

Cristiane dos Santos

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE
PROTEÍNAS CHAVES EM TECIDOS PERIFÉRICOS E NO
HIPOTÁLAMO DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE
COM FRUTOSE E PREDNISOLONA E O IMPACTO DA
SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E DA
INTERRUPÇÃO DOS TRATAMENTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis,
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Cristiane dos

Avaliação de parâmetros metabólicos e de proteínas
chaves em tecidos periféricos e no hipotálamo de
ratos tratados cronicamente com frutose e
prednisolona e o impacto da suplementação com óleo de
peixe e da interrupção dos tratamentos / Cristiane
dos Santos ; orientador, Alex Rafacho - SC, 2017.
157 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

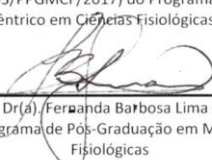
1. Ciências Fisiológicas. 2. Síndrome metabólica.
3. Frutose. 4. Glicocorticóide. I. Rafacho, Alex.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

“Avaliação de parâmetros metabólicos e de proteínas chaves em tecidos periféricos e no hipotálamo de ratos tratados com frutose e prednisolona e o impacto da suplementação com óleo de peixe”

Por

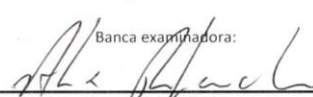
Cristiane dos Santos

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGMCF/2017) do Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC.



Prof(a). Dr(a) Fernanda Barbosa Lima Christian
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

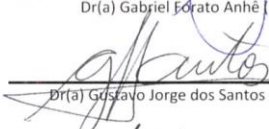
Banca examinadora:



Dr(a) Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Gabriel Forato Anhe (Universidade Estadual de Campinas)



Dr(a) Gustavo Jorge dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Afonso Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu orientador, professor Dr. Alex Rafacho por todas as oportunidades, ensinamentos, atenção e paciência. Acredito que eu tenha sido a pessoa que mais bateu na porta do orientador durante todo esse tempo e sempre obtive orientação e entusiasmo para seguir em frente. Espero que um dia eu seja uma profissional tão competente quanto o meu orientador!

Aos meus pais, pela oportunidade de educação, pelo amor genuíno, por sempre apoiarem os meus estudos e pela torcida para que os *western blottings* dessem certo

Aos meus colegas de laboratório, por todo auxílio na execução do trabalho

Aos meus amigos preciosos (Ítalo, Jordana, Henver, Sônia, Carol, Ricardo e Julia Reintz) que sempre estiveram comigo e que provavelmente já entendem tudo de western blotting. Obrigada ao Ítalo em especial, por toda a parceira e ao Henver por discutir ciência comigo e claro, a todos os preciosos amigos pelos momentos de lazer!

A todos os professores e cientistas que eu tive o prazer de ter aula e aprender fisiologia e também aos membros da banca de mestrado, que aceitaram participar desse trabalho e discutir ciência conosco

Agradeço aos animais, que foram essenciais nessa pesquisa e que colaboram para o progresso da ciência no mundo todo

Também agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, que um dia parecia um sonho tão distante e hoje é parte da minha história! Assim como ao Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC), fundado com muita perseverança e dedicação pelos professores Alex e Everson, os quais colaboram diariamente para a ciência no nosso país!

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, que foi essencial para minha dedicação exclusiva aos estudos.

RESUMO

É sabido que a ingestão regular de frutose e o tratamento continuado com glicocorticoide (GC), separadamente, causam efeitos diabotogênicos. Por outro lado, a suplementação com óleo de peixe (OP) parece atenuar alguns destes efeitos adversos. Assim, buscamos avaliar o impacto da administração prolongada e combinada de frutose e prednisolona sobre a homeostase glicêmica e lipídica bem como o impacto da suplementação com OP e da interrupção dos insultos. Para tal, ratos Wistar machos foram divididos em: controle (Ctl), tratados com frutose (20% na água de beber) (Fru), tratados com prednisolona (12,5 µg/ml na água de beber) (Pred), tratados com a combinação de frutose + prednisolona (FruPred) por 90 dias consecutivos e, suplementados com óleo de peixe apenas (1g/Kg p.c., i.g) (Op) ou tratados com FruPred+Op por nos últimos 45 dias experimentais. Um grupo paralelo de animais FruPred (Rev) foi mantido por mais 3 meses após o término do tratamento para o acompanhamento das variáveis analisadas. Foram determinados parâmetros murinométricos e metabólicos e a análise do conteúdo total e fosforilado de proteínas envolvidas no contexto do trabalho em fígado, tecido adiposo e hipotálamo. Os grupos FruPred e Pred apresentaram redução no ganho de peso corpóreo ainda que tenham tido ingestão calórica similar aos demais grupos experimentais, os quais apresentaram ganho de peso contínuo ao longo do tratamento. Os ratos FruPred apresentaram normoglicemia associada a hipertriacilgliceridemia a partir da quarta semana de tratamento. O grupo FruPred também desenvolveu aumento no conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepático, alteração no balanço redox hepático, hiperurecemia, aumento da adiposidade abdominal e redução na sensibilidade à insulina com hiperinsulinemia, embora mantiveram-se sem prejuízo na tolerância à glicose. Essas características foram acompanhadas de redução no conteúdo proteico da AKT total no fígado e diminuição na razão entre o conteúdo fosforilado e total da AMPK em fígado e tecido adiposo. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na análise do conteúdo total e/ou fosforilado de proteínas envolvidas com a via inflamatória, entre outros alvos investigados. A suplementação com OP resultou em atenuação dos níveis circulantes de triacilglicerol e ácido úrico bem como no conteúdo de glicogênio hepático no grupo FruPredOp. Não houve qualquer efeito positivo da suplementação sobre os parâmetros murinométricos e demais parâmetros metabólicos e moleculares analisados. Noventa dias após o término do tratamento com frutose e prednisolona os ratos do grupo Rev apresentaram recuperação do ganho de peso corpóreo e normalização do perfil lipídico, da sensibilidade à insulina, da hiperurecemia, do conteúdo de gordura hepática e do perfil redox hepático. Além disso, houve recuperação do conteúdo proteico da AKT em fígado e da AMPK em tecido adiposo.

Concluimos que a combinação da ingestão de frutose com o tratamento concomitante de GC compromete o crescimento corpóreo e induz um quadro característico de síndrome metabólica enquanto a suplementação com OP parece atenuar algumas alterações hepáticas. Também concluimos que o organismo é capaz de se recompor da maioria dos efeitos adversos com a interrupção dos insultos. Esses achados alertam para os riscos da associação de uma terapia baseada em GC e a ingestão regular de bebidas adoçadas.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Glicocorticóide. Frutose.

ABSTRACT

It is well known that regular ingestion of fructose and continuous treatment with glucocorticoid (GC), separately, cause diabetogenic effects. On the other hand, the supplementation with fish oil (OP) seems to attenuate some of these adverse effects. Thus, we sought to evaluate the impact of prolonged and combined administration of fructose and prednisolone on glycemic and lipid homeostasis as well as the impact of OP supplementation and the interruption of insults. For this, male Wistar rats were divided into: control (Ctl), treated with fructose (20% in drinking water) (Fru), treated with prednisolone (12.5 µg/ml in drinking water), treated with the combination of fructose + prednisolone (FruPred) for 90 consecutive days and, supplemented with fish oil only (1g/kg b.w) (Op) or treated with FruPred + Op for the last 45 experimental days. A parallel group of FruPred (Rev) animals was maintained for another 3 months after the end of the treatment to monitor the variables analyzed. Functional and metabolic parameters were determined and the total and phosphorylated content of proteins involved in this work in the liver, adipose tissue and hypothalamus were analyzed. FruPred and Pred groups presented reduction in body weight gain even though they had similar caloric intake to the other experimental groups, which presented continuous weight gain throughout the treatment. FruPred rats presented normoglycemia associated with hypertriglyceridemia from at the fourth week of treatment. The FruPred group also developed increase in hepatic glycogen and triacylglycerol content, altered hepatic redox balance, hyperurecemia, increased in abdominal adiposity and reduced insulin sensitivity with hiperinsulinemia, although they remained without prejudice in glucose tolerance. These characteristics were accompanied by reduction in the protein content of total AKT in the liver and decrease in the phosphorylated and total AMPK ratio in liver and adipose tissue. No significant alteration was found in the analysis of the total and/or phosphorylated content of proteins involved with the inflammatory pathway, among other targets investigated. Supplementation with OP resulted in attenuation of circulating levels of triacylglycerol and uric acid as well as in hepatic glycogen content in the FruPredOp group. There was no positive effect of the supplementation on the metabolic and molecular parameters analyzed. Ninety days after the end of treatment with fructose and prednisolone, the Rev group showed recovery of body weight gain and normalization of lipid profile, insulin sensitivity, hyperurecemia, hepatic fat content and hepatic redox profile. In addition, there was recovery of the protein content of AKT in liver and AMPK in adipose tissue. We conclude that the combination of fructose intake and concomitant GC treatment compromises body growth and induces a characteristic metabolic syndrome model, whereas

supplementation with OP appears to attenuate some liver changes. We also conclude that the system is able to recover the most adverse effects with the interruption of insults. These findings point to the risks of associating GC-therapy with regular intake of sweetened beverages.

