

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO  
DE ISOPROTERENOL INDUZ DISFUNÇÃO METABÓLICA E  
REMODELAMENTO PANCREÁTICO EM RATOS WISTAR**

**ALESSANDRA GISELE DE CASTRO**

**Goiânia – GO**

**2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

**Exemplos:** Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Alessandra Gisele de Castro

#### 3. Título do trabalho

Estimulação adrenérgica causada pela administração de isoproterenol induz disfunção metabólica e remodelamento pancreático em ratos Wistar

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 15/03/2023, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **ALESSANDRA GISELE DE CASTRO, Usuário Externo**, em 05/04/2023, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3517603** e o código CRC **B4EB2553**.

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO  
DE ISOPROTERENOL INDUZ DISFUNÇÃO METABÓLICA E  
REMODELAMENTO PANCREÁTICO EM RATOS WISTAR**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para a defesa de produto final do Mestrado em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes

**Goiânia – GO**

**2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

CASTRO, ALESSANDRA GISELE DE  
ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO  
DE ISOPROTERENOL INDUZ DISFUNÇÃO METABÓLICA E  
REMODELAMENTO PANCREÁTICO EM RATOS WISTAR  
[manuscrito] / ALESSANDRA GISELE DE CASTRO. - 2021.  
52 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. RODRIGO MELLO GOMES.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, ,  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2021.  
Bibliografia.

Inclui siglas, mapas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de  
figuras.

1. Agonista  $\alpha$ -adrenérgico. 2. Metabolismo. 3. Fibrose. 4. Pâncreas.  
5. Tecido Adiposo Marrom. I. GOMES, RODRIGO MELLO, orient. II.  
Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 548 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Alessandra Gisele de Castro** o título de Mestra em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos trinta dias do mês de agosto de 2022, a partir das 09:00 horas, no Anfiteatro do ICB 2, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Estimulação adrenérgica causada pela administração de isoproterenol induz disfunção metabólica e remodelamento pancreático em ratos Wistar”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Cristina da Costa Krewer Mascioli (ICB - UFG), membro titular externo; Professor Doutor Carlos Henrique Xavier Custódio (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos trinta dias do mês de agosto de 2022.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Da Costa Krewer Mascioli, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3142281** e o código CRC **C2CC3E86**.

**ALESSANDRA GISELE DE CASTRO**

**ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO  
DE ISOPROTERENOL INDUZ DISFUNÇÃO METABÓLICA E  
REMODELAMENTO PANCREÁTICO EM RATOS WISTAR**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes**

Universidade Federal de Goiás

*Presidente da Banca*

**Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier**

Universidade Federal de Goiás

*Membro Interno do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas*

**Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias**

Universidade Estadual de Maringá

*Membro externo ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e benção de chegar até aqui. Só Ele sabe os percalços do caminho, pela vida, pela provisão e sustento.

À minha mãe Maria, meu irmão Eduardo e meu esposo Eric, estes que de fato são, presentes e solícitos, maiores incentivadores e apoiadores, conforto e abrigo, sou muito grata a vocês, minha força para ir mais longe e ser melhor a cada dia.

Ao meu pai José Adilson de Castro (in memoriam), que infelizmente não pode estar presente neste momento tão feliz da minha vida, mas que não poderia deixar de dedicar a ele, pois se hoje estou aqui, devo muitas coisas a ele e por seus ensinamentos e valores passados. Obrigada por tudo! Saudades eternas!

Ao meu orientador e professor Dr. Rodrigo Mello Gomes, pela constante acolhida, oportunidades, incentivos, paciência e ensinamentos ao longo desses três anos.

Aos meus amigos Keilah e Marcos, que contribuíram enormemente para minha formação. Tenho vocês como inspiração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À Bioclin pelos kits de diagnósticos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

O meu Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. ISOPROTERENOL .....	1
1.2. ISOPROTERENOL EM ESTUDOS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	4
1.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ALTERAÇÕES METABÓLICAS ...	5
1.4. FISIOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO MARROM .....	5
1.5. MORFOFISIOLOGIA DO PÂNCREAS .....	6
1.6. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>12</b>
3.1. ANIMAIS.....	12
3.2. MODELO EXPERIMENTAL .....	12
3.3. TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG).....	13
3.4. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAVENOSO (IVGTT) .....	14
3.5. EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS .....	15
3.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE PARÂMETROS METABÓLICOS .....	15
3.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	15
3.8. AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DOS CARDIOMIÓCITOS.....	16
3.9. AVALIAÇÃO DA FIBROSE PERIVASCULAR NO CORAÇÃO .....	16
3.10. AVALIAÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL NO CORAÇÃO .....	16

3.11. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO PÂNCREAS.....	16
3.12. AVALIAÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL NO PÂNCREAS .....	17
3.13. MORFOMETRIA DAS VILOSIDADES DUODENAIS .....	17
3.14. MORFOMETRIA DOS ADIPÓCITOS MARRONS .....	17
3.15. WESTERN BLOT .....	17
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL NA HISTOLOGIA DO CORAÇÃO DE RATOS WISTAR ADULTOS.....	20
4.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL NA MASSA CORPORAL DE RATOS WISTAR ADULTOS .....	21
4.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL NA HOMEOSTASE DA GLICOSE DE RATOS WISTAR ADULTOS.....	22
4.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS .....	23
4.5. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL NOS DEPÓSITOS DE GORDURA DE RATOS WISTAR ADULTOS.....	24
4.6. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS.....	24
4.7. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE RATOS WISTAR ADULTOS .....	25
4.8. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM DADOS MORFOMÉTRICOS E PARÂMETROS MORFOLÓGICOS PANCREÁTICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS .....	26
4.9. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO DUODENO DE RATOS WISTAR ADULTOS.....	27

4.10. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM PARÂMETROS MOLECULARES DO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE RATOS WISTAR ADULTOS .....	28
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>35</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AC</b>	Adenilato Ciclase
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclica
<b>AMPK</b>	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>CREB</b>	Proteína responsiva a ligação de AMPc
<b>DM1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>GLUT</b>	Transportadores de glicose
<b>HSL</b>	Lipase hormônio sensível
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IN</b>	Inguinal
<b>ivGTT</b>	Teste de Tolerância a glicose via intravenosa
<b>ISO</b>	Isoproterenol
<b>LTCC</b>	Canal de cálcio do tipo L
<b>MES</b>	Mesentérico
<b>pAMPK</b>	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina fosforilada
<b>PKA</b>	Proteína Kinase A
<b>PLB</b>	Fosfolambam
<b>RP</b>	Retroperitoneal
<b>SERCA</b>	ATPase de transporte de cálcio do retículo sarcoendoplasmático
<b>TAB</b>	Tecido Adiposo Branco
<b>TAM</b>	Tecido Adiposo Marrom
<b>UCP</b>	Proteína desacopladora
<b>β-AR</b>	Adrenoreceptor tipo β

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular de catecolaminas e do isoproterenol. Sombreados em azul os anéis catecol, e em lilás os grupos amina.....	1
<b>Figura 2.</b> Ativação dos receptores $\beta$ -adrenérgicos e principais vias intracelulares acionadas em adipócitos do TAM.. .....	3
<b>Figura 3.</b> Anatomia e histologia do principal estoque de tecido adiposo marrom em roedores, o interescapular.....	6
<b>Figura 4.</b> Morfologia do pâncreas.. .....	8
<b>Figura 5.</b> Delineamento experimental.....	18
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração de isoproterenol no peso do coração e nos cardiomiócitos de ratos Wistar adultos.....	20
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração de isoproterenol na fibrose intersticial e perivascular de ratos Wistar adultos.....	21
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração de isoproterenol na massa corporal de ratos Wistar adultos.....	21
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração de isoproterenol na homeostase da glicose de ratos Wistar adultos durante o TOTG.....	22
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração de isoproterenol na homeostase da glicose de ratos Wistar adultos, durante o ivGTT.....	23
<b>Figura 11.</b> Efeito da administração de isoproterenol em dados morfométricos de ratos Wistar adultos.....	23
<b>Figura 12.</b> Efeitos da administração de isoproterenol nos depósitos de gordura de ratos Wistar adultos.....	24
<b>Figura 13.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar adultos.....	25
<b>Figura 14.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. ....	26
<b>Figura 15.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos pancreáticos de ratos Wistar adultos. ....	26
<b>Figura 16.</b> Efeitos da administração de isoproterenol na fibrose pancreática de ratos Wistar adultos.....	27
<b>Figura 17.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do duodeno de ratos Wistar adultos.....	27

<b>Figura 18.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros moleculares do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. ....	28
<b>Figura 19.</b> Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros moleculares do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. ....	29

## RESUMO

O isoproterenol é um fármaco usado geralmente para os tratamentos de bradicardia, bloqueio cardíaco, broncoespasmos durante a anestesia e raramente para asma. É um agonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo análogo da epinefrina, por essa razão ele promove efeitos inotrópico e cronotrópico positivos no tecido cardíaco, sendo usado como modelo experimental para o estudo de alterações cardíacas. Sabe-se que a estimulação adrenérgica causada pela administração de isoproterenol, induz o remodelamento cardíaco, geralmente por vias relacionadas principalmente ao *status redox* e citocinas inflamatórias. Contudo, pouco se sabe sobre os prejuízos metabólicos desse modelo. Dessa forma, este estudo visa avaliar os efeitos da administração de isoproterenol sobre parâmetros metabólicos e morfológicos. Ratos Wistar adultos (50-60 dias de idade; pesando 200-250g) foram alocados em dois grupos experimentais: ratos controle (CO) que receberam veículo (NaCl 150 mM, 0,1ml/kg/dia; i.p.), e ratos que receberam injeções de isoproterenol (ISO; 1 mg/kg/dia; i.p.) durante 7 dias consecutivos. Após o período de tratamento os animais foram submetidos a testes *in vivo* e posteriormente eutanasiados para coleta de amostras. Os animais do grupo ISO não apresentaram diferença significativa na massa corporal comparados aos animais CO. Por outro lado, os animais ISO apresentaram aumento da massa do tecido adiposo marrom e da área dos adipócitos marrons. Além disso, a administração de isoproterenol promoveu remodelamento pancreático, com aumento da área das ilhotas pancreáticas e fibrose intersticial. Em suma, além das alterações cardíacas, a sobrecarga adrenérgica induzida pela administração de isoproterenol também foi capaz de promover alterações morfológicas significativas no tecido adiposo marrom e no pâncreas, estas alterações podem estar ligadas as alterações cardíacas e em outros sistemas, dessa forma, o estudo fisiológico integrado é fundamental para melhor entendimento da estimulação exacerbada dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

**Palavras-chaves:** Agonista  $\beta$ -adrenérgico; Metabolismo; Tecido adiposo marrom; Pâncreas; Ilhotas pancreáticas; Fibrose.

## ABSTRACT

Isoproterenol is a drug commonly used for the treatment of bradycardia, heart block, bronchospasm during anesthesia, and rarely for asthma. It is a non-selective  $\beta$ -adrenergic agonist ( $\beta_1$  and  $\beta_2$  receptor agonist) analog of epinephrine. In many studies the administration of isoproterenol is used as an experimental model for the study of cardiac alterations. It is known that adrenergic stimulation caused by high or prolonged doses of isoproterenol induces significant cardiac remodeling. However, little is known about the metabolic effects of this model. Thus, this study aims to evaluate the effects of isoproterenol administration on metabolic and morphological parameters. Adult Wistar rats (200-250g) were allocated into two experimental groups: control rats (CO) that received vehicle (150 mM NaCl, 0.1ml/kg/day; i.p.), and rats that received isoproterenol injections (ISO; 1 mg/kg/day; i.p.) for 7 consecutive days. After the treatment period, the animals were euthanized for sample collection. Animals in the ISO group showed no significant difference in body mass compared to CO animals. On the other hand, ISO animals showed an increase in brown adipose tissue mass and brown adipocyte area. In addition, the administration of isoproterenol promoted pancreatic remodeling, with an increase in the pancreatic islets and interstitial fibrosis. In short, in addition to the cardiac morphofunctional changes, the adrenergic overload induced by the administration of isoproterenol was also able to promote significant morphological changes in brown adipose tissue and in the pancreas, these changes may be linked to changes in the heart and in other systems, thus, an integrated physiological study is essential for a better understanding of the exacerbated stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors.

