7–8, p. 587–592, 2011.

LOWELL, B.B.; SPIEGELMAN, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. In: **Nature**, v. 404, p. 652–660, 2000.

LOWELL, B. B.; BACHMAN, E. S. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. In: **J Biol Chem**, v. 278, n. 32, p. 29385–29388. 2003

MATTISON, R.; JESEN, M. The adipocyte as an endocrine cell. In: **Curr Opin Endocrinol Diab**, v. 10, p.317–321, 2003.

MINEHIRA, K.; YOUNG, S. G.; VILLANUEVA, C. J. *et al.* Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. In: **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 9, p. 2038–2044, 2008.

MOREAU, A.; TERUEL, C.; BEYLOT, M. *et al.* A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte. In: **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 2068–2079, 2009.

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

MUSUNURU, K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. In: **Lipids**, v. 45, p. 907-914, 2010.

NEUSCHWANDER-TETRI B. A. & CALDWEL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. In: **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-1219, 2003.

NICHOLLS, D.G.; LOCKE, R.M. Thermogenic mechanisms in brown fat. In: **Physiol. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 1-64, 1984.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein UCP1. In: **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, n. 5, p. 399-406, 1999.

OBERMAIER, B.; ERMEL, B.; KIRSCH, D.; *et al.* Catecholamines and tumour promoting phorbol esters inhibit insulin receptor kinase and induce insulin resistance in isolated human adipocytes. In: **Diabetologia**, v. 30, n. 2, p. 93-99, 1987.

ODRÍGUEZ-SUÁREZ, E.; DUCE, A. M.; CABALLERÍA, J.; *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. In: **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 4 p. 362-371, 2010.

OLOFSSON, S. O.; STILLEMARCK-BILLTON, P.; ASP L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. In: **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 8, p. 338-345, 2000.

PARK, H. S.; HAN, J. H.; CHOI, K. M. *et al.* Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents. In: **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 5, p. 1046-1051, 2005.

PACKARD, C. J. & SHEPHERD, J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. In: **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 12, p. 3542-3556, 1997.

PEET, D. J.; JANOWSKI, B. A.; MANGELSDORF, J.. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. In: **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, n. 5, p. 571-575, 1998.

PEET, D. J.; TURLEY, S. D.; MA, W. *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . In: **Cell**, v. 93, n. 5, p. 693-704, 1998.

PETERSEN, K. F.; DUFOUR, S.; HARIRI, A. *et al.* Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. In: **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 12, p. 1082-1089, 2010.

POLACOW, V. O.; LANCHA JUNIOR, A. H. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal

e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. In: **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n.3, p. 389-400, 2007.

RAABE, M.; VENIANT, M. M.; SULLIVAN, M. A. *et al.* Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 9, p. 1287–1298, 1999.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P.E.; Minireview: The adipocyte – at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. In: **Endocrinology**, v.144, p 3765-3773, 2003.

RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; WEI, Y. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. In: **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n. 2, p.185–192, 2008.

REPA, J. J.; LIANG, G.; OU J. *et al.*, Regulation of mouse sterol regulatory element binding protein-1c gene (SREBP- 1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . In: **Genes and Development**, v. 14, n. 22, p. 2819–2830, 2000.

RIBEIRO, M.O.; SUZY, D.C.; SCHULTZ, J.J. *et al.* Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptative thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. In: **J. Clin. Invest.**, v.108, p. 97-105, 2001.

RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERS, J. J. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. In: **Text Book of Clinical Chemistry**, p. 809-61, 1999.

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

SANYAL, A. J.; CAMPBELL-SARGENT, C.; MIRSHAHI F. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. In: **Gastroenterology**, v. 120, n. 5, p. 1183–1192, 2001.

SCHULTZ, J. R. ; TU, H.; LUK A. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. In: **Genes and Development**, v. 14, n. 22, p. 2831–2838, 2000.

SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I. *et al.* Isoform1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 846–854, 1997.

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

SIMONETTI,M.;VALINETTI,E.,FERREIRA,F. Clonidina: de descongestionante nasal a analgésico potente. Considerações históricas e farmacológicas. In: **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.47,p.37-47,1997.