Keywords: Metabolic syndrome. Glucocorticoid. Fructose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência à insulina através de mediadores inflamatórios..	33
Figura 2. Efeitos dos GC sobre os tecidos periféricos.	36
Figura 3. Metabolismo da frutose no fígado..	42
Figura 4. Mecanismos de ação dos n-3 através dos PPARs.	47
Figura 5. Delineamento experimental. Vide o texto para compreensão detalhada	56
Figura 6. Peso corpóreo (A), ingestão alimentar (B), ingestão hídrica (C) e ingestão calórica total (D) ao longo de 12 semanas de tratamento	68
Figura 7. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea em jejum (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B), triacilglicerol plasmático em jejum (C) e a respectiva área-sob-a-curva (D).	69
Figura 8. Valores de glicemia durante o teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) após 10 semanas de tratamento.	70
Figura 9. Valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose oral (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) após 11 semanas de tratamento.	71
Figura 10. Valores de glicemia durante o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (A) e a respectiva constante de decaimento (KITT).....	72
Figura 11. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) após 12 semanas de tratamento.	73
Figura 12. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) após 12 semanas de tratamento.	75

Figura 13. Liberação de glicerol em TA epididimal (A) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (B), liberação de glicerol em TA retroperitoneal (C) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (D) após 12 semanas de tratamento.	76
Figura 14. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado de rato após 12 semanas de tratamento.....	77
Figura 15. Valores da razão entre o conteúdo proteico da AKT fosforilada em serina 473 pelo seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (B). Conteúdo proteico da AKT total em fígado (C) após 12 semanas de tratamento.	79
Figura 16. Valores da razão entre o conteúdo de AMPK fosforilada pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (A) e fígado (B) de após 12 semanas de tratamento.	80
Figura 17. Valores da razão entre o conteúdo de JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo de C-JUN fosforilada (B), razão entre IκB fosforilada e seu conteúdo total (C) e entre NFκBp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo total de NFκBp52 (E) e GR (F) em tecido adiposo epididimal após 12 semanas de tratamento.....	81
Figura 18. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11βHSD1 (C) em fígado após 12 semanas de tratamento.....	83
Figura 19. Valores da razão entre a fosforilação do NFκBp65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo após 12 semanas de tratamento.	83

Figura 20. Peso corpóreo (A), ingestão alimentar (B), ingestão hídrica (C) e ingestão calórica total (D) ao longo de 12 semanas em animais suplementados ou não com óleo de peixe.	87
Figura 21. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea (A) e o último ponto mensurado após 12 semanas de tratamento (B). Triacilglicerol plasmático temporal (C) e o último ponto mensurado após 12 semanas de tratamento (D).....	88
Figura 22. Valores de glicemia durante o teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) em ratos suplementados com óleo de peixe.	89
Figura 23. Valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose oral (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) em ratos suplementados com óleo de peixe.....	90
Figura 24. Valores de glicemia durante o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (A) e a respectiva constante de decaimento (KITT) em ratos suplementados com óleo de peixe..	90
Figura 25. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) após o tratamento e/ou suplementação.	92
Figura 26. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) após o tratamento e/ou suplementação.	94
Figura 27. Liberação de glicerol em TA epididimal (A) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (B), liberação de glicerol em TA retroperitoneal (C) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada após o tratamento e/ou suplementação. ...	95
Figura 28. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado após o tratamento e/ou suplementação.....	96

Figura 29. Conteúdo de PPAR γ em tecido adiposo epididimal após o tratamento e/ou suplementação.	97
Figura 30. Razão entre o conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 para o seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 para o seu conteúdo total em tecido adiposo (B) e conteúdo total de AKT em fígado (C) após o tratamento e/ou suplementação.	98
Figura 31. Valores da razão entre o conteúdo de AMPK fosforilada pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (A) e fígado (B) após o tratamento e/ou suplementação.	99
Figura 32. Valores da razão entre o conteúdo de JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo da c-JUN fosforilada (B), razão entre I κ B fosforilada e seu conteúdo total (C) e entre NF κ Bp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo total de NF κ Bp52 (E) e GR (F) em tecido adiposo epididimal após o tratamento	101
Figura 33. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11 β -HSD1 (C) em fígado após o tratamento e/ou suplementação.	102
Figura 34. Valores da razão entre a fosforilação do NF κ Bp65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo após o tratamento e/ou suplementação.	103
Figura 35. Acompanhamento temporal do peso corpóreo (A) e pós-tratamento do grupo Rev (B). Ingestão alimentar temporal (C) e pós-tratamento do grupo Rev (D). Ingestão hídrica temporal (E) e pós-tratamento do grupo Rev (F). Ingestão calórica temporal (G) e pós-tratamento do grupo Rev (H)..	106
Figura 36. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea (A) e pós-tratamento do grupo Rev (B). Triacilglicerol plasmático temporal (C) e pós-tratamento do grupo Rev (D).	107

Figura 37. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) 90 dias pós-tratamento.....	109
Figura 38. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) 90 dias pós-tratamento.....	110
Figura 39. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado 90 dias pós-tratamento.	111
Figura 40. Razão entre o conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 para o seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 para o seu conteúdo total em tecido adiposo (B) e conteúdo total de AKT em fígado (C) 90 dias pós-tratamento.	113
Figura 41. Razão entre o conteúdo da AMPK fosforilada para o seu conteúdo total em tecido adiposo (A) e fígado (B) 90 dias pós-tratamento.....	114
Figura 42. Valores da razão entre o conteúdo da JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo da c-JUN fosforilada (B), razão entre IκB fosforilada e seu conteúdo total (C) e entre NFκBp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo total de NFκBp52 (E) e GR (F) em tecido adiposo epididimal 90 dias pós-tratamento.	115
Figura 43. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11βHSD1 (C) em fígado 90 dias pós-tratamento.	116
Figura 44. Valores da razão entre a fosforilação do NFκB65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo 90 dias pós-tratamento.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios para diagnóstico de DM2, pré-diabetes e SM.....	27
Tabela 2. Modelos animais de DM2.....	30
Tabela 3. Comparação, farmacodinâmica e farmacocinética dos principais GC utilizados na clínica.....	37
Tabela 4. Modelos experimentais de resistência à insulina induzidos por GC	39
Tabela 5. Efeitos metabólicos da frutose em ratos	44
Tabela 6. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre alterações no metabolismo lipídico e glicídico	49
Tabela 7. Parâmetros sanguíneos dos animais jejuados após 12 semanas de tratamento.....	72
Tabela 8. Massa relativa dos órgãos após 12 semanas de tratamento .	74
Tabela 9. Percentual (%) de ácidos graxos em hemácias de animais suplementados com óleo de peixe.....	85
Tabela 10. Parâmetros sanguíneos dos animais jejuados suplementados com óleo de peixe.....	91
Tabela 11. Massa relativa dos órgãos dos animais suplementados com óleo de peixe	93
Tabela 12. Parâmetros sanguíneos 90 dias pós-tratamento	108
Tabela 13. Massa relativa dos órgãos 90 dias pós-tratamento.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase, tipo 1
AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AGS	Ácido graxo saturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AKT	Proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase dependente de AMP
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos
DEX	Dexametasona
DGAT	Diacilglicerol-aciltransferase 1
DHA	Ácido docosaexaenoico
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAS	Sintase dos ácidos graxos
FOXO	Proteína <i>Forkhead box</i>
GC	Glicocorticoide
GLUT	Transportador de glicose
GMS	Glutamato monossódico
GR	Receptor de glicocorticoide
GSK3	Cinase da glicogênio sintase 3
HFCS	Xarope de milho rico em frutose
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IDE	Enzima que degrada a insulina
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IGF-R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina

IKK	Cinase do IκB
IL1β	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
IP	Intraperitoneal
IpITT	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
IpPTT	Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	Cinase c-JUN N-terminal
LDN	Lipogenese <i>de novo</i>
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MODY	Diabetes do jovem no início da maturidade
mTORC2	Complexo 2 alvo da rapamicina em mamíferos
N-3	Ácido graxo poli-insaturado ômega 3
N-6	Ácido graxo poli-insaturado ômega 6
NAFLD	Esteatose hepática não alcoólica
NFκB	Fator nuclear kappa B
Oggt	Teste de tolerância à glicose oral
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PDK1	Proteína cinase dependente de inositolis 1
PKC	Proteína cinase C
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio

S6K	Proteína S6 cinase
SC	Subcutâneo
SD	Ratos Sprague Dawley
SM	Síndrome metabólica
SI	Sensibilidade à insulina
SREBP1	Proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1
TLR4	Receptor tipo ' <i>toll like</i> ' 4
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 DIABETES MELLITUS E SÍNDROME METABÓLICA.....	27
1.2 RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO.....	30
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS DOENÇAS METABÓLICAS COM FOCO NA RESISTÊNCIA À INSULINA	34
1.3.1 Modelos baseados em tratamentos com glicocorticoides	34
1.3.2 Modelos baseados na ingestão de frutose	40
1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA-3	46
2. JUSTICATIVA E HIPÓTESE	50
3. OBJETIVOS	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 ANIMAIS.....	53
4.2 EUTANÁSIA.....	53
4.3 DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	53
4.4 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS	57
4.4.1 Peso corpóreo.....	57
4.4.2 Consumo de ração	57
4.4.3 Ingestão hídrica	57
4.4.4 Ingestão calórica.....	57
4.4.5 Glicose e triacilglicerol sanguíneos	57
4.4.6 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT).....	58
4.4.7 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT).....	58
4.4.8 Teste de tolerância á insulina intraperitoneal (ipITT).....	58
4.4.9 Componentes bioquímicos	59
4.4.10 Avaliação da sensibilidade à insulina pela modelo de análise homeostática (HOMA-IR) e índice TyG.....	59
4.4.11 Peso de órgãos.....	59

4.4.12	Conteúdo de glicogênio hepático.....	59
4.4.13	Conteúdo de triacilglicerol hepático.....	60
4.4.14	Lipólise	60
4.5.	ANÁLISE DO ESTADO REDOX EM FRAGMENTOS DE FÍGADO	60
4.5.1	Hidroperóxidos lipídicos.....	61
4.5.2	Carbonilação de proteínas.....	61
4.5.3	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	62
4.5.4	Atividade da enzima catalase	62
4.6.	EXTRAÇÃO PROTEÍCA E WESTERN BLOTTING	63
4.7.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM HEMÁCIAS.....	64
4.7.1	Extração lipídica de hemácias.....	64
4.7.2	Saponificação dos extratos lipídicos	64
4.7.3	Derivatização dos ácidos graxos	65
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5.	RESULTADOS DO MÓDULO I: <i>Modelo experimental</i>.....	66
5.1	PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	66
5.1.1	Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica.....	66
5.1.2	Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático ao longo do tratamento	68
5.1.3	Tolerância ao piruvato.....	69
5.1.4	Tolerância à glicose.....	70
5.1.5	Sensibilidade à insulina	71
5.1.6	Parâmetros sanguíneos após o tratamento	72
5.1.7	Massa relativa dos órgãos.....	73
5.1.8	Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos	75
5.1.9	Secreção de glicerol estimulado por isoproterenol.....	75

5.1.10 Determinação do estado REDOX em fígado.....	76
5.1.11 Conteúdo da proteína cinase B (PKB/AKT) em tecido adiposo e fígado.....	78
5.1.12 Conteúdo da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) em tecido adiposo e fígado.....	79
5.2. SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA.....	80
5.2.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, IκB, NFκB e GR em tecido adiposo.....	80
5.2.2 Conteúdo proteico do TLR4, da JNK e da 11β-HSD1 em fígado.....	82
5.2.3 Conteúdo proteico do NFκB e TLR4 em hipotálamo.....	83
6. RESULTADOS DO MÓDULO II: <i>Intervenção mediante suplementação com óleo de peixe rico em n-3</i>.....	85
6.1. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM HEMÁCIAS	85
6.2. EFEITOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MOLECULARES	86
6.2.1 Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica.....	86
6.2.2 Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático ao longo do tratamento e suplementação.....	87
6.2.3 Tolerância ao piruvato.....	89
6.2.4 Tolerância à glicose	89
6.2.5 Sensibilidade à insulina.....	90
6.2.6 Parâmetros sanguíneos após o tratamento e suplementação..	91
6.2.7 Massa relativa dos órgãos.....	92
6.2.8 Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos.....	93
6.2.9 Secreção de glicerol estimulada por isoproterenol	94
6.2.10 Determinação do estado REDOX em fígado.....	95
6.2.11 Conteúdo do receptor PPARγ em tecido adiposo.....	96
6.2.12 Conteúdo da cinase AKT em tecido adiposo e fígado	97
6.2.13 Conteúdo da proteína AMPK em tecido adiposo e fígado....	99

6.3. EFEITOS SOBRE A SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA	100
6.3.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, IκB, NFκB e GR em tecido adiposo.....	100
6.3.3 Conteúdo proteico do NFκB e do TLR4 em hipotálamo	103
7. RESULTADOS DO MÓDULO III: <i>Acompanhamento dos parâmetros após interrupção dos tratamentos</i>	105
7.1 EFEITOS SOBRE PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	105
7.1.1 Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica.....	105
7.1.2 Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático pós-tratamento.....	107
7.1.3 Parâmetros sanguíneos pós-tratamento.....	108
7.1.4 Massa relativa dos órgãos.....	109
7.1.5 Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos	110
7.1.6 Determinação do estado REDOX em fígado.....	111
7.1.7 Conteúdo proteico da AKT em tecido adiposo e fígado.....	112
7.1.8 Conteúdo proteico da AMPK em tecido adiposo e fígado	113
7.2. SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA	114
7.2.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, IκB, NFκB e GR em tecido adiposo	114
7.2.2 Conteúdo proteico da JNK, TLR4 e 11βHSD1 em fígado	116
7.2.3 Conteúdo proteico do NFκB e TLR4 em hipotálamo	117
8. DISCUSSÃO	119
10. PERSPECTIVAS.....	134
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS E SÍNDROME METABÓLICA

Dentre as doenças crônicas não transmissíveis, o diabetes *mellitus* (DM) acomete 415 milhões de pessoas ao redor do mundo (Federação Internacional do Diabetes, 2015). O DM é uma doença de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica. Seu aparecimento é consequência tanto da deficiência absoluta (DM tipo1) quanto da deficiência relativa da insulina, devido a problemas na secreção e/ou na sensibilidade ao hormônio (DM tipo 2). Além desses tipos clássicos de DM, existem outros tipos menos frequentes, como o DM gestacional, que tem caráter transitório, e o MODY (diabetes do jovem no início da maturidade) caracterizado por transmissão autossômica dominante, que corresponde a um defeito primário na secreção de insulina (TIMSIT *et al.*, 2016). Os critérios para diagnóstico do DM2 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios para diagnóstico de DM2, pré-diabetes e SM

Patologia	Características fisiológicas
Critérios para diagnóstico do DMT2	Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL por duas vezes ou ≥ 200 mg/dL em qualquer momento do dia Glicemia ≥ 200 mg/dL após duas horas da ingestão de 75 g de glicose durante o teste de tolerância à glicose
Critérios para diagnóstico de pré-diabetes	Glicemia ≥ 100 mg/dL e < 126 mg/dL em jejum ou ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL após o teste de tolerância à glicose
Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica	Apresentar pelo menos três das seguintes características: Redução na sensibilidade à insulina * Aumento medida de circunferência

abdominal** (> 0.85 para mulheres e > 0.90 para homens)

Dislipidemia (TG ≥ 150 mg/dL ou HDL < 40 mg/dL para homens ou < 50 mg/dL para mulheres) ou Rx

Hipertensão arterial ($\geq 130/85$ mm Hg) ou Rx

Glicemia em jejum ≥ 100 mg/dL ou Rx

Critérios para diagnóstico com base em parâmetros da Federação Internacional do Diabetes (IDF, 2016) e da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999). * Indica característica obrigatória da SM de acordo com a OMS seguido de mais duas características. ** Indica característica obrigatória para SM pela IDF seguido de mais duas características. Rx; medicação para tratamento do parâmetro alterado.