**Keywords:**  $\beta$ -adrenergic agonist; Metabolism; brown adipose tissue; pancreas; Pancreatic islets; fibrosis.

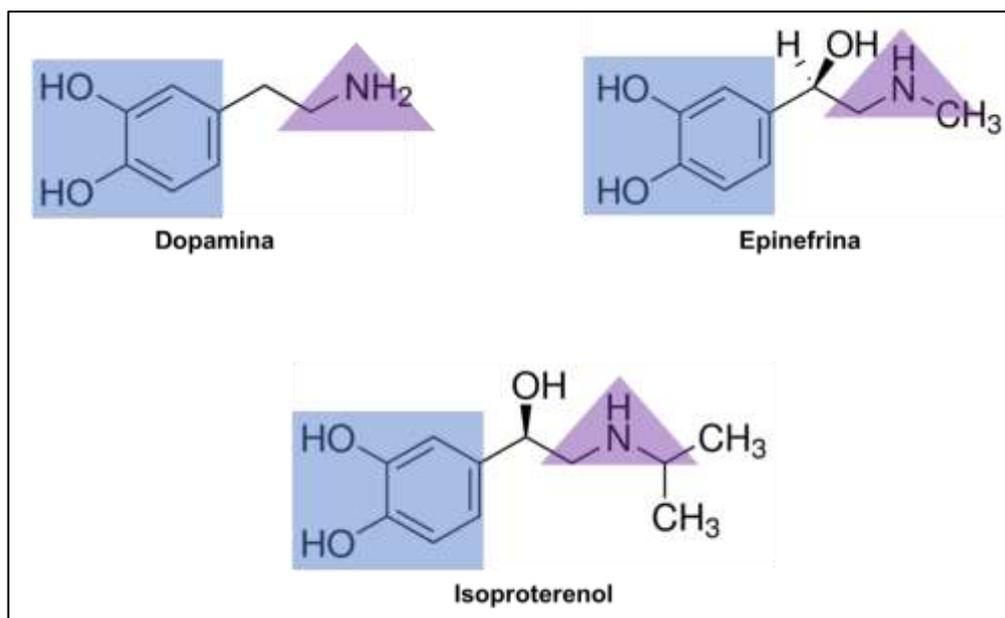
## **IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE**

O presente estudo almejou avaliar, em ratos de laboratório, os efeitos do uso de um fármaco utilizado no tratamento de indivíduos (0,02 mcg/kg/min) com o batimento cardíaco lento. O Isoproterenol, tem sido pouco explorado em parâmetros metabólicos, como na morfologia do pâncreas e do tecido adiposo marrom, que são órgãos extremamente responsivos a diversos estímulos. Muitos estudos se debruçam apenas no aparelho cardiovascular, que reconhecidamente sofre mais interferência por ser o alvo principal deste tipo de fármaco. Entretanto, neste estudo foi mostrado que mesmo na ausência de alterações na massa corporal, o uso contínuo desse fármaco pode acarretar alterações morfológicas no tecido adiposo marrom, e aumentar a fibrose no pâncreas. Sendo assim, este estudo abre caminho para que sejam feitas outras investigações para tornar mais claros os efeitos negligenciados do uso de fármacos que apresentam efeitos semelhantes do hormônio epinefrina conhecidos como simpatomiméticos.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Isoproterenol

O Isoproterenol, isoprenalina, ou conhecido pelo nome comercial Isuprel, é um análogo de catecolaminas, agonista não seletivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Sua estrutura molecular é semelhante a molécula de epinefrina (Figura 1).

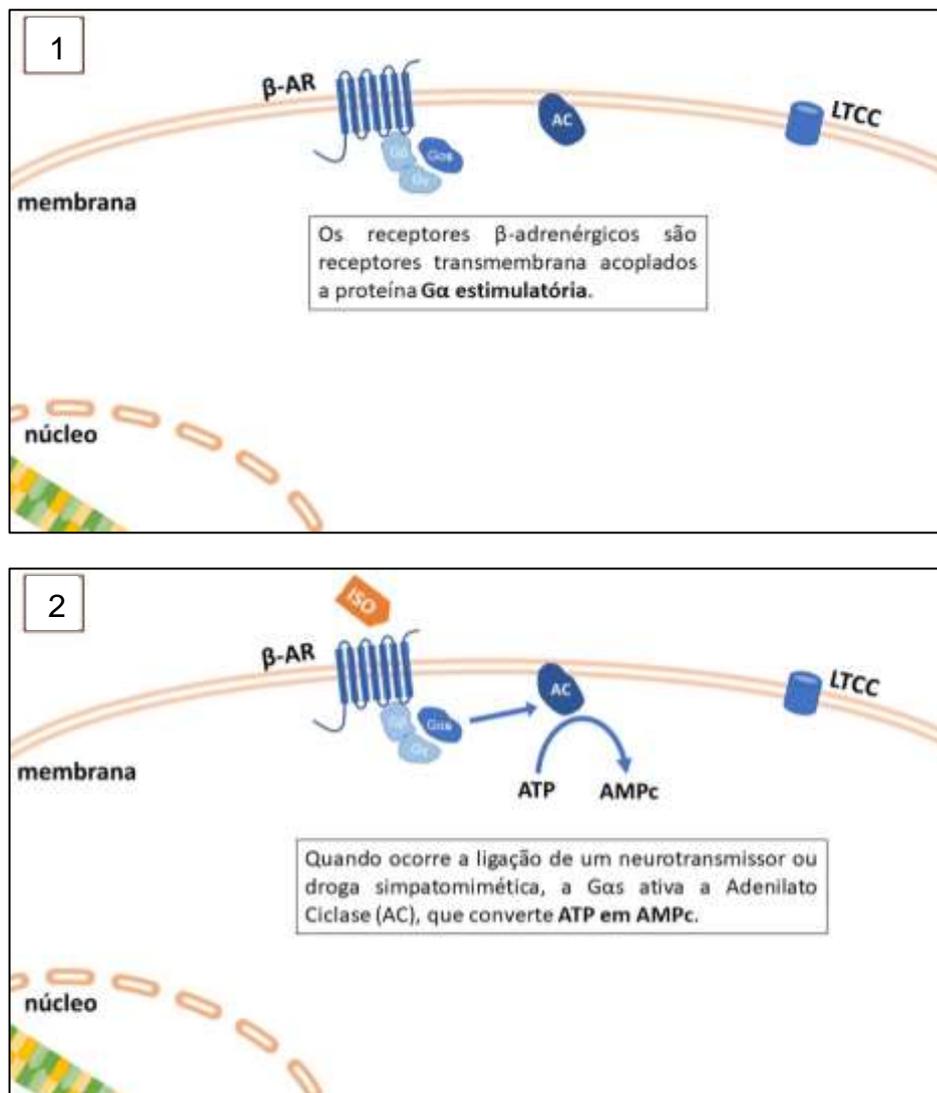


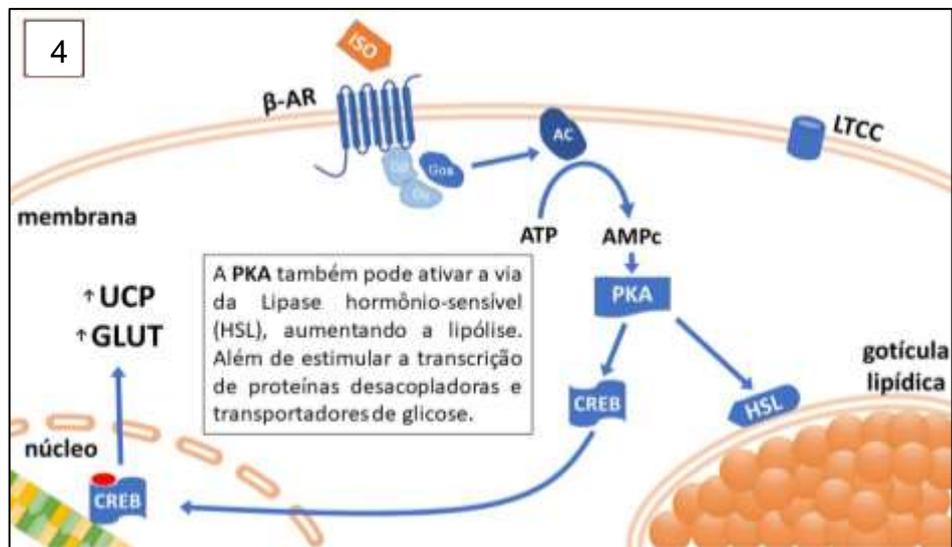
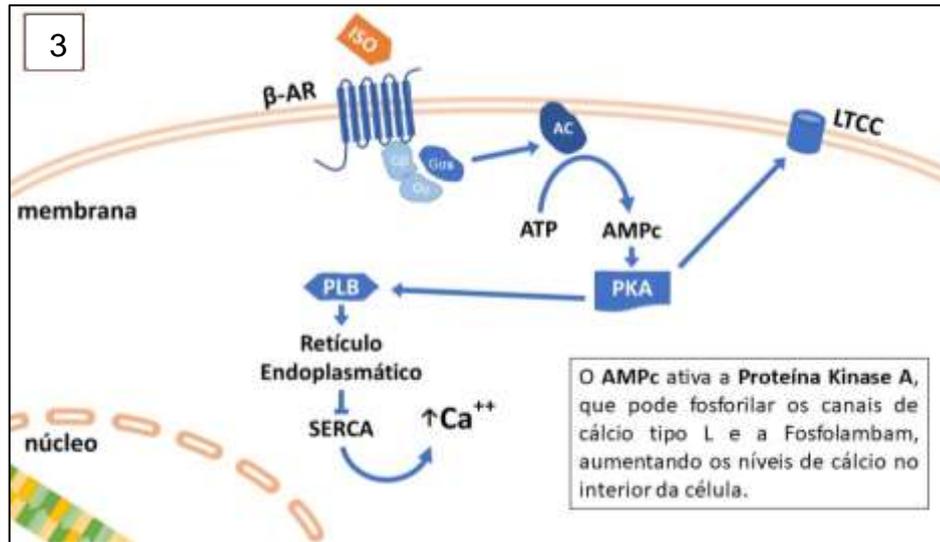
**Figura 1.** Estrutura molecular de catecolaminas e do isoproterenol. Sombreados em azul os anéis catecol, e em lilás os grupos amina. Fonte: Adaptado de <sigma-aldrich.com>.

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos são divididos em 3 subtipos:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3. O receptor  $\beta$ 1-adrenérgico é encontrado principalmente no coração e nas células justaglomerulares renais, o receptor  $\beta$ 2-adrenérgico é encontrado majoritariamente no músculo liso, fígado e no músculo esquelético, e o receptor  $\beta$ 3-adrenérgico é encontrado em maiores quantidades no tecido adiposo (GRAHAM, 1990). Contudo, estudos recentes têm mostrado a existência de receptores adrenérgicos  $\beta$ 2 em adipócitos brancos e marrons (LANGE et al., 2005). Os 3 subtipos dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos são acoplados a proteína G estimulatória (G<sub>s</sub>) e promovem a ativação da Adenilato Ciclase e consequente formação de AMP cíclico (YIN et al., 2016). O receptor  $\beta$ 2 foi classificado como potente vasodilatador em diversos órgãos, bem como no músculo liso e músculo esquelético (MITCHELL; MOYLE, 1967) e estudos vem demonstrando papel importante dos receptores  $\beta$ 1 e  $\beta$ 3, no relaxamento de vasos sanguíneos, devido a liberação de óxido nítrico nas células endoteliais (BRAWLEY;

SHAW; MACDONALD, 2000), entretanto essa liberação de óxido nítrico pode variar de acordo com o tipo de leito vascular avaliado (GUIMARÃES; MOURA, 2001). Além disso, o papel do receptor  $\beta_1$  é extensivamente apontado como cronotrópico e inotrópico em células cardíacas, aumentando a força e a frequência das contrações, a partir da inibição da recaptação de cálcio do citoplasma para o retículo sarcoplasmático pela SERCA e pela fosforilação de canais de cálcio do tipo lento (LTCC) (GRANT et al., 2020; HAYES et al., 1986). Por outro lado, o receptor  $\beta_3$  é intimamente ligado a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, devido a ativação da lipase hormônio sensível (CERO et al., 2021).

As principais vias ativadas através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos em adipócitos do TAM estão resumidas na Figura 2.





**Figura 2.** Ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e principais vias intracelulares acionadas em adipócitos do TAM.  
 Fonte: A autora. ISO – Isoproterenol;  $\beta$ -AR – Adrenoreceptor tipo  $\beta$ ; AC – Adenilato Ciclase; AMPc – Adenosina monofosfato cíclica; PKA – Proteína Kinase A; PLB – Fosfolambam; SERCA – ATPase de transporte de cálcio do retículo sarcoendoplasmático; CREB – Proteína responsiva a ligação de AMPc; UCP – Proteína desacopladora; GLUT – Transportadores de glicose; HSL – Lipase hormônio sensível; LTCC – Canal de cálcio do tipo L.

## 1.2. Isoproterenol em estudos do sistema cardiovascular

Na gênese de alterações patológicas no sistema cardiovascular, como hipertensão, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca encontramos exacerbação da atividade simpática e aumento dos níveis circulantes de catecolaminas (ESLER; KAYE, 2000).

O principal órgão afetado pelo estímulo adrenérgico exógeno é o coração. Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos aumentam a quantidade de cálcio no citosol através da inibição da SERCA pela Fosfolambam, ao passo que estimulam a entrada de cálcio pelos canais de cálcio do tipo lento (LTCC). Essa ação faz com que o coração aumente sua força de contração (inotropismo) e sua frequência de despolarização (cronotropismo), aumentando a exigência metabólica e a geração de espécies reativas de oxigênio (KHDHIRI et al., 2021). Esse aumento contínuo das exigências mecânicas e metabólicas favorecem a ativação de vias hipertróficas, pró-fibróticas e apoptóticas, levando ao remodelamento cardíaco (DERBALI et al., 2015; GRANT et al., 2020).

A ativação crônica de receptores adrenérgicos, como a administração diária de isoproterenol, também gera redução da vasodilatação, que é induzida de forma aguda pela estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Isso está relacionado com a dessensibilização dos receptores devido a estimulação a longo prazo (HAYES et al., 1986).

Além dessa alteração na sensibilidade dos receptores, estudos mostram que o tratamento crônico com isoproterenol promove aumento da resposta contrátil a administração de fenilefrina (agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico) na aorta de roedores (DAVEL et al., 2006), e também que há alteração pressórica em ratos e camundongos que foram expostos de forma crônica ao isoproterenol (GAVA et al., 2004; TRINDADE et al., 1992).

A hiperativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na vasculatura é semelhante aos modelos experimentais que mimetizam patologias cardiovasculares e que tem grande relevância mundial. Devido a essa semelhança de mecanismo, o isoproterenol é usado como modelo de hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca para diversos

estudos, que buscam caracterizar os efeitos dessas patologias e testar possíveis tratamentos para as doenças cardiovasculares.

### **1.3. Associação entre doenças cardiovasculares e alterações metabólicas**

É importante ressaltar que fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares estão associadas com alterações metabólicas. Um exemplo desse conjunto de patologias é a síndrome metabólica, que tem se tornado problema de saúde pública de amplitude mundial (WONG et al., 2016).