SUBRAMANIAN, S.; GOODSPEED, L.; WANG, S. *et al.*. Dietary Cholesterol Exacerbates Hepatic Steatosis and Inflammation in Obese LDL Receptor-Deficient Mice. In: **The Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 9, p. 1626-1635, 2011.

SUGINO, I.; KUBOKI, K.; MATSUMOTO, T. *et al.*. Influence of fatty liver on plasma small, dense LDL-cholesterol in subjects with and without metabolic syndrome. In: **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.18, n. 1, p. 1–7, 2011.

TACER, K. F.; KUZMAN, D.; SELIŠKAR, M. *et al.*. TNF- α interferes with lipid homeostasis and activates acute and proatherogenic processes. In: **Physiological Genomics**, v. 31, no. 2, p. 216–227, 2007.

TULENKO, T. N. & SUMNER, A. E., The physiology of lipoproteins. In: **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 9, n. 6, p. 638–649, 2002.

UETA, C. B.; FERNANDES, G. W.; CAPELO, L. P. *et al.*. β_1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. In: **Journal of Endocrinology**, v. 214, p. 359-365, 2012.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M. ; MARINO, M. W. *et al.*. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. In: **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610–614, 1997.

UYEDA, K.; YAMASHITA, H. ; KAWAGUCHI, T.. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. In: **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 2075–2080, 2002.

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

WELLINGTON C. L., BRUNHAM L. R., ZHOU S. *et al.* Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral mediated hepatic overexpression of human ABCA1. In: **Journal of Lipid Research**, v. 8, p 1470-1480, 2003.

WANG, Q.; LI, S.; JIANG, L. *et al.*. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. In: **Journal of lipid Research**. v. 51, p. 2516-2526, 2010.

WOUTERS, K.; VAN GORP, P. J.; BIEGHS, V. *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. In: **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474–486, 2008.

YAHAGI, N.; SHIMANO, H.; HASTY, A. H. *et al.* Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep/Lep mice. In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19353–19357, 2002.

YAMASHITA, H.; TAKENOSHITA, M.; SAKURAI, M. *et al.* A glucoseresponsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9116–9121, 2001.

YIN, M.; WHEELER, M. D.; KONO, H. *et al.* Essential role of tumor necrosis factor α in alcohol-induced liver injury in mice. In: **Gastroenterology**, v. 117, n. 4, p. 942–952, 1999.

ZAID, A.; ROUBTSOVA, A.; ESSALMANI R. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. In: **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 646–654, 2008.

ZELCER, N.; HONG, C.; BOYADJIAN, R. *et al.* LXR regulates cholesterol uptake through idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. In: **Science**, v. 325, n. 5936, p. 100–104, 2009.

ZHAO, C. & DAHLMAN-WRIGHT, K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. In: **Journal of Endocrinology**, v.204, p. 233-240, 2010.

ZHAO, L. F.; IWASAKI, Y.; ZHE, W.; NISHIYAMA, M. *et al.* Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription. In: **Endocrine Journal**. v. 57, n. 4, p. 317–324, 2010.

ZHOU, J.; FEBBRAIO, M.; WADA, T. *et al.* Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. In: **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 556–567, 2008.

ZOLTOWSKA, M.; ZIV, E.; DELVIN, E. *et al.* Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in Psammomys obesus prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. In: **Atherosclerosis**, v. 157, n. 1, p. 85–96, 2001.



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Coordenadoria de Pesquisa - Comitê de Ética no Uso de Animais



São Paulo, 13 de novembro de 2012.

Ao Acadêmico

Gustavo Werpel Fernandes

Após a análise do projeto de pesquisa "***Papel do receptor adrenérgico beta 1 no desenvolvimento da doença gordurosa hepática não alcoólica***" processo CEUA Nº 060/10/2009, o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie ***aprovou*** os procedimentos éticos do referido projeto, com a seguinte observação:

- *sugere-se que o projeto seja encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança por envolver o uso de animais "nocaute".*

Solicitamos, por gentileza, que após a conclusão do citado projeto seja encaminhada uma cópia digital, do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo neste Comitê.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo
Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais

Projeto analisado na Reunião Mensal de outubro.