No DM2 que compreende aproximadamente 90% dos casos de DM em todo o mundo, o organismo normalmente apresenta redução na sensibilidade periférica à insulina (músculo, fígado e tecido adiposo), também denominada de resistência periférica à insulina (RI). A RI é uma condição associada com outras doenças como a obesidade, hipertensão, síndrome do ovário policístico e síndrome metabólica (CASERTA *et al.*, 2014). De acordo com um recente estudo epidemiológico, a associação de DM2 com sobrepeso e obesidade chega a 90% dos casos (MASMIQUEL *et al.*, 2016). No entanto, indivíduos obesos não diabéticos são capazes de manter a normoglicemia por um aumento compensatório na massa de células β com consequente aumento na capacidade secretora de insulina, enquanto que em pacientes com DM2 a função das células β está reduzida, levando à redução da capacidade secretora de insulina (LINNEMANN; BAAN; DAVIS 2014).

Alguns autores defendem a hipótese de que a redução na massa de células β em pacientes com DM2 é devido (a) a uma falha no desenvolvimento inicial dessas células, resultando na diminuição da massa de células β que persiste ao longo da vida; (b) a um prejuízo na proliferação dessas células na vida adulta, em resposta a RI, resultando na incapacidade de produzir insulina suficiente ou (c) quando a expansão compensatória na massa de células β ocorre, mas em seguida há um aumento na morte celular, reduzindo assim o número de células produtoras de insulina (LINNEMANN; BAAN; DAVIS 2014). É importante salientar que em ambas as situações o indivíduo tem maior

suscetibilidade para o desenvolvimento do DM2. Inúmeros fatores podem estar envolvidos com a etiologia do DM2, além da suscetibilidade genética, também tem sido sugerido que fatores ambientais (estilo de vida) e epigenéticos estão fortemente ligados com essa doença.

A síndrome metabólica (SM) é um grande fator de risco para o desenvolvimento do DM2 e doenças cardiovasculares. A definição de SM por órgãos de saúde pública inclui um conjunto de características adversas, tais como dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose, RI, obesidade central e conseqüentemente um estado de inflamação crônica de baixo grau. Outros componentes da SM como hiperurecemia e aumento do PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1) também têm sido descritas, no entanto não são necessárias para a classificação da SM (OMS, 1999). Para cada um desses fatores existe um ponto de corte e para a determinação do diagnóstico clínico é necessário à presença de pelo menos três desses fatores. Os critérios de diagnóstico estão resumidos na Tabela 1.

A IDF estima que um quarto da população mundial tenha SM, a qual está associada ao aumento do status socioeconômico, índice de massa corporal e com o sedentarismo. Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da SM são o consumo excedente de carboidratos e gorduras na dieta bem como a inatividade física, levando ao balanço calórico positivo e ao acúmulo de gordura visceral (VAN GREEVENBROEK *et al.*, 2016).

A disfunção no tecido adiposo é uma das origens para o desenvolvimento dos distúrbios presentes na SM. Nesse sentido, com a expansão da obesidade central/visceral haveria disfunções no tecido adiposo visceral e um quadro de inflamação crônica de baixo grau, que está entre os fatores causais da RI. Além disso, outros fatores como o aumento de ácidos graxos livres na circulação e a disfunção microvascular são responsáveis pela redução na sensibilidade à insulina observada no quadro de SM (VAN GREEVENBROEK *et al.*, 2016).

Por conta do aumento na prevalência dessas comorbidades, o entendimento acerca das disfunções fisiológicas e a busca por estratégias terapêuticas e preventivas são alvos de intensa investigação. A Tabela 2 traz os principais modelos experimentais de DM2 com foco na RI e na insuficiência das células β .

Tabela 2. Modelos animais de DM2

Uso do modelo experimental	Principais características	Modelos mais utilizados
Entendimento da patogênese: Contribuição da resistência à insulina e/ou obesidade no DM2	Resistência à insulina e prejuízo na tolerância à glicose	-Camundongos alimentados com dieta rica em gordura -Camundongos Lep ^{ob/ob} -Camundongos Lepr ^{db/db} -Ratos diabéticos Zucker -Camundongos KK-A ^Y -Camundongos TallHo/Jng -Camundongos NZO (<i>New Zealand obese</i>) -Ratos OLETF (<i>Otsuka Long Evans Tokushima Fat rats</i>)
Entendimento da patogênese: Contribuição da compensação das células β no DM2	Redução na massa e/ou função das células β	-Ratos GK (<i>Goto Kakizaki</i>) -Ratos e camundongos tratados com estreptozotocina no período neonatal -Ratos com pancreatectomia parcial

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2. Fonte: Adaptado de KING; BOWE, 2016.

1.2 RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO

A insulina é um hormônio peptídico anabólico secretado pelas células β pancreáticas, com funções tanto sobre o metabolismo quanto crescimento celular. Em nível celular, os efeitos da insulina são mediados pela ativação do receptor de insulina, levando a uma cascata de fosforilação intracelular e a respostas metabólicas e proliferativas. Disfunções nessa via de sinalização podem levar a RI (SALTIEL; KAHN 2001). O receptor de insulina, assim como o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-R), são receptores com atividade tirosina-cinase e constituem-se de proteínas tetraméricas com dois domínios extracelulares α e dois domínios intracelulares β . A ligação do hormônio com o receptor leva a mudanças conformacionais e

a ativação da atividade cinase intrínseca da subunidade β , resultando em autofosforilação em resíduos tirosina e a subsequente fosforilação de proteínas de interação, tais como o substrato do receptor de insulina (IRS) (BOUCHER *et al.*, 2014).

Os efeitos metabólicos da insulina acontecem através da via fosfoinositol-3-cinase (PI3K) e proteína cinase b (AKT). Para ativação da PI3K as subunidades p85 e p55 interagem com o IRS1-2, resultando na ativação da subunidade catalítica p110 e na geração do segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). O PIP₃ por sua vez leva a fosforilação e ativação da proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (PDK1). A PDK-1 fosforila proteínas cinases como a AKT em resíduos treonina 308 e isoformas da proteína cinase C (PKC λ/ϵ) (ALESSI *et al.*, 1997; BOUCHER *et al.*, 2014). Entretanto, para completa ativação é necessário a fosforilação da AKT em resíduos serina 473, o qual é realizado pelo complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) (SARBASSOV *et al.*, 2005). A completa ativação da AKT dá sequência a fosforilação de uma série de marcadores envolvidos com respostas metabólicas, tais como síntese proteica via mTORC1 (DUVEL *et al.*, 2010), controle de genes gliconeogênicos e lipogênicos via fatores de transcrição *Forkhead Box* (Foxo) (LU *et al.*, 2012), captação de glicose através da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para membrana celular (SALTIEL; KAHN 2001) e síntese de glicogênio via inibição da cinase da glicogênio sintase 3 (GSK3) (MACAULAY *et al.*, 2007).

A RI é uma condição em que as células não respondem adequadamente a insulina, de origem multifatorial. Um dos fatores causais da RI é o perfil pró-inflamatório presente em quadros de obesidade e SM. A disfunção no tecido adiposo está correlacionada especialmente com o tamanho dos adipócitos, de modo que adipócitos hipertrofiados são menos responsivos à insulina, secretam mais leptina e citocinas pró-inflamatórias e menos adiponectina (SKURK *et al.*, 2007).

A expansão e disfunção do tecido adiposo levam ao aumento da resposta inflamatória e a infiltração de células imunes (WEISBERG *et al.*, 2003). O aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 β (IL1 β) ou interleucina 6 (IL-6) por macrófagos e adipócitos são capazes de atenuar a sinalização da insulina (OZES *et al.*, 2001). Essas citocinas podem ativar cinases de estresse tais como a c-Jun-N-terminal (JNK), cinase do I κ β (IKK β), S6K e PKC \emptyset , as quais inibem a sinalização da insulina através da fosforilação inibitória em resíduos de serina do IRS1 e 2

(VELLOSO; FOLLI; SAAD 2015). Em modelos experimentais de RI em roedores ou em humanos as vias de sinalização da JNK e IKK estão suprarreguladas tanto em tecido adiposo, quanto em músculo esquelético e fígado (HIROSUMI, 2002; YUAN *et al.*, 2001; HOTAMISLIGIL, 2003), de modo que a deleção da JNK protege os camundongos da RI induzida pela dieta (HIROSUMI, 2002).