A síndrome metabólica é um conjunto de fatores de riscos para o acometimento de doenças crônicas que possuem altos níveis de mortalidade como, doenças cardíacas, diabetes e obesidade. Entre os fatores estão: hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão, distúrbios do metabolismo de açúcares e a obesidade (RODRIGUES et al., 2009).

A associação entre doenças cardiovasculares com alterações metabólicas como aumento dos níveis séricos de colesterol e a presença da placa de ateroma nos vasos devido a hipercolesterolemia, pode gerar complicação no sistema cardiovascular e aumentar a complexidade da doença cardiovascular aterosclerótica (MANDVIWALA; KHALID; DESWAL, 2016). É possível fazer o acompanhamento dos níveis séricos através da dosagem de colesterol total, frações de lipoproteína (LDL e HDL) e triglicerídeos (RODRIGUES et al., 2009).

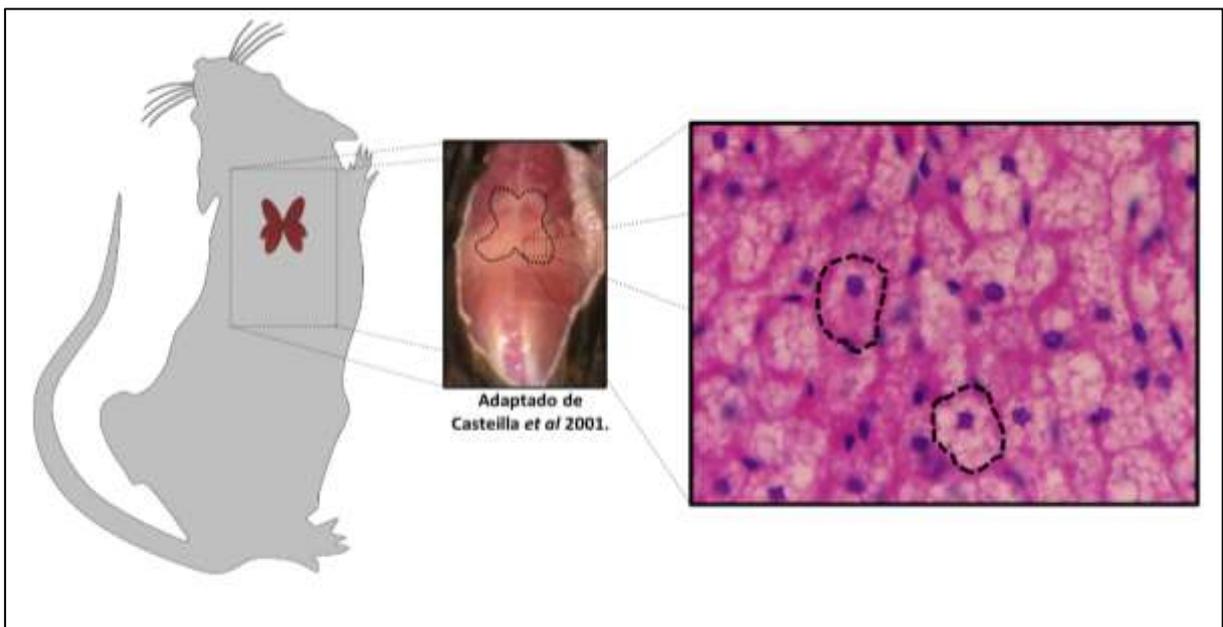
### **1.4. Fisiologia do tecido adiposo marrom**

O tecido adiposo marrom (TAM) contribui para a termogênese não trêmula e dissipa a energia dos nutrientes como calor para a manutenção da temperatura corporal. Os maiores depósitos de TAM, em camundongos e ratos, são encontrados na região interescapular (Figura 3) e dorso-cervical (CASTEILLA et al., 2001).

Como podemos observar na figura 3, os adipócitos do TAM são diferentes do tecido adiposo branco (TAB). Enquanto no TAB temos adipócito somente com um vacúolo de gordura, o TAM possui microvacúolos no interior do seu adipócito (BRAUN et al., 2018). Os microvacúolos permitem a rápida mobilização de triglicerídeos. E sua aparência acastanhada é resultado do alto teor de ferro e citocromo, explicando

principalmente pela alta massa mitocondrial (OELKRUG; POLYMEROPOULOS; JASTROCH, 2015).

A atividade do TAM é controlada pelo sistema nervoso central (SNC), que induz a liberação de noradrenalina nas inervações do TAM após um estímulo, que pode ser tanto o frio quanto o aumento do nível de nutrientes disponíveis (OELKRUG; POLYMEROPOULOS; JASTROCH, 2015). A noradrenalina se liga a receptores  $\beta$ -adrenérgicos específicos na superfície dos adipócitos marrons e ativa as vias de sinalização acopladas a proteína Gs que estimula a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres servem como substratos para oxidação lipídica, atuando simultaneamente como ativadores diretos da proteína de desacoplamento mitocondrial 1 (UCP1). A UCP1 é uma proteína transmembrana que catalisa a produção de calor a nível mitocondrial (BRAUN et al., 2018).



**Figura 3.** Anatomia e histologia do principal estoque de tecido adiposo marrom em roedores, o interestapular. Fonte: A autora.

### 1.5. Morfofisiologia do pâncreas

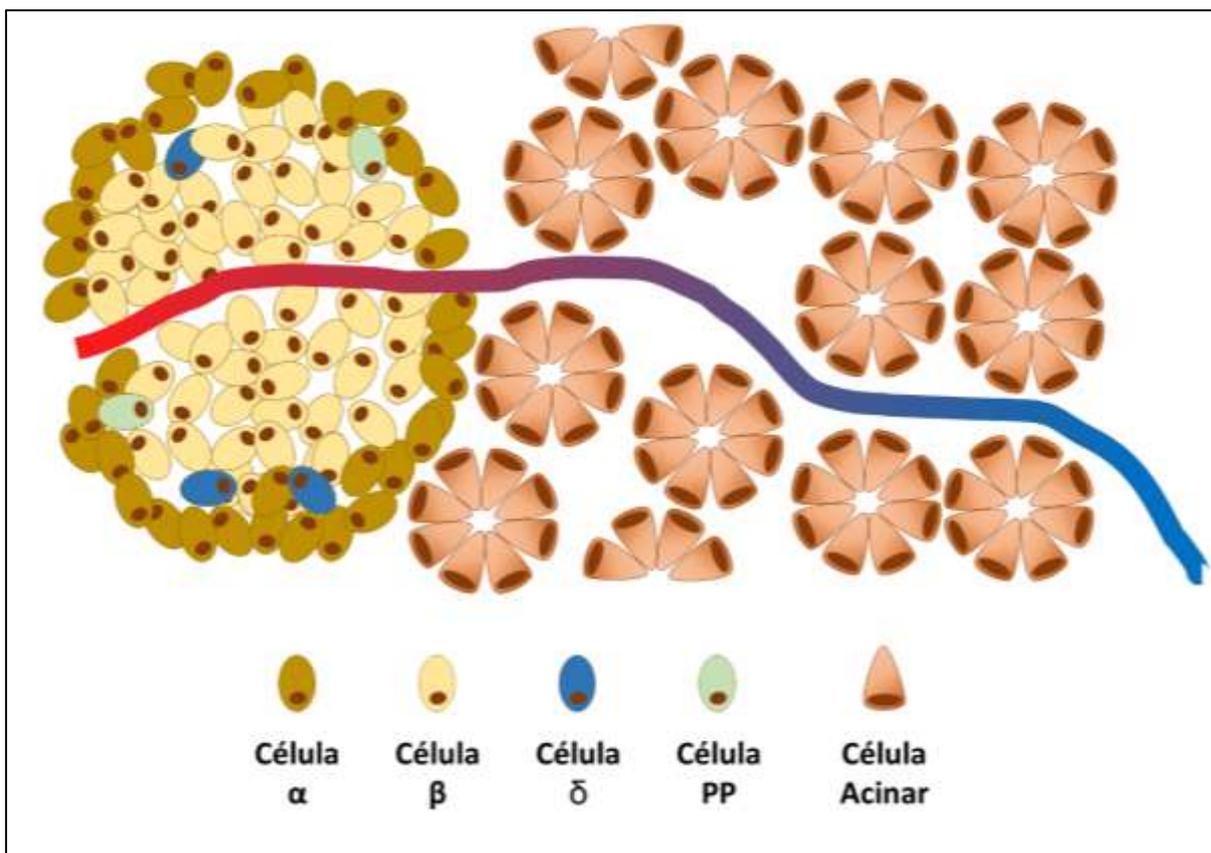
O pâncreas é uma glândula que consiste em uma porção endócrina e outra exócrina, apesar a distinção entre a porção endócrina e exócrina a função fisiológica de ambas está intimamente inter-relacionada. A glândula exócrina é composta por ácinos e ductos, as células acinares produzem enzimas digestivas responsáveis pela

digestão e absorção de nutrientes (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, 2017). A glândula endócrina é composta por ilhotas pancreáticas que são constituídas por tipos celulares diferentes que secretam hormônios peptídicos que contribuem para a manutenção da homeostase da glicose. Uma vez que a função secretora do pâncreas é regulada por mecanismos endócrinos e parácrinos, a ativação ou inativação alterada das vias que mediam os mecanismos finos do pâncreas tem impactos no desenvolvimento de doenças e no organismo saudável (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, 2017; WILSON; ENRIORI, 2015).

A porção endócrina do pâncreas é do interesse do presente estudo pois é composta por ilhotas pancreáticas que secretam hormônios, entre eles a insulina e o glucagon, que regulam os níveis plasmáticos de glicose. A ilhota pancreática se apresenta com formato arredondada, e é constituída por 4 tipos celulares: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), células PP, que são responsáveis pela produção de glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático respectivamente (KULKARNI, 2004), e possuem arranjo conforme a figura 4.

A insulina é um hormônio peptídico formado por duas cadeias de aminoácidos, uma cadeia A contendo 30 aminoácidos e uma cadeia B contendo 21 aminoácidos. As principais funções da insulina são metabólicas, tais como promover a captação de glicose em tecidos insulino-dependentes (músculo e tecido adiposo), lipogênese e glicogênese (WILSON; ENRIORI, 2015).

Além de estar envolvida no metabolismo de carboidratos, a insulina atua também na síntese e no armazenamento de gorduras (ALWAHSH et al., 2017). Esse papel da insulina é observado quando ocorre ingestão em excesso de carboidratos, fornecendo substrato para a síntese de gordura. Normalmente, a insulina promove a utilização da glicose pelos tecidos, o que gera a diminuição da utilização de gorduras como energia para os órgãos, funcionando como um poupador (KULKARNI, 2004).



**Figura 4.** Morfologia do pâncreas. A ilhota pancreática, porção endócrina, é composta basicamente por quatro tipos celulares  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e PP. A parte exócrina é composta por aglomerações de células acinares, que formam os ácinos e células ductais (não expostas no esquema). Fonte: A autora.

Quando o organismo não possui níveis suficientes de insulina, ocorre a ativação da enzima lipase nas células adiposas. A lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos que estão estocados, gerando a liberação de ácidos graxos e de glicerol no sangue. E assim, os ácidos graxos livres servem como principal substrato energético para os tecidos. Sabe-se que a secreção de insulina pode ser controlada tanto pelo nível da glicemia, pelos aminoácidos sanguíneos e outros fatores (ALWAHSH et al., 2017).

De acordo com as alterações da secreção da insulina e da sensibilidade, desenvolve duas patologias: diabetes melito tipo 1 (DM1) e diabetes melito tipo 2 (DM2) (CANIVELL; GOMIS, 2014). O DM1 é desenvolvido pela diminuição da secreção de insulina e isso leva o aumento da glicemia no organismo, enquanto o DM2 é causado pela redução da sensibilidade do tecido-alvo aos efeitos da insulina, caracterizando resistência ao hormônio, geralmente levando ao aumento da concentração plasmática de insulina (CANIVELL; GOMIS, 2014).

Já o glucagon é um hormônio secretado quando ocorre a diminuição da glicemia e possui função oposta a insulina. Ele estimula a degradação do glicogênio hepático (glicogenólise) promovendo o aumento da glicemia, aumenta a captação de aminoácidos pelas células hepáticas e converte em glicose (gliconeogênese), e ele também ativa a lipase disponibilizando ácidos graxos como substrato energético para alguns tecidos. Sua secreção pode ser regulada negativamente pelo aumento da glicemia, já o aumento dos aminoácidos no sangue e o exercício físico estimulam a sua secreção (KULKARNI, 2004).

## **1.6. Justificativa e hipótese**

Considerando a importância do pâncreas e do TAM, na regulação de atividades metabólicas, e da utilização do isoproterenol (1mg/ml/kg) para indução de alterações morfológica cardíaca, ainda pouco se sabe sobre a relação da estimulação adrenérgica em parâmetros metabólicos, levando em consideração poucos estudos sobre as alterações metabólicas em modelos de remodelamento cardíaco induzido pelo isoproterenol. Nesse estudo hipotetizamos que a estimulação adrenérgica causada pela administração de isoproterenol pode gerar alterações metabólicas, podendo exercer ações que influenciam na morfologia, principalmente no pâncreas e TAM.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do modelo de hipertrofia cardíaca em estruturas corporais funcionalmente relacionadas com o sistema metabólico em ratos Wistar adultos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar em ratos Wistar machos, o efeito da administração de isoproterenol:

- na massa corporal durante o período de administração;
- na homeostase da glicose através do teste de tolerância a glicose via oral e via intravenosa;
- nas massas do coração, pâncreas, fígado, adrenal, tecido adiposo branco e marrom;
- em parâmetros bioquímicos séricos, como colesterol total, triglicerídeos, Transaminase glutâmico pirúvica, Frutosamina e Lactato desidrogenase;
- em parâmetros morfológicos do coração, duodeno, pâncreas e TAM, como diâmetro dos cardiomiócitos, fibrose perivascular, fibrose intersticial, altura do vilo, área das ilhotas pancreáticas, fibrose intersticial acinar e área de adipócitos.
- por Western Blot, a expressão AMPK alpha-1, p-AMPK alpha-1, UCP1 e  $\beta$ 3-AR no TAM.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais**

Todos os protocolos envolvendo a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), sob protocolo 011/17, e realizados de acordo com as normativas preconizadas pelo CONCEA.

#### **3.2. Modelo experimental**

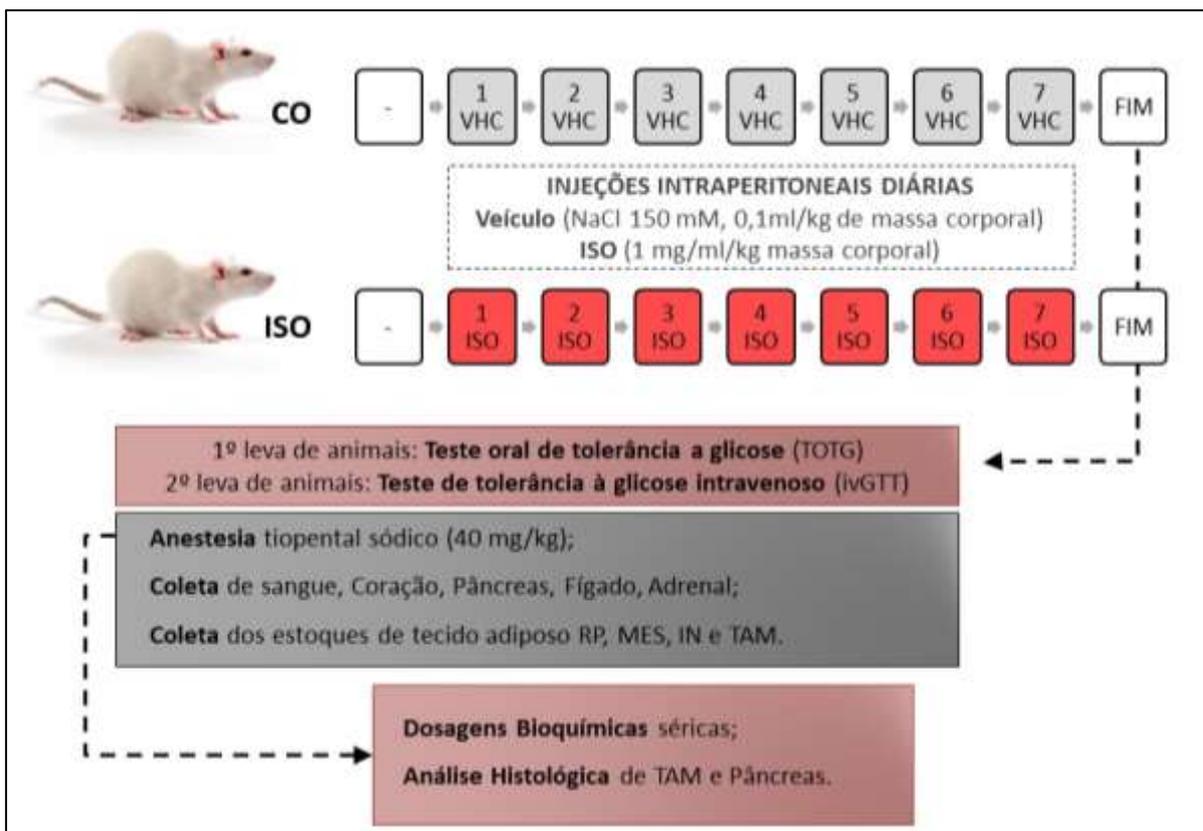
Ratos Wistar machos, aproximadamente 50 dias de idade (200-250g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, foram acomodados em caixas de polipropileno, com água filtrada e ração padrão para roedores (Nuvilab, Quimtia, Colombo, Brasil) em regime *ad libitum*. Os animais foram mantidos em temperatura e ciclo claro-escuro controlados ( $23\pm 2$  °C; 12/12h). Os animais passaram por período de ambientação durante 7 dias, antes do início da administração de ISO (n=11) ou veículo (n=11).

Após o período de ambientação os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais: animais controle (CO) nos quais foram realizadas injeções de veículo (NaCl 150 mM, 0,1ml/kg de massa corporal/dia, i.p.); e animais que receberam isoproterenol (ISO; 1mg/kg de massa corporal/dia, i.p.). As administrações de Veículo ou ISO se deram durante 7 dias consecutivos, entre 8h e 10h (Figura 5).

No presente estudo, foi realizado duas levadas de animais para a realização de experimentos *in vivo*. Sendo a primeira leva para a realização do teste oral de tolerância a glicose, e a coleta de amostras para posteriores análises. E a segunda leva foi para a realização do teste intravenoso de tolerância a glicose.

### **3.3. Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)**

No último dia do tratamento, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas para a realização do TOTG. Inicialmente, foi coletada amostra de sangue na extremidade caudal para a leitura da glicemia basal. Amostras de sangue foram coletadas 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de solução de glicose por via oral (2 ml/kg de massa corporal; GOMES, 2017). A glicemia foi medida com glicosímetro comercial com fitas descartáveis (On Call Plus, San Diego, Califórnia, USA).



**Figura 5.** Delineamento experimental. Retroperitoneal (RP), Mesentérico (MÊS), Inguinal (IN) e Tecido Adiposo Marrom (TAM). Fonte: A autora.

### 3.4. Teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)

No último de tratamento, outra leva de animais foram anestesiados com Cetamina + Xilazina 80 mg (C) + 5 mg (X) /Kg de massa corporal; Syntec, São Paulo, Brasil) e submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de uma cânula de silicone na veia jugular direita. Após o jejum de 8 horas, foi coletado amostra de sangue na extremidade caudal para a leitura da glicemia basal. Em seguida foi administrada por via intravenosa solução de glicose (1 ml/kg de massa corporal), durante 30 segundos e amostras de sangue foram coletadas 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose (GOMES, 2017). A glicemia foi medida com glicosímetro comercial com fitas descartáveis (On Call Plus, SanDiego, Califórnia, USA).

### **3.5. Eutanásia e Coleta de amostras**

Ao final dos 7 dias do protocolo experimental, os animais passaram por jejum de 12 horas para posterior coleta de tecidos. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (i.v., 40 mg/kg de massa corporal; Thiopentax, Cristália, São Paulo, Brasil) para a coleta de sangue por punção venosa da veia cava inferior com agulha e seringa estéreis. Após a coleta os animais foram eutanasiados por exsanguinação. As amostras de sangue obtidas foram depositadas em tubos sem heparina e centrifugadas para a coleta do soro (3000 rpm, 5 min), e em seguida armazenadas a -20 °C.

Após a coleta do sangue foram coletados e dissecados o coração, duodeno, pâncreas e tecido adiposo marrom. Amostras dos referidos órgãos foram fixados em formaldeído 10% durante 24 horas, em seguida foram realizados banhos sequenciais de PBS, álcool 20%, álcool 50% e, por fim, as amostras foram armazenadas em álcool 70%. A troca das soluções se deu a cada uma hora. Importante ressaltar que para análise histológica do duodeno, foi separado uma porção dele, realizado corte transversal e com auxílio de uma seringa com ponteira foi feito a limpeza do duodeno. Em seguida, ele foi fixado em pedaço de isopor e aderido com alfinete.

Para análises moleculares, fragmentos do TAM foram imediatamente congeladas, e armazenadas a -80 °C.

### **3.6. Análises bioquímicas de parâmetros metabólicos**

A medida dos níveis séricos de Colesterol total, Triglicerídeos, Transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Frutosamina e Lactato desidrogenase (LDH), foram realizadas por métodos enzimáticos-colorimétricos com kits comerciais, seguindo as informações do fabricante (BIOCLIN, Minas Gerais, Brasil).

### **3.7. Preparação das amostras para análises histológicas**

Amostras previamente fixadas de pâncreas e tecido adiposo marrom foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (80%, 90% e 100%; Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), diafanizadas em xilol 100% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e por fim, foram incluídas em parafina (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Os materiais foram seccionados em 5 µm de espessura utilizando um micrótomo

(RM2245, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Lâminas do coração e pâncreas também foram coradas com *Picrosirius Red* para a marcação do colágeno intersticial.

### **3.8. Avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos**

Utilizando um microscópio ótico (DM500 + ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital, fotomicrografias contendo cortes transversais de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram obtidas, corados com HE. Posteriormente, utilizando o software ICY (Institut Pasteur, Paris, França. <http://icy.bioimageanalysis.org/>) foi analisado a distância entre as extremidades da membrana na altura do núcleo de 10 células por animal. A média e erro padrão de média foram calculados do diâmetro dos cardiomiócitos, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}$  e comparados entre os grupos.

### **3.9. Avaliação da fibrose perivascular no coração**

As fotomicrografias contendo a marcação do colágeno ao redor das arteríolas, em cortes transversais, foram analisadas com o *software* ICY (Institut Pasteur, Paris, França. <http://icy.bioimageanalysis.org/>). O índice de fibrose perivascular (IFP) foi calculado pela área da fibrose dividida pela área do lúmen do vaso, e expressos em unidades arbitrárias (U.A.). A média e o erro padrão de média para cada animal foram calculados, e o resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ , e comparados entre os grupos.

### **3.10. Avaliação da fibrose intersticial no coração**

As fotomicrografias contendo a marcação do colágeno no interstício, para análise do percentual de fibrose. Foi realizada análise estereológica, com malha de 594 pontos, de 15 fotomicrografias por animal, através do *software Image-Pro Plus* (versão 6.0, Media Cybernetics, São Paulo). A média e erro padrão de média foram calculados e os resultados foram comparados entre os grupos.

### **3.11. Avaliação morfológica do pâncreas**

Para a análise da área das ilhotas pancreáticas, foram realizados cortes transversais do pâncreas e coloração com HE. Foram realizadas aquisições de fotomicrografias em aumento de 400x, sendo um total de 45 imagens por grupo. Essas imagens foram utilizadas para realizar a medida da área das ilhotas pancreáticas

através do *software* ICY (Institut Pasteur, Paris, França. <http://icy.bioimageanalysis.org/>). Para realização das medidas, foram feitas marcações do perímetro ao redor de cada ilhota. Depois de prévia calibração do *software*, que realiza automaticamente o cálculo da área das ilhotas, os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.12. Avaliação da fibrose intersticial no pâncreas**

Para a análise da fibrose intersticial no pâncreas, os cortes foram corados com *Picrosirius Red*, e foi realizada análise estereológica com malha de 594 pontos, através do *software Image-Pro Plus* (versão 6.0, Media Cybernetics, São Paulo). 10 campos em aumento de 400x foram analisados para cada animal. Os resultados foram expressos em porcentagem da área total analisada (%).

### **3.13. Morfometria das vilosidades duodenais**

Para a análise da altura do vilo do duodeno, os cortes não seriados foram corados com HE. Em seguida fotomicrografias em aumento de 400x foram analisadas através do *software* ICY (Institut Pasteur, Paris, França. <http://icy.bioimageanalysis.org/>). Foram analisados 10 vilos em 5 fotomicrografias para cada animal. A média e erro padrão de média foram calculados da altura dos vilos, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}$  e comparados entre os grupos.

### **3.14. Morfometria dos adipócitos marrons**

Para a análise da área dos adipócitos marrons, foram realizados cortes não seriados do tecido adiposo marrom, e posterior coloração com HE. Em seguida fotomicrografias em aumento de 400x foram analisadas através do *software* ICY (Institut Pasteur, Paris, França. <http://icy.bioimageanalysis.org/>). Foram analisados 5 adipócitos distribuídos em ao menos 5 fotomicrografias para cada animal. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.15. Western Blot**

Alíquotas de 30  $\mu\text{g}$  de proteína de amostras de Tecido Adiposo Marrom (n=5 por grupo), foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE, Berckinghamshire, UK). Posteriormente, as membranas foram

incubadas com anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse (AMPK (BS,1115r), pAMPK (PA5114550), UCP1 e  $\beta$ 3-AR. Posteriormente as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, específico para cada anticorpo primário, por 1h30 e reveladas com solução para detecção por quimiluminescência (Amersham Biosciences, Londres, UK). A quimiluminescência foi detectada por um sistema de aquisição de imagens (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). A intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica relativa utilizando o software ImageJ (NIH, MA, USA). B-actina (A2228) e GAPDH foram utilizadas como controle de carga. A razão entre as densidades ópticas das proteínas de interesse e do controle de carga foi feita, e os resultados expressos em % do controle.