Em modelos de SM onde a JNK é frequentemente ativada, a respectiva via de sinalização leva a ativação de fatores de transcrição AP1 (ativador da proteína -1) através da fosforilação da c-JUN. Esse fator de transcrição regula importantes processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (DAVIS, 2000). No mesmo contexto metabólico, a ativação da via de sinalização do IKK leva a ativação do fator nuclear (NF)- κ B. O complexo IKK é formado por duas subunidades, a subunidade α e a β , que fosforilam e conseqüentemente degradam o I κ B. Essa degradação permite a translocação do NF κ B (p65 e p50) para o núcleo, que por sua vez controla a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1, IL6, PAI-1 e MCP-1 (KARIN; DELHASE, 2000; HAYDEN; GHOSH *et al.*, 2004).

Outro fator associado com a RI e a inflamação é o receptor *Toll-like* (TLR4). Esses receptores fazem parte do sistema imune inato e são ativados tanto por lipopolissacarídeos quanto por ácidos graxos saturados (LEE *et al.*, 2001), comumente aumentados em casos de obesidade ou SM. Após interação com o ligante, o TLR4 induz inflamação por ativação da via do IKK/NF κ B e JNK, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Lee e colaboradores (2001) revelaram que os ácidos graxos livres são potentes indutores da expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, adipócitos e hepatócitos através da sinalização do receptor TLR4. Além disso, a sinalização do TLR4 parece ser necessária para a RI induzida por ácidos graxos livres. Milanski e colaboradores (2009) demonstraram o efeito dos ácidos graxos em receptores TLR4 hipotalâmicos, desencadeando a resposta inflamatória e a RI central.

O hipotálamo está envolvido na manutenção da homeostase energética por meio de sinais orexígenos e anorexígenos. Inúmeros trabalhos têm demonstrado a participação da inflamação hipotalâmica como uma importante causa da obesidade periférica em modelos experimentais (DE SOUZA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008; VELLOSO *et al.*, 2011). Nesse sentido, os ácidos graxos saturados são potentes ativadores dos receptores TLR4 e indutores do estresse do retículo, desencadeando assim a resposta pró-inflamatória central (MILANSKI *et al.*, 2009; OZCAN *et al.*, 2009).

Em síntese, a inflamação crônica de baixo grau presente no cérebro, músculo esquelético, fígado e tecido adiposo promove atenuação da sensibilidade à insulina e impacta negativamente o metabolismo da glicose e de lipídios, uma vez que as ações anabólicas e anticatabólicas da insulina estão reduzidas. Dessa forma, esse quadro metabólico mantém as complicações presentes na obesidade, SM e DM2. A Figura 1 revela a relação entre mediadores inflamatórios e RI.

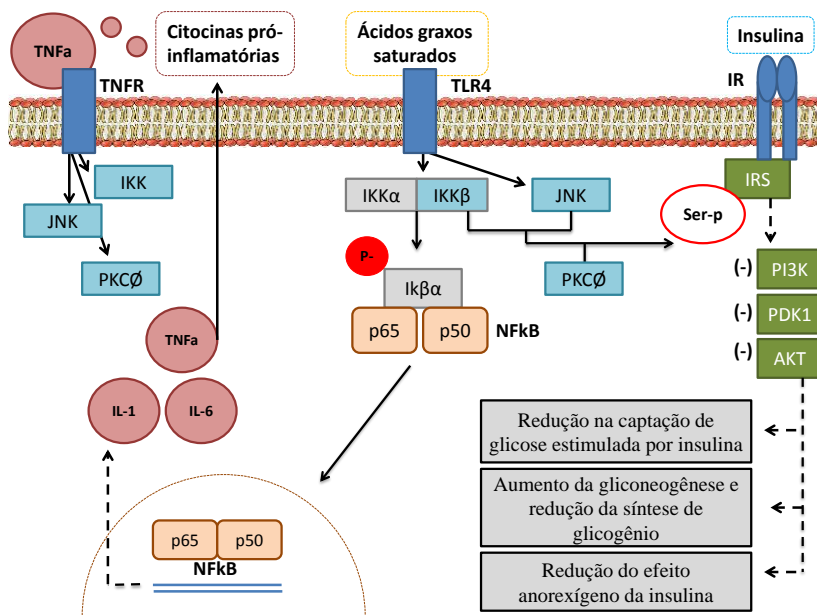


Figura 1. Mecanismos de resistência (RI) à insulina através de mediadores inflamatórios. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 e IL-6 podem atenuar a sinalização da insulina. Essas citocinas estimulam cinases como a JNK, IKK β e PKC θ , as quais promovem a fosforilação em serina no IRS. Além disso, ácidos graxos saturados podem atuar como ligantes do receptor TLR4, ativando a cascata de sinalização da JNK e IKK/NF κ B que promovem a transcrição dessas citocinas pró-inflamatórias. A atenuação da sinalização da insulina via PI3K/AKT reduz a captação de glicose estimulada por insulina (músculo e tecido adiposo), síntese de glicogênio (músculo e fígado), a supressão da gliconeogênese (fígado) e o efeito anorexígeno da insulina no hipotálamo. JNK: c-Jun-N-terminal; IKK: cinase do

I κ B; NF κ B: fator nuclear κ B; TNF α R: receptor do fator de necrose tumoral alfa (TNF α); PKC \emptyset : proteína cinase C atípica \emptyset ; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; TLR4: receptor *toll-like*; IR: receptor de insulina; IRS: substrato do receptor de insulina; PI3K: fosfoinositol-3-cinase; PDK1: proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos; AKT: proteína cinse B. Fonte: O autor.

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS DOENÇAS METABÓLICAS COM FOCO NA RESISTÊNCIA À INSULINA

1.3.1 Modelos baseados em tratamentos com glicocorticoides

Os glicocorticoides (GC) são hormônios esteroides sintetizados pelo córtex da glândula adrenal. O principal hormônio GC é o cortisol sendo equivalente a corticosterona em roedores. O controle endógeno da síntese e liberação dos GC ocorre por meio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (FEEK *et al.* 1983) e a biodisponibilidade é determinada através da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11- β HSD1). Essa enzima é uma redutase que converte a cortisona inativa (em humanos) e a 11- dehidrocorticosterona (em roedores) para sua forma ativa, sendo cortisol e corticosterona, respectivamente (LOW *et al.* 1994).

Os mecanismos de ação dos GC são mediados por meio da ligação em seu respectivo receptor (GR). Existem pelo menos 16 isoformas do GR, que são classificados como receptores nucleares e atuam como fatores de transcrição para genes específicos (MANGELSDORF *et al.* 1995; DUMA *et al.* 2006). Esses receptores encontram-se em praticamente todos os tecidos. Em condição basal o GR encontra-se no citosol associado a um complexo de proteínas chaperonas, mantendo-o em estado inativo. A interação do hormônio com o receptor promove a sua translocação para o núcleo que então atua modulando a transrepressão ou transativação gênica. Os GCs também apresentam ações não-genômicas, rápidas, modulando vias de transdução de sinal ainda não completamente elucidadas (OAKLEY *et al.*, 2013; TOPETE; CIDLOWSKI, 2015).

Os GCs tem importante influência sobre o metabolismo e sobre a supressão da resposta inflamatória (WAJCHENBERG *et al.*, 1984; STAHN; BUTTGEREIT, 2008). Em relação aos efeitos metabólicos, os GCs estimulam a mobilização de substratos para o metabolismo oxidativo. Esse desfecho acontece por meio do estímulo sobre a

gliconeogênese via fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPCK), redução da captação de glicose periférica, aumento do catabolismo sobre o metabolismo de proteínas e lipídeos, promovendo a liberação de aminoácidos, ácidos graxos e glicerol como substratos para gliconeogênese hepática e tecidos periféricos (LANGE *et al.*, 1994; ANDREWS; WALKER, 1999; CASSUTO *et al.*, 2005). Os GCs também estimulam a lipogênese, apresentando efeitos ambíguos em diferentes depósitos de tecido adiposo (REYNOLDS *et al.* 2012). Além disso, os GCs podem suprimir a atividade osteoblástica. A Figura 2 sumariza as principais ações dos GCs sobre os tecidos periféricos.