**Tabela 1.** *Anticorpos, source e diluição.*

<b>ANTICORPO</b>	<b>SOURCE</b>	<b>DILUIÇÃO</b>
<b>Anti-AMPK</b>	Rabbit monoclonal	1:1000
<b>Anti-pAMPK</b>	Rabbit monoclonal	1:1000
<b>Anti-UCP1</b>	Rabbit monoclonal	1:1000
<b>Anti-<math>\beta</math>3AR</b>	Goat monoclonal	1:1000
<b>Anti- B-actina</b>	Mouse monoclonal	1:1000
<b>Anti-GAPDH</b>	Rabbit monoclonal	1:500

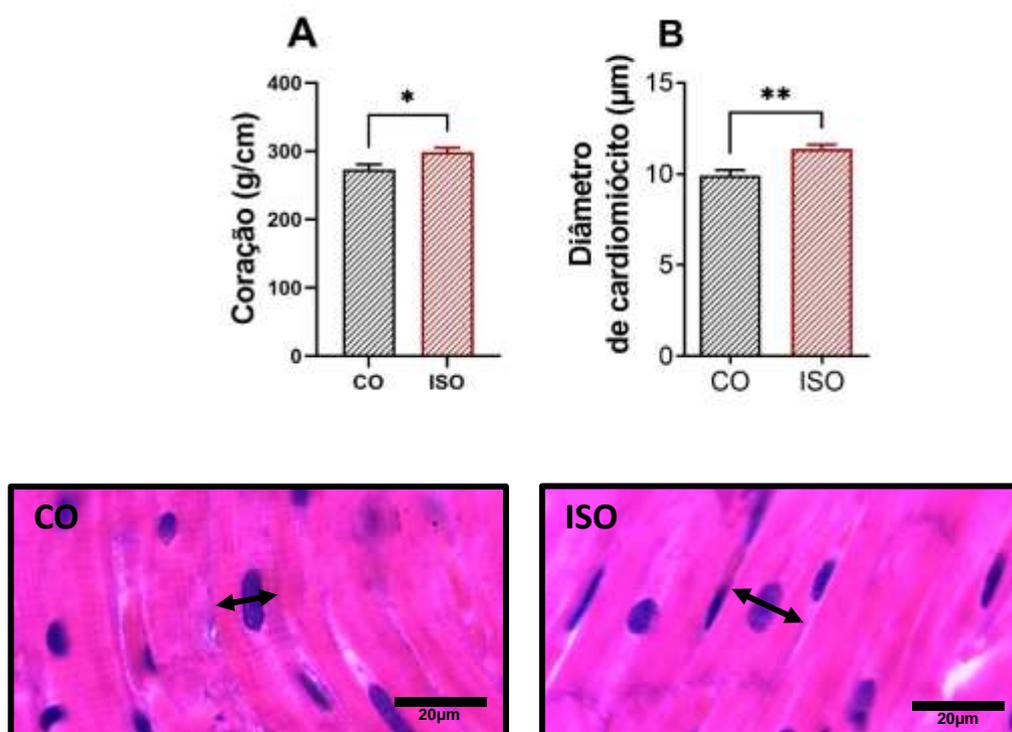
### 3.16. Análise estatística

Os dados são expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão de Média (EPM). O teste estatístico utilizado para analisar as diferenças entre os grupos foi o Teste T de *Student*. Análise de variância de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey, foi utilizada para a avaliação do ganho de massa corporal. Para todas as análises, o valor foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ . Para a análise estatística e produção gráfica dos resultados foi utilizado o software *Prism* (v 9.01; GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

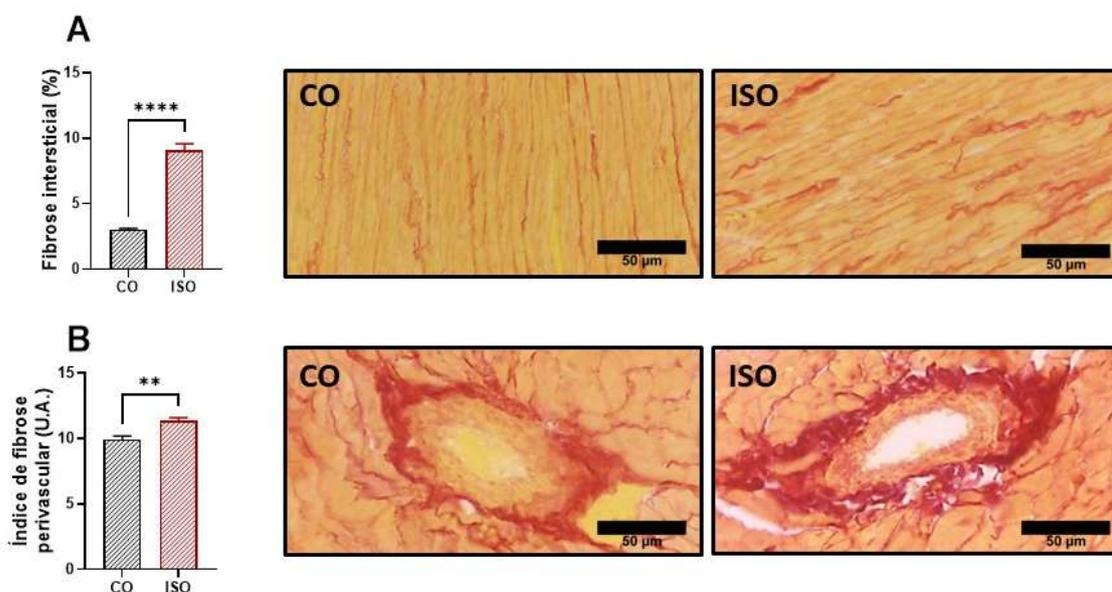
### 4.1. Efeito da administração de isoproterenol na histologia do coração de ratos Wistar adultos

Para a confirmação do modelo foi analisado o peso do coração e realizado a análise da morfologia cardíaca, através da espessura dos cardiomiócitos e da fibrose intersticial e perivascular. Observou-se aumento da massa cardíaca (CO  $273,1 \pm 7,53$  g/cm vs ISO  $298,9 \pm 6,39$  g/cm; Figura 6A) e do diâmetro dos cardiomiócitos (CO  $9,91 \pm 0,29$   $\mu\text{m}$  vs ISO  $11,36 \pm 0,23$   $\mu\text{m}$ ; Figura 6B) no grupo ISO, quando comparado ao grupo controle.



**Figura 6.** Efeito da administração de isoproterenol no peso do coração e nos cardiomiócitos de ratos Wistar adultos. Massa do coração (A) e Diâmetro dos cardiomiócitos (B). Imagens representativas de cortes corados com H&E (aumento 1000x), as barras equivalem a 20 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Análise de teste t *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

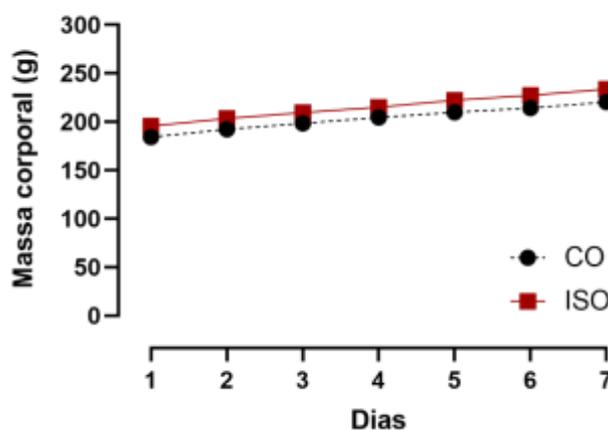
Avaliando a fibrose no coração observamos aumento da fibrose intersticial (CO  $3,00 \pm 0,10$  % vs ISO  $9,09 \pm 0,48$  %; Figura 7A) e da fibrose perivascular (CO  $25,30 \pm 2,94$  U.A. vs ISO  $68,42 \pm 6,09$  U.A.; Figura 7B) no grupo ISO, quando comparado ao grupo CO.



**Figura 7.** Efeito da administração de isoproterenol na fibrose intersticial e perivascular de ratos Wistar adultos. Fibrose intersticial (A) e Índice de fibrose perivascular (B); Imagens representativas de cortes corados com *Picrosirius Red* (aumento 400x), as barras equivalem a 50 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Análise de teste t *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.2. Efeito da administração de isoproterenol na massa corporal de ratos Wistar adultos

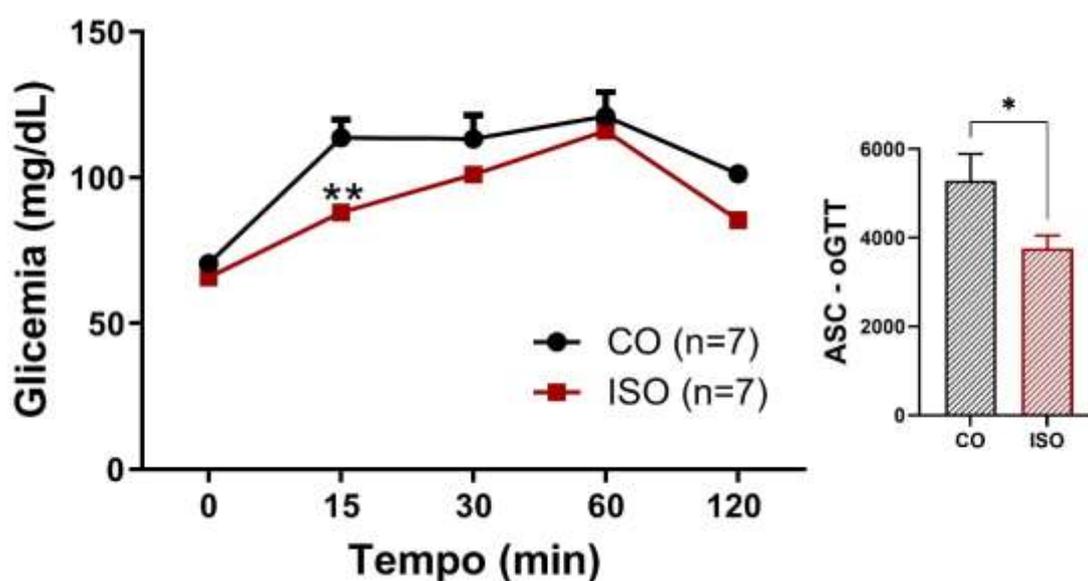
Durante o período experimental não foi observada nenhuma alteração na massa corporal entre os grupos (Figura 8). Ambos os grupos tiveram ganho de peso proporcional.



**Figura 8.** Efeito da administração de isoproterenol na massa corporal de ratos Wistar adultos. Massa corporal de animais do grupo CO (círculos pretos) e animais do grupo ISO (quadrados vermelhos) durante o período experimental. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Análise de Variância de duas vias (ANOVA two-way) foi utilizada, seguida do pós-teste de Tukey.

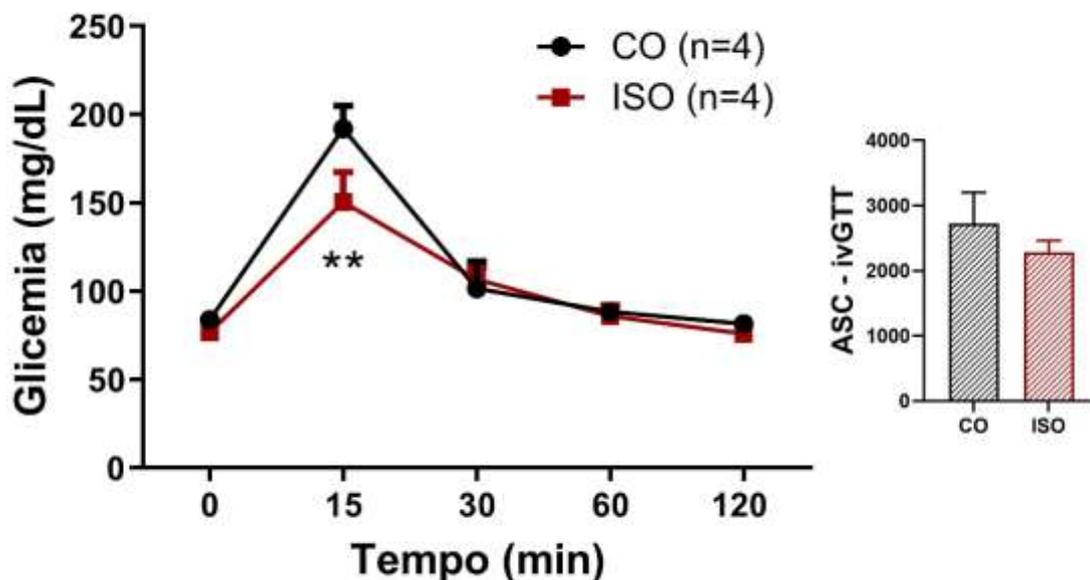
#### 4.3. Efeito da administração de isoproterenol na homeostase da glicose de ratos Wistar adultos

Não houve diferença significativa na glicemia basal do grupo ISO quando comparado ao grupo CO (CO  $70,57 \pm 12,29$  mg/dL vs ISO  $65,86 \pm 15,86$  mg/dL; Figura 9), no entanto após a administração no tempo de 15 minutos houve redução da glicemia no grupo ISO (CO  $113,7 \pm 13,97$  mg/dL vs ISO  $88 \pm 11,80$  mg/dL; Figura 9). Além disso, ao calcular a área sob a curva (ASC) encontramos diferença significativa (CO  $5283 \pm 613,1$  U.A. vs ISO  $3758 \pm 292,6$  U.A.; Figura 9) entre os animais CO e ISO.



**Figura 9.** Efeito da administração de isoproterenol na homeostase da glicose de ratos Wistar adultos durante o TOTG. Glicemia de animais do grupo CO (círculos pretos) e animais do grupo ISO (quadrados vermelhos). Área sob a curva (a direita). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Análise de Variância de duas vias (ANOVA two-way) foi utilizada, seguida do pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

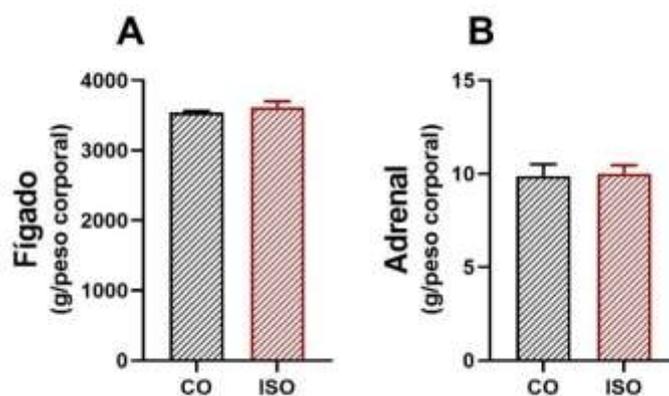
O grupo ISO teve diminuição da glicemia no tempo de 15 minutos do ivGTT em comparação ao grupo CO (CO  $192 \pm 35,2$  mg/dL vs ISO  $150,5 \pm 41,50$  mg/dL; Figura 10), no entanto quando foi calculado ASC não encontramos diferença significativa (CO  $2721 \pm 483,9$  U.A. vs ISO  $2290 \pm 172,1$  U.A.; Figura 10).



**Figura 10.** Efeito da administração de isoproterenol na homeostase da glicose de ratos Wistar adultos, durante o ivGTT. Glicemia de animais do grupo CO (círculos pretos) e animais do grupo ISO (quadrados vermelhos). Área sob a curva (à direita). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Análise de Variância de duas vias (ANOVA two-way) foi utilizada, seguida do pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.4. Efeito da administração de isoproterenol em parâmetros morfométricos de ratos Wistar adultos

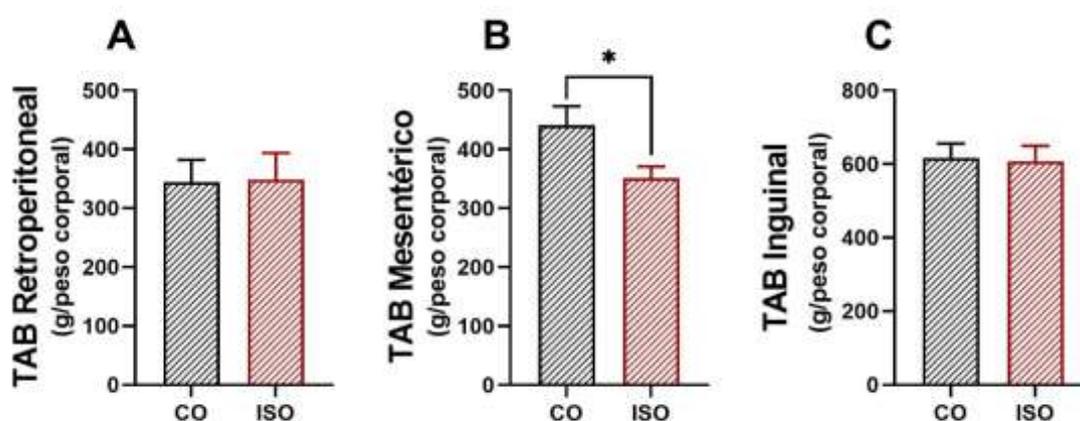
Não foram detectadas alterações na massa do fígado (CO  $3537 \pm 26,21$  g/peso corporal vs ISO  $3617 \pm 86,40$  g/peso corporal; Figura 11A) ou da glândula adrenal (CO  $9,86 \pm 0,64$  g/peso corporal vs ISO  $10,01 \pm 0,44$  g/peso corporal; Figura 11B).



**Figura 11.** Efeito da administração de isoproterenol em dados morfométricos de ratos Wistar adultos. Massa do fígado (A), e massa da adrenal (B) normalizadas pela massa corporal. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de Student. \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.5. Efeitos da administração de isoproterenol nos depósitos de gordura de ratos Wistar adultos

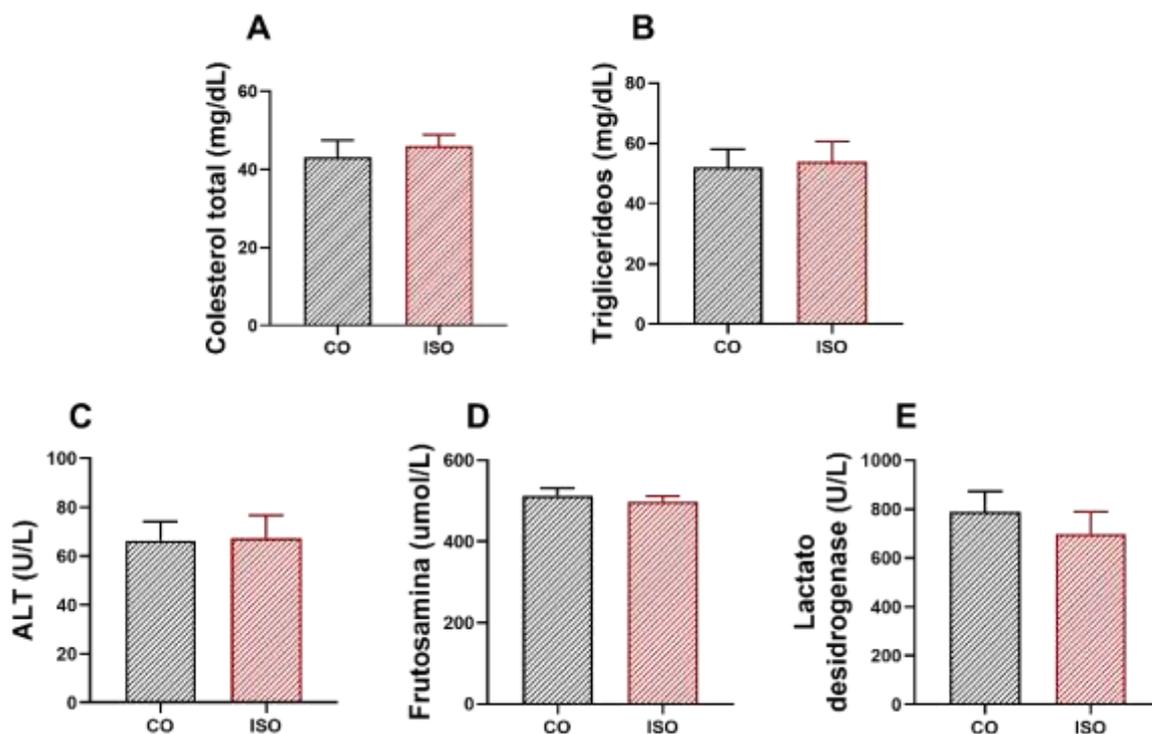
Apesar de não alterar a massa corporal, a administração de ISO alterou a massa do tecido adiposo branco mesentérico (CO  $441,5 \pm 31,95$  g/peso corporal vs ISO  $351,1 \pm 19,81$  g/peso corporal; Figura 12B). Entretanto, não houve alteração na massa do tecido adiposo branco retroperitoneal (CO  $344,5 \pm 37,66$  g/peso corporal vs ISO  $348,7 \pm 45,39$  g/peso corporal; Figura 12A) e inguinal (CO  $617,1 \pm 38,22$  g/peso corporal vs ISO  $606,9 \pm 42,83$  g/peso corporal; Figura 12C).



**Figura 12.** Efeitos da administração de isoproterenol nos depósitos de gordura de ratos Wistar adultos. Tecido adiposo branco retroperitoneal (A), tecido adiposo branco mesentérico (B) e tecido adiposo branco inguinal (C). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.6. Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar adultos

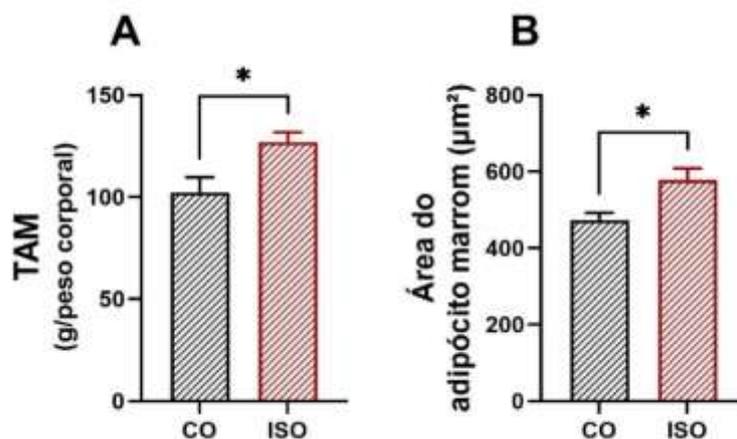
A administração de ISO não afetou as concentrações séricas de colesterol total (CO  $43,19 \pm 4,27$  mg/dL vs ISO  $46,04 \pm 2,79$  mg/dL; Figura 13A) e triglicerídeos (CO  $52,09 \pm 5,99$  mg/dL vs ISO  $53,85 \pm 6,70$  mg/DI; Figura 13B). Além disso, os níveis de ALT (CO  $66,41 \pm 7,77$  U/L vs ISO  $67,32 \pm 9,37$  U/L; Figura 13C), Frutosamina (CO  $512,8 \pm 18,71$  umol/L vs ISO  $498,8 \pm 12,65$  umol/L; Figura 13D) e Lactato desidrogenase (CO  $787,4 \pm 85,43$  U/L vs ISO  $698 \pm 91,32$  U/L; Figura 13E) também foram similares aos do grupo controle.

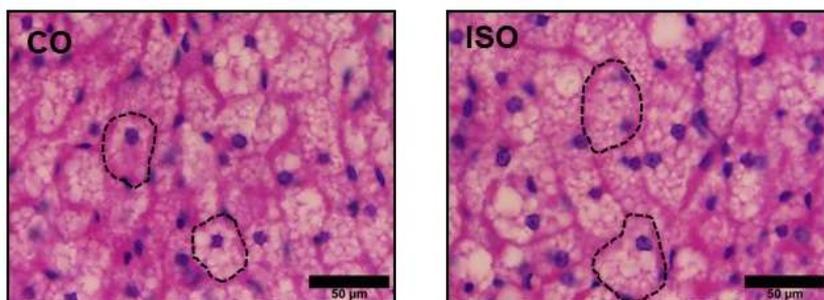


**Figura 13.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar adultos. Colesterol total (A), Triglicérides (B), ALT (C), Frutosamina (D) e Lactato desidrogenase (E). Dados expressos em Média ± EPM. Teste t de *Student*.

#### 4.7. Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos

Além do aumento da massa relativa do TAM (CO  $102,1 \pm 7,56$  g/peso corporal vs ISO  $127,1 \pm 4,76$  g/peso corporal; Figura 14A), a administração de ISO foi capaz de promover hipertrofia de adipócitos marrons quando comparado ao grupo CO (CO  $472 \pm 20,16$  g/peso corporal vs ISO  $577,5 \pm 30,97$  g/peso corporal; Figura 14B).

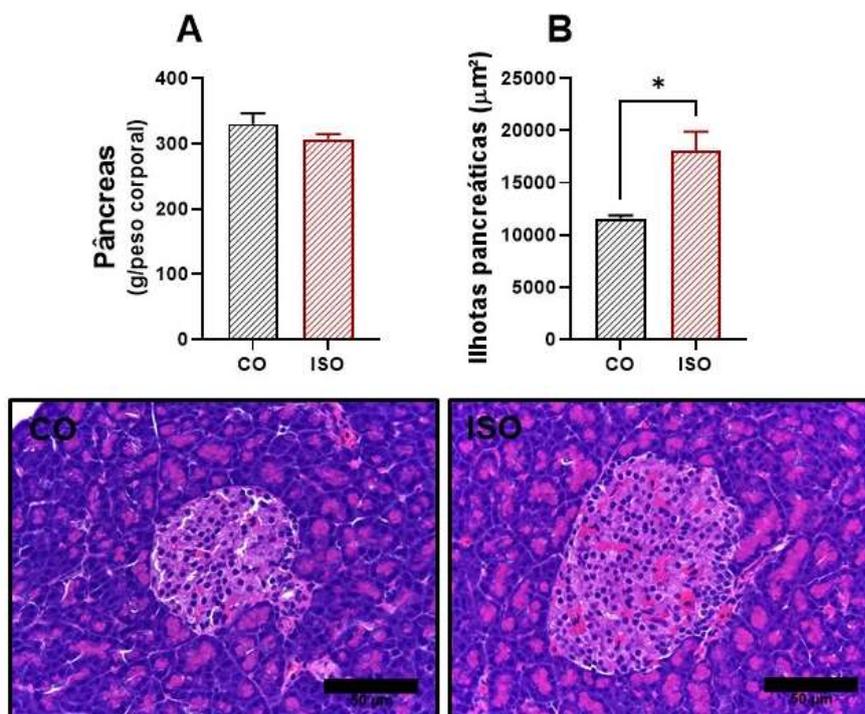




**Figura 14.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. Peso do TAM (A) e área dos adipócitos do TAM (B). Imagens representativas de cortes corados com H&E (aumento 400x), as barras equivalem a 50 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.8. Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfométricos e morfológicos pancreáticos de ratos Wistar adultos

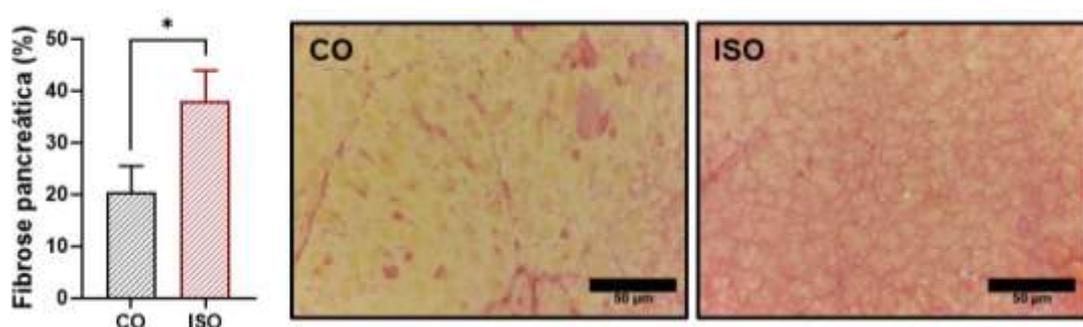
No pâncreas foi observado aumento da área de secção transversa de ilhotas pancreáticas em animais ISO (CO  $11573 \pm 306,8 \mu\text{m}^2$  vs ISO  $18026 \pm 1862 \mu\text{m}^2$ ; Figura 15B), sem alteração na massa do pâncreas (CO  $330,2 \pm 16,49 \text{ g/peso corporal}$  vs ISO  $306,7 \pm 7,68 \text{ g/peso corporal}$ ; Figura 15A), quando comparados aos animais do grupo CO.