Os GCs sintéticos são amplamente utilizados na clínica, por conta das relevantes propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias, antialérgicas e também para reposição hormonal, movimentando cerca de 10 bilhões de dólares por ano (SCHACKE *et al.* 2002). Dentre os GCs sintéticos mais prescritos destacam-se a prednisolona, metilprednisolona, dexametasona (DEX) e betametasona, com alta potência GC e baixa atividade mineralocorticoide (SCHACKE *et al.* 2002). A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os principais fármacos glicocorticoides utilizados na clínica.

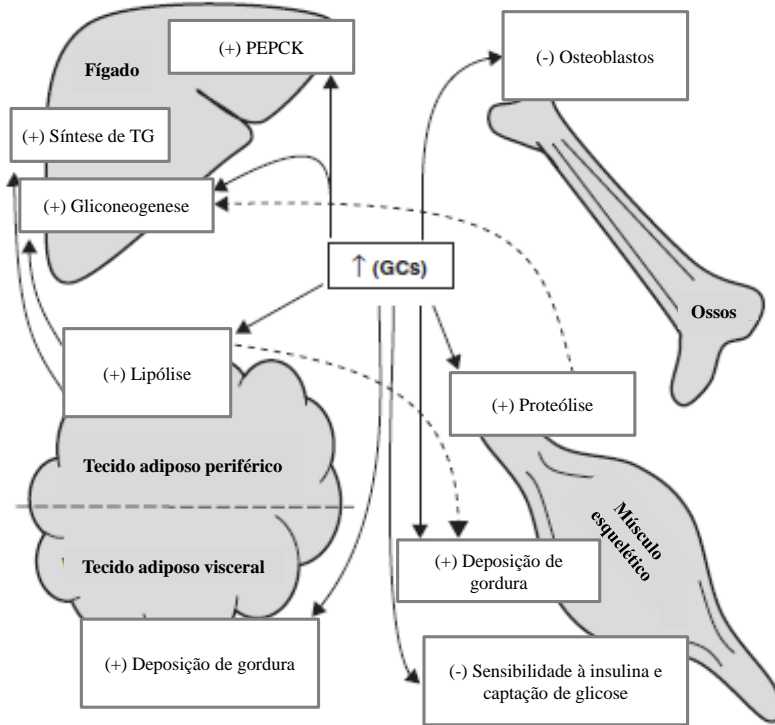


Figura 2. Efeitos dos GCs sobre os tecidos periféricos. O excesso ou tratamento prolongado com GC pode prejudicar a homeostase glicêmica, superativando seus efeitos metabólicos sobre os tecidos alvos. Os GCs promovem acúmulo de gordura no tecido adiposo visceral e lipólise em tecido adiposo periférico, fornecendo substratos para síntese de triacilglicerol hepático e gliconeogênese, e também acúmulo de gordura intramuscular. Os GCs prejudicam a sinalização da insulina, reduzindo a captação de glicose estimulada por insulina e proteólise, além de estimular a gliconeogênese via PEPCK. Finalmente, o excesso de GC pode interferir na formação óssea, reduzindo a atividade dos osteoblastos. GCs: glicocorticóides; TG: triacilglicerol; PEPCK: fosfoenolpiruvato-carboxilase. Fonte: Adaptado de RAFACHO *et al.*, 2014.

Tabela 3. Comparação, farmacodinâmica e farmacocinética dos principais GCs utilizados na clínica.

Glicocorticóide	Afinidade pelo receptor	Potência anti-inflamatória	Duração da ação após dose oral	Fármaco de escolha para:
Hidrocortisona	1	1	8-12h	Terapia de reposição hormonal
Prednisolona	2,2	4	12-36h	Efeitos sistêmicos e imunossupressores
Metilprednisolona	11,9	4	12-36h	Ação anti-inflamatória e imunossupressora
Dexametasona	7,1	30	36-72h	Ação anti-inflamatória e imunossupressora, não retém água. Promove supressão da produção de ACTH
Betametasona	5,4	30	36-72h	Ação anti-inflamatória e imunossupressora, não retém água

Dados com referência na hidrocortisona. **ACTH:** Hormônio adrenocorticotrófico. Fonte: Adaptado de RANG *et al.*, 2003.

Dependendo da dose e tempo do tratamento, esses fármacos apresentam diversos efeitos adversos. Esses efeitos são principalmente sobre o metabolismo, promovendo RI e /ou intolerância à glicose (STOJANOVSKA *et al.* 1990; RAFACHO *et al.* 2008), ou até DM2 em indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento dessa doença (SCHACKE *et al.* 2002). Também aumentam a deposição de gordura central (ROCKALL *et al.* 2003), dislipidemia (RAFACHO *et al.* 2008), perda

de massa muscular (PRELOVSEK *et al.* 2006), aumento da produção de glicose e lipídios hepática e redução na formação óssea (Figura 2).

Em condições de hipercortisolemia, como na Síndrome de Cushing, nota-se o fenótipo semelhante ao de pacientes com SM, a julgar pelo aumento da deposição de gordura central, dislipidemia, hipertensão e redução da tolerância à glicose e/ou RI (ANAGNOSTIS *et al.* 2009).

Alguns trabalhos apontam para a relação significativa entre a biodisponibilidade de GC e os desfechos da SM. Nesses modelos experimentais, assim como em indivíduos obesos, as concentrações endógenas circulantes de GC parecem não variar, no entanto nota-se expressivo aumento dos níveis intracelulares de corticosterona, resultante do aumento da atividade da 11- β HSD1 em tecidos periféricos (KOTELEVTSY *et al.*, 1997; MASUZAKI *et al.*, 2001; ANAGNOSTIS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015). Esses dados salientam o potencial envolvimento do GC na SM.

Dentre os principais efeitos adversos dos GCs destaca-se a RI, que vêm sendo extensivamente estudada, tanto em modelos experimentais com roedores quanto em humanos (OLEFSKY *et al.*, 1975; SAAD *et al.*, 1993; BURÉN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2015). As bases moleculares envolvidas com esse efeito em roedores apontam para: 1) redução na densidade do receptor de insulina em hepatócitos; 2) redução na fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do IRS-1 em fragmentos de fígado (SAAD *et al.*, 1993); 3) redução na associação do IRS-2 com a PI3K em adipócitos (SAAD *et al.*, 1993) e 4) redução no conteúdo total e fosforilado da cinase AKT em músculo e tecido adiposo (BURÉN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2015). A Tabela 4 apresenta a comparação entre modelos experimentais de RI induzidos por GCs.

Tabela 4. Modelos experimentais de resistência à insulina induzidos por GCs

Modelo	Sensibilidade à insulina (SI)	Glicemia em jejum	Referência
DEX <i>i.p</i> 1 mg/Kg por 5 dias em ratos Wistar	Redução da SI	Modesto aumento	MOTTA <i>et al.</i> , 2014
DEX <i>i.p</i> 0,1, 0,5 e 1* mg/kg por 5 dias em ratos Wistar	Redução da SI (0.5 e 1 mg)	Modesto aumento*	RAFACHO <i>et al.</i> , 2008
DEX <i>i.p</i> 0,12 mg/kg por 20 dias em ratos SD	Redução da SI	Inalterado	NOVELLI <i>et al.</i> , 2008
DEX <i>s.c</i> 3mg/Kg por 14 dias em ratos SD	Redução da SI	Hiperglicemia	GAO <i>et al.</i> , 2007
DEX <i>i.p</i> 1 mg/Kg por 5 dias em ratos Wistar	Redução da SI	---	ROJAS <i>et al.</i> , 2003
DEX <i>s.c</i> 2ug/dia por 21 dias em ratos Wistar	Redução na SI	Inalterado	SEVERINO <i>et al.</i> , 2002
DEX <i>i.p</i> 2 mg/Kg por 12 dias em ratos SD	Redução na SI	Modesto aumento	KARLSSON <i>et al.</i> , 2001

DEX <i>i.p</i> 5 µg por 3 ou 4 dias em ratos SD	Redução na SI	Modesto aumento	STOJANOVSKA <i>et al.</i> , 1990
--	------------------	--------------------	-------------------------------------

DEX: Dexametasona; IP: Intraperitoneal; SC: Subcutâneo; SD Sprague-Dawley.