**Figura 15.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos pancreáticos de ratos Wistar adultos. Massa do pâncreas (A), Análise da área de ilhotas pancreáticas (B). Imagens

representativas de cortes corados com H&E (aumento 400x), as barras equivalem a 50 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

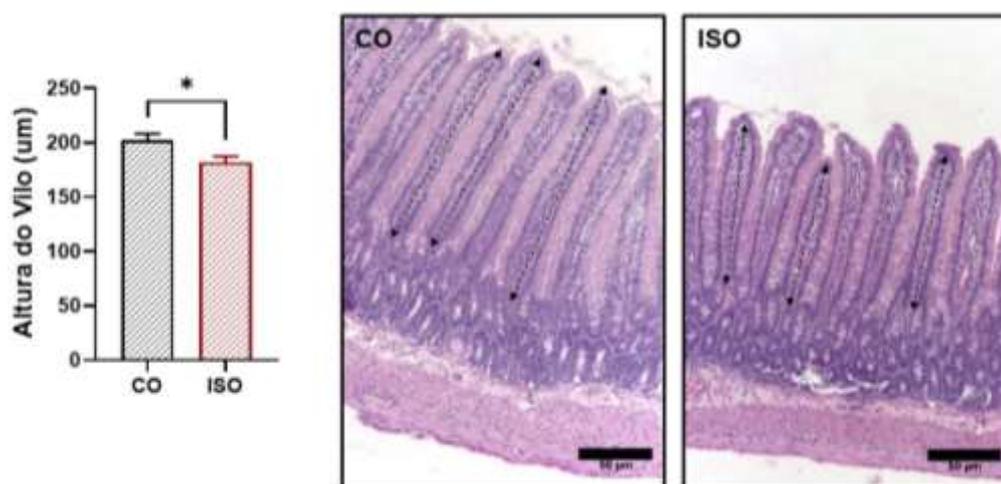
Além da hipertrofia das ilhotas pancreáticas, foram observados incrementos na marcação de fibras colágenas em regiões intersticiais acinares no pâncreas dos animais do grupo ISO quando comparado ao grupo CO (CO  $20,42 \pm 5,12$  % vs ISO  $38,21 \pm 5,75$  %; Figura 16).



**Figura 16.** Efeitos da administração de isoproterenol na fibrose pancreática de ratos Wistar adultos. Análise da fibrose em regiões intersticiais acinares através da coloração por *Picrosirius Red* e imagens representativas (aumento 400x) dos campos analisados em animais CO e ISO. As barras equivalem a 50 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.9. Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do duodeno de ratos Wistar adultos

No duodeno foi observado diminuição da altura dos vilos no grupo ISO, quando comparado ao grupo CO (CO  $201,9 \pm 6,25$   $\mu\text{m}$  vs ISO  $181,7 \pm 5,97$   $\mu\text{m}$ ; Figura 17).

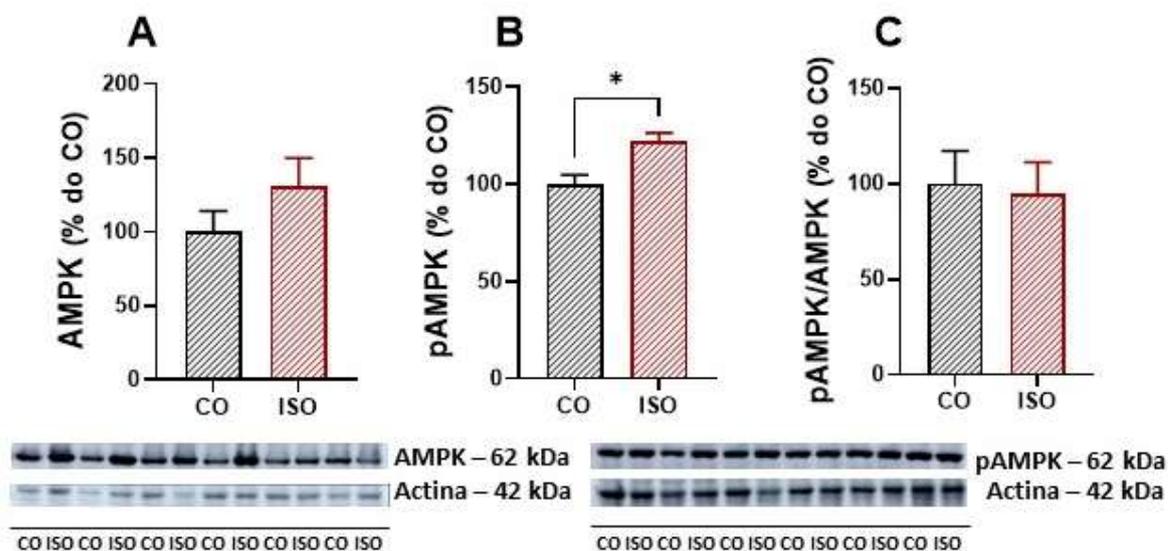


**Figura 17.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros morfológicos do duodeno de ratos Wistar adultos. Análise da altura do vilos do duodeno e imagens representativas de cortes corados com

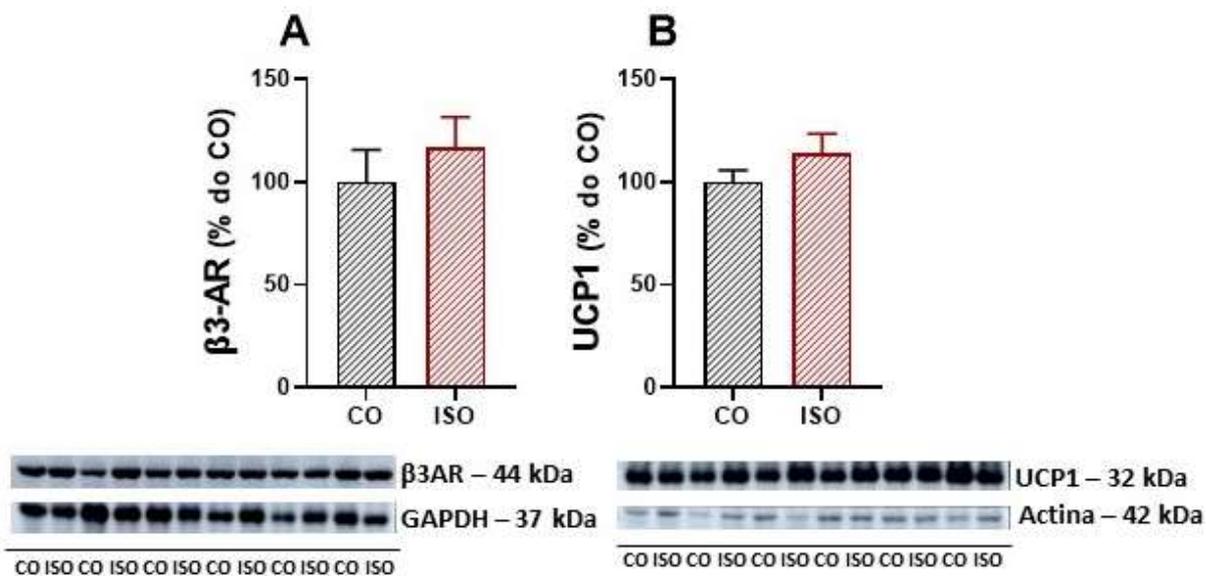
H&E (aumento 400x), as barras equivalem a 50 micrômetros. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.10. Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros moleculares do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos

Sabendo das alterações morfométricas e morfológicas encontradas no TAM, foi avaliado a expressão de pAMPK, AMPK, B3AR e UCP1 por meio do Western Blot. Não houve alteração na expressão da AMPK total (CO  $100 \pm 14,03$  % do CO vs ISO  $130,7 \pm 19,21$  % do CO; Figura 18A), no entanto observou-se aumento da pAMPK (CO  $100 \pm 4,75$  % do CO vs ISO  $122,1 \pm 4,20$  % do CO; Figura 18B) no grupo ISO quando comparado ao grupo CO. Ao fazer a razão entre AMPK fosforilada pela AMPK total (CO  $100 \pm 17,24$  % do CO vs ISO  $94,64 \pm 16,65$  % do CO; Figura 18C) não encontramos nenhuma diferença significativa. Não foi observado alteração na expressão  $\beta 3$ -AR (CO  $100 \pm 15,59$  % do CO vs ISO  $116,7 \pm 14,87$  % do CO; Figura 19A) e UCP1 (CO  $100 \pm 5,73$  % do CO vs ISO  $113,9 \pm 9,55$  % do CO; Figura 19B) entre os grupos.



**Figura 18.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros moleculares do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. Expressão de AMPK (A), pAMPK (B) e pAMPK/AMPK (C). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$



**Figura 19.** Efeitos da administração de isoproterenol em parâmetros moleculares do tecido adiposo marrom de ratos Wistar adultos. Expressão de  $\beta 3\text{-AR}$  (A) e UCP1 (B). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar os efeitos da estimulação adrenérgica induzida pela administração de ISO em parâmetros morfológicos no pâncreas e tecido adiposo marrom, órgãos reconhecidamente influenciados pelo aumento do tônus simpático e seus efetores. Nossa hipótese central foi de que outras alterações morfofisiológicas poderiam ocorrer para além dos efeitos já bem descritos na literatura com relação ao coração, dessa forma considerando que estudos integrativos possam trazer melhor entendimento sobre as doenças cardiometabólicas. Além da clássica hipertrofia cardíaca, os animais do grupo ISO sofreram alterações nas massas do tecido adiposo mesentérico, tecido adiposo marrom (TAM), aumento na deposição de colágeno no pâncreas, além de hipertrofia de ilhotas pancreáticas e de adipócitos marrons, e redução da altura dos vilos do duodeno.

Corroborando os dados já existentes na literatura, não observamos alterações no ganho de massa corporal em animais tratados com ISO na dose de 1 mg/kg. Outros estudos não observaram efeito das injeções de ISO na massa corporal com doses até 5 mg/kg (DE PONTE et al., 2017; KHDHIRI et al., 2021). Entretanto, doses maiores por períodos curtos de tempo podem levar a diminuição da massa corporal (MOHAN MANU et al., 2022; ZAITONE; ABO-GRESHA, 2012). Quando avaliada a massa do coração, foi constatado o efeito hipertrófico do ISO corroborando com outros estudos (DE PONTE et al., 2017; KHDHIRI et al., 2021; MOHAN MANU et al., 2022; ZAITONE; ABO-GRESHA, 2012).

Apesar de ser um fármaco que age praticamente em todo o organismo, poucos estudos avaliam o efeito da administração do ISO fora do sistema cardiovascular ou glândulas exócrinas. Neste estudo não detectamos alterações nas massas do pâncreas e fígado órgãos importantes para o metabolismo, ou nas glândulas adrenais responsáveis pela síntese de catecolaminas e hormônios tais como a corticosterona, aldosterona e andrógenos.

Além de não influenciar o ganho de massa corporal, a administração de ISO não promoveu alterações na massa dos depósitos de gordura retroperitoneal e inguinal, que são representativos da gordura visceral e subcutânea respectivamente. Apesar disso, os estoques de tecido adiposo mesentérico foram menores em animais

do grupo ISO, evidenciando que há algum mecanismo de resposta diferencial na resposta do tecido adiposo visceral mesentérico ao estímulo adrenérgico. De fato, já foi demonstrado que os adipócitos originários de estoques viscerais são mais responsivos a estimulação adrenérgica que adipócitos subcutâneos (COLLINS, 2012). Dessa forma, nossa hipótese é de tenha ocorrido maior lipólise na gordura mesentérica levando a redução da massa desse tecido. Contudo, mais estudos são necessários para demonstrar os mecanismos envolvidos nesses possíveis efeitos lipolíticos. Reconhecidamente, a estimulação adrenérgica é eficaz na diminuição da secreção do hormônio leptina tanto em tecido adiposo subcutâneo quanto omental, o que favorece a diminuição de um estado de saciedade e conseqüente busca por nutrientes, além de promover a liberação de glicerol para a circulação fornecendo nutrientes para o metabolismo celular (JOCKEN et al., 2008; RICCI; FRIED, 1999). Vale ressaltar, que apesar dos adipócitos expressarem majoritariamente o subtipo  $\beta$ 3-AR dos receptores adrenérgicos, e que o ISO estimula pouco esses receptores, estudos recentes mostram que tanto tecido adiposo branco quanto o marrom expressam quantidade significativa de receptores adrenérgicos do subtipo  $\beta$ 2-AR (LANGE et al., 2005).

Nos parâmetros bioquímicos séricos avaliados, não foram encontradas alterações devido a administração de ISO. Apesar da hipotética maior mobilização dos estoques do tecido adiposo visceral, não foram encontradas alterações nas concentrações séricas de triglicérides. Entendemos que seja importante avaliar os níveis de ácidos graxos livres e glicerol, em estudos seguintes, principalmente para confirmar a hipótese de aumento da lipólise em adipócitos dos estoques do tecido adiposo mesentérico. Também foram avaliadas as concentrações séricas de marcadores de danos teciduais e da glicemia a longo prazo, respectivamente ALT, LDH e frutossamina, os quais se mantiveram inalterados. Ao contrário de outros modelos, hipotetizamos que a dose utilizada nesse estudo não foi capaz de agir com severidade nas concentrações de LDH, como em estudos que utilizaram doses mais elevadas, independente do tempo (DE PONTE et al., 2017; KHDHIRI et al., 2021; MOHAN MANU et al., 2022; ZAITONE; ABO-GRESHA, 2012).

Ao contrário da diminuição na massa do tecido adiposo mesentérico, ao qual foi hipotetizada uma maior resposta ao estímulo por ISO nos adipócitos brancos, houve aumento da massa do tecido adiposo marrom interescapular e hipertrofia dos

adipócitos desse tecido. A princípio, esse efeito poderia ser atribuído a maior atividade adrenérgica via receptores adrenérgicos do subtipo  $\beta$ 2-AR encontrados nos adipócitos marrons, já que recentes pesquisas mostram que não somente os receptores  $\beta$ 3-AR são reguladores da termogênese no TAM, e que os receptores  $\beta$ 1-AR são responsáveis pela resposta mais massiva em decorrência do estímulo adrenérgico (RIIS-VESTERGAARD et al., 2020). Contudo, a estimulação isolada de receptores  $\beta$ 3-AR com agonistas seletivos, também leva a maior termogênese (CERO et al., 2021). No entanto, com o resultado morfológico encontrado no TAM hipotetizamos que os animais do grupo ISO apresentariam maior termogênese, porém não encontramos nenhuma alteração tanto na expressão do  $\beta$ 3-AR quanto na expressão de UCP1, além de não apresentarem alteração na expressão da AMPK total e na sua forma fosforilada, que apresentam papel importante na sinalização intracelular e atuam na homeostase energética do organismo. Diante esses resultados encontrados podemos inferir que a dose usada de 1mg/kg e o tempo de administração, não promoveram alterações intracelulares e na expressão de receptores como observado.

Para além da função termogênica, o papel endócrino do TAM recentemente vem sendo discutido. O TAM é ativado após injúria cardíaca, e pode contribuir para a atenuação dos efeitos da estimulação adrenérgica por meio da secreção de adipocinas (THOONEN et al., 2015). No entanto, por meio das análises realizadas e dos resultados encontrados, não é possível afirmar se a hipertrofia observada tem alguma relação com o aumento ou diminuição da atividade termogênica, dessa forma, é possível que outras rotas metabólicas estejam envolvidas nessas mudanças morfológicas do TAM, podendo inclusive ser devido a um papel tampão de armazenamento de triglicérides no TAM em condições de maior mobilização de ácidos graxos do TA mesentérico, mais estudos precisam ser realizados para confirmarmos essa hipótese ou identificar qualquer outro possível mecanismo. Além disso, foi observado redução da altura dos vilos duodenais, essa alteração pode impactar na função intestinal, no entanto ainda é necessário investigar quais as consequências que podem impactar no duodeno diante essa alteração morfológica.

Nesse estudo foi o observado aumento das ilhotas pancreáticas e aumento na fibrose intersticial em áreas acinares no grupo ISO, indicando remodelamento do pâncreas. Sabe-se que a estimulação adrenérgica promove regulação da atividade endócrina no pâncreas através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (SANTULLI et al.,

2012). Estudo com deleção simultânea dos genes que codificam para os três subtipos de  $\beta$ -adrenérgicos mostram diminuição da tolerância a glicose nesses animais, e que o receptor  $\beta$ 2-adrenérgico pode desempenhar um papel crítico na regulação da insulina (ASENSIO et al., 2005; PHILIPSON, 2002; SANTULLI et al., 2012). O acionamento de vias adrenérgicas pode aumentar a expressão de PDX-1 no pâncreas, exercendo um fator protetivo no caso de indivíduos diabéticos (SAFI et al., 2017). Adicionalmente, no presente estudo o ISO não alterou a glicemia basal e os animais tornaram mais tolerantes a glicose, diante ao teste de tolerância via oral. Estudo mostrou que receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos são amplamente expressos nas ilhotas pancreáticas e podem influenciar na secreção de insulina atuando diretamente nas células beta (ASENSIO et al., 2005; PERFETTI et al., 2001). Comprovando esse mecanismo, a deleção do receptor  $\beta$ 3-adrenérgico pode ser responsável pela secreção de insulina prejudicada (ASENSIO et al., 2005), no entanto em nosso estudo com a estimulação dos  $\beta$ -adrenérgicos receptores, temos como hipótese que houve uma potencialização da resposta de tolerância a glicose no teste realizado. Mas ainda são necessários outros protocolos, como imuno-histoquímica, das células alfa e beta para analisar a produção de insulina e glucagon.

Por outro lado, o estímulo simpatomimético evocado pelo ISO pode aumentar a expressão de lipase pancreática, causando exigência adicional no metabolismo de células pancreáticas exócrinas que pode culminar no aumento de estresse oxidativo e fibrose (BAEK et al., 2018; IKENO; NASU; KUZUYA, 1983). No presente estudo foi mostrado, pela primeira vez, que há maior deposição de colágeno no pâncreas de animais tratados com ISO. Hipotetizamos que os efeitos do ISO no pâncreas possa ativar as mesmas vias que levam a estímulos pró-fibróticos no coração, que envolvem desde ativação de vias que resultam em estresse oxidativo devido à redução na atividade da Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase, a vias de transcrição gênica como a ativação de CREB e expressão de genes ADRB1, COL1 e COL3 (KHDHIRI et al., 2021; PARK et al., 2018; SU et al., 2017; YIN et al., 2016). Também é possível que assim como ocorre no remodelamento cardíaco, no remodelamento pancreático haja o aumento na deposição de colágeno, ainda que neste trabalho não foi avaliado qual o tipo de colágeno depositado (YIN et al., 2016).

O isoproterenol não foi capaz de gerar alterações na glicemia basal, mas ao avaliar a área sob a curva ao longo do TOTG foi observado redução da glicemia, indicando serem mais tolerantes a glicose, no entanto, na área sob a curva do ivGTT não encontramos nenhuma diferença significativa mostrando que a alteração na homeostase da glicose não está relacionada com a absorção de glicose. O desaparecimento da glicose no sangue depende de alguns fatores como, secreção normal da insulina e a capacidade dos tecidos captar a glicose. Sabe-se da importância do sistema nervoso simpático para a regulação do pâncreas endócrino, onde estudo mostrou a redução da resposta insulínica em idosos, onde a principal via que ocasionou o prejuízo da resposta, foi pela diminuição da sensibilidade pancreática a estimulação  $\beta$ - adrenérgica (WATTERS, 2005).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Isoproterenol é um medicamento eficaz para tratamento agudo de pacientes críticos que precisam aumentar o débito cardíaco, e quando usado de forma crônica, pode levar ao remodelamento cardíaco. No presente estudo, foi observado que no modelo estabelecido de remodelamento cardíaco, há também remodelamento pancreático e alteração da morfologia do tecido adiposo marrom e do duodeno. Contudo, apesar das alterações observadas ainda não há um mecanismo que possa ser apontado como promotor ou que tenha sido afetado pela ativação adrenérgica.

## REFERÊNCIAS

ALWAHSH, S. M. et al. Insulin production and resistance in different models of diet-induced obesity and metabolic syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

ASENSIO, C. et al. The lack of  $\beta$ -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3490–3495, 2005.

BAEK, K. et al. Blocking  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-Adrenergic Signaling Reduces Dietary Fat Absorption by Suppressing Expression of Pancreatic Lipase in High Fat-Fed Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 857, mar. 2018.

BRAUN, K. et al. Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. **Journal of Experimental Biology**, v. 121, n. Suppl 1, p. jeb165381, 2018.

BRAWLEY, L.; SHAW, A. M.; MACDONALD, A. Role of endothelium/nitric oxide in atypical  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 398, n. 2, p. 285–296, 2000.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. SUPPL.1, p. S81–S90, jan. 2014.

CASTEILLA, L. et al. Choosing an adipose tissue depot for sampling. Factors in selection and depot specificity. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 155, p. 1–19, 2001.

CERO, C. et al.  $\beta$ 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. **JCI Insight**, v. 6, n. 11, jun. 2021.

COLLINS, S.  $\beta$ -Adrenoceptor signaling networks in adipocytes for recruiting stored fat and energy expenditure. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. JAN, p. 1–7, 2012.

DAVEL, A. P. C. et al. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: A role for endothelial modulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 5, p. 629–639, 2006.

DE PONTE, M. C. et al. The Role of  $\beta$ -Adrenergic Overstimulation in the Early Stages of Renal Injury. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, n. 6, p. 1277–1289, 2017.

DERBALI, A. et al. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 281–288, 2015.

ESLER, M.; KAYE, D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 35, n. SUPPL. 4, 2000.

GAVA, A. L. et al. Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol-treated mice with cardiac hypertrophy. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 114, n. 1–2, p. 47–54, 2004.

GOMES, RM, de Paulo LF, Bonato Panizzon CPDN, Neves CQ, Cordeiro BC, Zanoni JN, Francisco FA, Piovan S, de Freitas Mathias PC, Longhini R, de Mello JCP, de Oliveira JC, Pedrino GR, da Silva Reis AA, Cecchini AL, Marçal Natali MR. Anti-Diabetic Effects of the Ethyl-Acetate Fraction of *Trichilia catigua* in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. **Cell Physiol Biochem**. 2017;42(3):1087-1097. doi: 10.1159/000478761. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28662504.

GRAHAM, R. M. Adrenergic receptors: structure and function. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 57, n. 5, p. 481–91, jul. 1990.

GRANT, M. K. O. et al. Lack of sexual dimorphism in a mouse model of isoproterenol-induced cardiac dysfunction. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0232507, jul. 2020.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: An update. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 319–356, 2001.

HAYES, J. S. et al. Effects of prolonged isoproterenol infusion on cardiac and vascular responses to adrenoceptor agonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 237, n. 3, p. 757–763, 1986.

IKENO, T.; NASU, J.; KUZUYA, H. Quantitative Changes in Amylase Activity in the Salivary Glands, Pancreas, Saliva, and Serum after Administration of Isoproterenol, Pilocarpine, and Acetylcholine. **Journal of Dental Research**, v. 62, n. 1, p. 56–57, jan. 1983.

JOCKEN, J. W. E. et al. Effect of beta-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 320–327, fev. 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KHDHIRI, E. et al. Cardiopreventive capacity of a novel (E)-N'-(1-(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) ethylidene)-4-methylbenzenesulfonohydrazide against isoproterenol-induced myocardial infarction by moderating biochemical, oxidative stress, and histological parameters. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 6, jun. 2021.

KULKARNI, R. N. The islet  $\beta$ -cell. **International Journal of Biochemistry and Cell**

**Biology**, v. 36, n. 3, p. 365–371, 2004.

LANGE, L. A. et al. Association of adipose tissue deposition and beta-2 adrenergic receptor variants: The IRAS family study. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 5, p. 449–457, 2005.

MANDVIWALA, T.; KHALID, U.; DESWAL, A. Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? **Current Atherosclerosis Reports**, v. 18, n. 5, p. 21, maio 2016.

MITCHELL, P.; MOYLE, J. © 1967 Nature Publishing Group. **Nature Publishing Group**, v. 216, p. 615–616, 1967.

MOHAN MANU, T. et al. Bacopa monniera extract mitigates isoproterenol-induced cardiac stress via Nrf2/Keap1/NQO1 mediated pathway. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 128, n. 2, p. 341–351, mar. 2022.

OELKRUG, R.; POLYMEROPOULOS, E. T.; JASTROCH, M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 185, n. 6, p. 587–606, 2015.

PARK, S. et al. Genetic Regulation of Fibroblast Activation and Proliferation in Cardiac Fibrosis. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. 1224–1235, set. 2018.

PERFETTI, R. et al. Pancreatic  $\beta$ -cells expressing the Arg64 variant of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor exhibit abnormal insulin secretory activity. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 133–144, 2001.

PHILIPSON, L. H. B-Agonists and Metabolism. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6 SUPPL., p. 313–317, 2002.

RICCI, M. R.; FRIED, S. K. Isoproterenol Decreases Leptin Expression in Adipose Tissue of Obese Humans. **Obesity Research**, v. 7, n. 3, p. 233–240, maio 1999.

RIIS-VESTERGAARD, M. J. et al. Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 4, p. e994–e1005, abr. 2020.

RODRIGUES, A. N. et al. Fatores de risco cardiovasculares, suas associações e presença de síndrome metabólica em adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 1, p. 55–60, 2009.

SAFI, S. Z. et al. Stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors plays a protective role via increased expression of RAF-1 and PDX-1 in hyperglycemic rat pancreatic islet (RIN-m5F) cells. **Archives of Medical Science**, v. 2, p. 470–480, 2017.

SANTULLI, G. et al. Age-related impairment in insulin release: The essential role of  $\beta$  2-adrenergic receptor. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 692–701, 2012.

SU, H. et al. Alterations in NO/ROS ratio and expression of Trx1 and Prdx2 in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 11, p. 1022–1028, 2017.

THOONEN, R. et al. Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 84, p. 202–211, jul. 2015.

TRINDADE, J. D. et al. Cardiovascular effects on conscious rats of pretreatment with isoproterenol for 3 days. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 3, p. 301–304, 1992.

Watters, J.M. Insulin responses to glucose and isoproterenol decrease with age. **Can J Surg**. 2005 Apr;48(2):110-6. PMID: 15887790; PMCID: PMC3211616.

WILSON, J. L.; ENRIORI, P. J. A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 108–119, 2015.

WONG, S. K. et al. Animal models of metabolic syndrome: a review. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–12, dez. 2016.

YIN, Q. et al. Downregulation of  $\beta$ -adrenoceptors in isoproterenol-induced cardiac remodeling through HuR. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

ZAITONE, S. A.; ABO-GRESHA, N. M. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: Role of iNOS and VEGF. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 134–142, set. 2012.