A habilidade dos GCs em promover redução na sensibilidade à insulina leva a uma resposta compensatória adaptativa do pâncreas, que acontece de maneira dose e tempo dependente. Essa resposta é demonstrada pelo aumento da massa e função das células beta pancreáticas, levando ao aumento da secreção de insulina (BEARD *et al.*, 1984; RAFACHO *et al.*, 2008; FRANSSON *et al.*, 2014). Por vezes, a secreção compensatória de insulina é suficiente para manter a normoglicemia (OGAWA *et al.*, 1992; SCHNEITER; TAPPY *et al.*, 1998; RAFACHO *et al.*, 2011; PETERSONS *et al.*, 2013); no entanto, dependendo da intensidade do insulto pode não ser suficiente, promovendo um quadro de hiperglicemia (GAO *et al.*, 2007).

Em síntese, os GC endógenos são imperativos para as respostas contra regulatórias metabólicas e imunes. No entanto, a administração exógena dependendo da dose e tempo de tratamento promove efeitos adversos, em especial sobre a sensibilidade à insulina.

1.3.2 Modelos baseados na ingestão de frutose

Entre os açúcares mais comuns da nossa dieta destacam-se a sacarose, a frutose e a glicose. A frutose é um monossacarídeo naturalmente presente em frutas e no mel ou em alimentos industrializados através do uso de adoçantes (TAPPY; LE 2010). A frutose é absorvida partir das microvilosidades da membrana luminal dos enterócitos via transportador de glicose GLUT5 e posteriormente para a corrente sanguínea via GLUT2 presente na membrana basolateral (CORPE *et al.*, 1999). Após a absorção intestinal, a frutose é rapidamente captada pelo fígado, utilizando o mesmo transportador que a glicose, o GLUT2 (CHEESEMEN *et al.*, 1993).

O metabolismo da frutose é relativamente rápido, isso acontece por conta da ação enzimática da frutocinase, uma enzima de alta especificidade pela frutose que a converte em frutose-1-fosfato (P). Posteriormente, a frutose-1-P é metabolizada em gliceraldeído e di-

hidroxiacetona-P pela aldolase B. Em seguida, o gliceraldeído é convertido em gliceraldeído-3-P. A partir dessa etapa as vias metabólicas da frutose e glicose se convergem para a formação de piruvato e oxidação no ciclo de Krebs. A maior parte da triose-P produzida é convertida em glicose e glicogênio através da gliconeogênese, enquanto pequenas quantidades são convertidas em lactato e ácidos graxos (MAYES 1993). A Figura 3 exemplifica a via metabólica da frutose no fígado.

Diferentemente da glicose, o metabolismo da frutose não é regulado pela insulina ou pela disponibilidade de ATP e citrato, que regulam o metabolismo da glicose conforme o status de energia celular (TORNHEIM; LOWENSTEIN 1976). A conversão de frutose em triose-P ocorre independentemente da ação da insulina, em um processo rápido devido ao baixo K_m da frutocinase e na ausência da retroalimentação negativa por ATP ou citrato. Esses fatores favorecem a via metabólica da frutose em relação a da glicose (MAYES 1993). Entretanto, isso leva a uma depleção dos níveis de ATP em resposta a frutose, e aumento na razão AMP/ATP o que favorece a síntese hepática de ácido úrico (CORTEZ-PINTO *et al.*, 1999; JOHNSON *et al.*, 2013) (Figura 3).

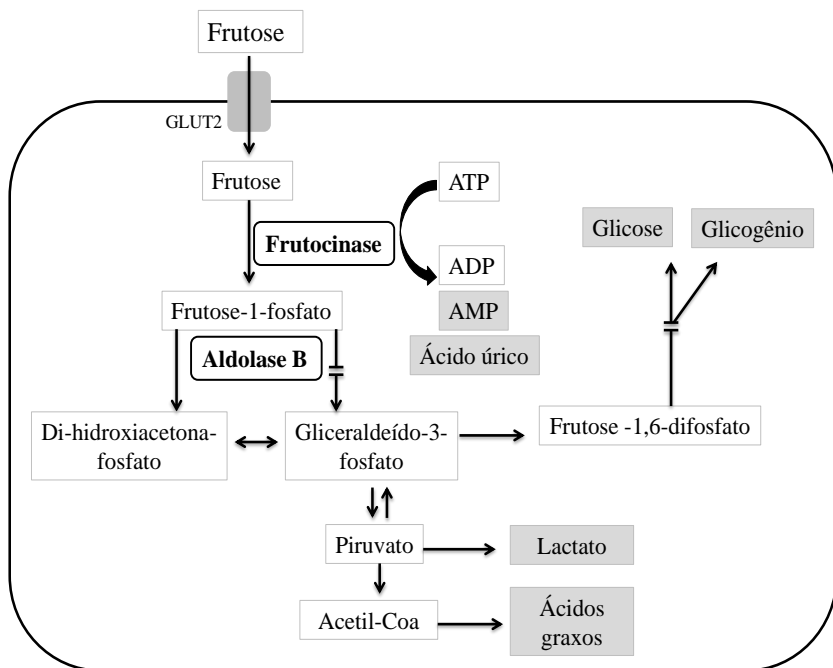


Figura 3. Metabolismo da frutose no fígado. Os passos iniciais da via metabólica da frutose são mediados pelas enzimas frutocinase e aldolase B. A frutose captada pelo fígado pode ser convertida em glicose, glicogênio, lactato e em ácidos graxos a partir da produção de acetil-Coa. A massiva captação e fosforilação da frutose no fígado aumenta a degradação de ATP em AMP e favorece a formação de ácido úrico. Fonte: Adaptado de TAPPY; LÊ 2010.

A hiperurecemia é uma característica presente em modelos de SM induzidos por frutose (JOHNSON *et al.*, 2013). O aumento de ácido úrico favorece vias de estresse oxidativo mitocondrial, contribui para síntese de triacilglicerol hepático e redução da sensibilidade à insulina em fígado e tecido adiposo (BALDWIN *et al.* 2011; LANASPA *et al.*, 2011, 2012). Em contrapartida, a inibição da síntese de ácido úrico promove melhora desses parâmetros alterados pela dieta (BALDWIN *et al.*, 2011; LANASPA *et al.*, 2011), destacando o papel desse metabólito nos desfechos da SM induzida por frutose.

Muitos trabalhos vêm demonstrando o impacto da frutose sobre o perfil lipídico. Dietas ricas em frutose são potentes estimuladoras da lipogênese *de novo* hepática (LDN) e promovem hipertriacilgliceridemia tanto em modelos experimentais com roedores quanto em humanos (BAR-ON; STEIN 1958; FAEH *et al.*, 2005; SOFTIC *et al.*, 2016). Na via da LDN, parte dos átomos de carbono da frutose são convertidos em ácidos graxos. Além disso, a frutose pode aumentar a expressão de proteínas lipogênicas no fígado tais como do fator de transcrição SREBP-1c (do inglês *Sterol regulatory element-binding protein 1*), um elemento chave na lipogênese *de novo*, e o ChREBP (*carbohydrate-responsive element binding protein*) o qual regula positivamente a expressão da Acetil-Coa carboxilase (ACC) e da enzima ácido graxo sintase (FAS). Simultaneamente, a frutose inibe a oxidação de lipídios favorecendo a reesterificação de ácidos graxos e síntese de VLDL no fígado (TOPPING; MAYES 1972; SOFTIC *et al.*, 2016).

Em indivíduos saudáveis alimentados com uma dieta rica em frutose por 6 dias foram observados expressivo aumento nos níveis circulantes de triacilglicerol com paralelo ao aumento da LDN e redução na sensibilidade à insulina (FAEH *et al.*, 2005). Quando suplementados com óleo de peixe, esses mesmos indivíduos apresentaram redução na LDN e nos níveis circulantes de triacilglicerol, indicando a associação da LDN com a dislipidemia em jejum (FAEH *et al.*, 2005). Além disso, Chong e colaboradores (2007) demonstraram que após a administração aguda de frutose o aumento nos níveis plasmáticos de triacilglicerol é principalmente devido ao prejuízo no *clearance* das

lipoproteínas ricas em triacilglicerol, pelo menos em parte devido a baixa ativação das lipoproteínas lipases. Esses dados também foram corroborados pela ingestão crônica de bebidas adoçadas com frutose por 10 semanas (SWARBRICK *et al.*, 2011). Em síntese, o aumento na LDN e principalmente o prejuízo no *clearance* das lipoproteínas ricas em triacilglicerol contribuem para a hiperlipidemia induzida por dietas ricas em frutose (PARKS *et al.*, 2000).

Outro ponto que é modulado por conta do desbalanço lipídico em dietas ricas em frutose é a deposição de gordura ectópica. No fígado, o acúmulo de gordura pode estar envolvido com (a) aumento da lipogênese *de novo*, (b) aumento da expressão de genes lipogênicos e (c) redução na oxidação de lipídios hepáticos (TAPPY; LE 2010). Esse acúmulo de gordura nos hepatócitos (>5%) é definido como esteatose hepática não alcoólica (NAFLD do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*) (KLEINER *et al.*, 2005). Nesse contexto, o aumento de diacilglicerol, um precursor intermediário para síntese de triacilglicerol, é fortemente associado com resistência á insulina. Isso acontece por que esse precursor é capaz de ativar isoformas atípicas da cinase PKC (DONNELLY *et al.* 1995; JORNAYVAZ; SHULMAN 2012), que, como já descrito anteriormente, regulam negativamente a via de sinalização da insulina.

O aumento da adiposidade visceral é outra consequência do consumo de dietas ricas em frutose, especialmente o consumo prolongado (GE *et al.*, 2016; ABDULLA *et al.*, 2016; NOVAK *et al.*, 2015). A expansão do tecido adiposo é resultante tanto do efeito da frutose sobre a hipertrofia de adipócitos (ZUBIRIA *et al.* 2014) quanto sobre a hiperplasia (ZUBIRIA *et al.* 2016). Além disso, a frutose pode afetar negativamente a taxa metabólica. Indivíduos obesos sujeitos a ingestão de bebidas adoçadas com frutose apresentaram redução no gasto energético e na taxa de oxidação de gordura (COX *et al.* 2012). Esses resultados não foram corroborados pela ingestão de glicose e demonstram potenciais mecanismos para indução de obesidade central.

O consumo de açúcares na dieta nunca foi tão elevado quanto nas últimas décadas. Ao longo da evolução, a dieta do homem paleolítico consistia-se principalmente de proteínas, com baixa quantidade de carboidratos os quais eram principalmente de frutas e raízes (DELLUC *et al.*, 1995). A partir do século XVIII com o desenvolvimento do comércio intercontinental e o refinamento do açúcar a partir da cana, o açúcar se tornou progressivamente popular, dado a sua alta palatabilidade. Então, no início do século XX os açúcares tornaram-se o principal componente da nossa dieta. Com o desenvolvimento na

indústria de alimentos nos anos 60, deu-se início a extração de glicose e frutose a partir do amido de milho (MARSHALL; KOOI 1957), o qual resultou na produção de adoçantes derivados do milho, principalmente o xarope de milho rico em frutose (HFCS) (WHITE 2008). O HFCS são os adoçantes mais consumidos no mundo, pois possuem baixo custo e a alta palatabilidade (TAPPY; LE 2010).

Devido ao aumento no consumo de alimentos adoçados com HFCS, o consumo de frutose aumentou exponencialmente entre 1970 e 2007, e os refrigerantes são considerados a principal fonte desse carboidrato na dieta moderna (BRAY *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2008). Paralelo ao aumento no consumo de HFCS houve aumento na prevalência de obesidade e SM na população mundial (TAPPY; LE 2010). Isso corrobora com os efeitos adversos associados com consumo de frutose em bebidas adoçadas, tais como aumento da adiposidade visceral, dislipidemia, esteatose hepática, hiperurecemia, RI e hipertensão (HWANG *et al.*, 1987; STANHOPE; HAVEL 2009; SOFTIC *et al.*, 2016).

Dietas ricas em frutose são frequentemente utilizadas para indução de modelos experimentais de SM em ratos (HWANG *et al.*, 1987; LEIBOWITZ *et al.*, 2013). Entretanto, a administração e as concentrações são variáveis. Quando administrada na água de beber as concentrações de frutose geralmente são entre 10% - 20% (TOOP; GENTILI 2016), semelhantes às concentrações presentes em bebidas adoçadas. A Tabela 5 apresenta um conjunto de trabalhos com a administração de frutose em ratos. Em síntese, os efeitos adversos promovidos pela frutose são fortes fatores de risco para o desenvolvimento do DM2.

Tabela 5. Efeitos metabólicos da frutose em ratos

Modelo (frutose na água)	Glicose sanguínea	Triacilglicerois sanguíneos	Sensibilidade á insulina (SI) ou insulina plasmática	Adiposidade	Ref.
10% por 5 semanas em ratos Wistar	Sem efeito	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	Aumento	Ge <i>et al.</i> , 2016

20% por 8 semanas em ratos SD	Aumento	Aumento	Aumento na insulina	Aumento	ABDULLA <i>et al.</i> , 2016
15% por 8 semanas em ratos SD	Aumento	Aumento	---	Aumento	NOVAK <i>et al.</i> , 2015
20% por 8 semanas em ratos SD	---	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	---	DEMIRTAS <i>et al.</i> , 2015
10% por 16 semanas em ratos Wistar	Aumento	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	Aumento	IBRAHIM <i>et al.</i> , 2015
20% e 25% por 8 semanas em ratos Wistar	Aumento	Aumento	---	Aumento	MAMIKUTTY <i>et al.</i> , 2014
10% por 12 semanas em ratos Wistar	Aumento	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	Aumento	MAHMOUD; ELSHAZLY 2014
10% por 3 semanas em ratos Wistar	Sem efeito	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	Sem efeito	CASTRO <i>et al.</i> , 2014
10% por 3 semanas em ratos Wistar	Sem efeito	Aumento	Redução na SI	Sem efeito	FARINA <i>et al.</i> , 2013
10% por 3 semanas em ratos Wistar	Sem efeito	Aumento	Redução na SI e aumento na insulina	Sem efeito	MAIZTEGUI <i>et al.</i> , 2011

10% por 8 semanas em ratos Wistar	Modesto aumento	Aumento	Aumento na insulina	Sem efeito	SHAHRAKI <i>et al.</i> , 2011
-----------------------------------	-----------------	---------	---------------------	------------	-------------------------------

SD: Sprague-Dawley; SI: Sensibilidade à insulina

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA-3

Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), tais como Omega-3 (*n*-3) e Omega-6 (*n*-6) exercem importantes funções no nosso organismo e são definidos como essenciais, dada a sua necessidade de ingestão. Esses ácidos graxos são absorvidos pelo trato digestivo, alcançam o fígado e são esterificados em fosfolipídios para posterior liberação para corrente sanguínea em forma de lipoproteínas (CALDER, 2012).

O *n*-3 mais simples é o ácido alfa linolênico, o qual é precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA). As fontes de EPA e DHA são praticamente marinhas, encontrados principalmente em peixes como salmão, arenques, sardinhas, cavalas, atum, bacalhau e trutas. O óleo de peixe, obtido a partir dos peixes com alta fonte de *n*-3, são amplamente comercializados como suplemento alimentar. As concentrações de EPA e DHA variam de acordo com a fonte de extração, mas geralmente compreendem 30% dos ácidos graxos presentes em 1 grama de óleo de peixe (CALDER; YAQOOB 2009).

Estudos de longa data demonstram que a suplementação com cápsulas de óleo de peixe modificam o perfil de ácidos graxos e a incorporação de EPA e DHA em diferentes tipos celulares, tais como eritrócitos, leucócitos, cardiomiócitos, hepatócitos, adipócitos entre outros (KATAN *et al.*, 1997). A incorporação desses *n*-3 promove redução do *n*-6 ácido araquidônico (AA) e da produção de eicosanoides, os quais apresentam ações pró-inflamatórias (KALUPAHANA *et al.*, 2011).

A incorporação de *n*-3 na membrana plasmática altera as propriedades físicas da membrana como fluidez e estrutura, os quais influenciam receptores, transportadores e canais iônicos (CALDER; YAQOOB 2009). Também influenciam vias de sinalização intracelular, modulando a expressão de fatores de transcrição e cinases (NFκB, receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), SREBP-1e da proteína cinase ativada por AMP (AMPK)) (MILES; CALDER 1998). Esses ácidos graxos apresentam potencial impacto anti-inflamatório, uma vez que reduzem a produção de eicosanoides e

também são precursores de mediadores lipídicos com ação anti-inflamatória (SERHAN *et al.*, 2000).

Os PPARs são fatores de transcrição que atuam regulando a expressão gênica. Esses fatores de transcrição são ativados por ligantes que incluem os *n-3* e eicosanoides (KLIEWER *et al.*, 1997) e são capazes de modular o metabolismo e respostas celulares. O PPAR- α é expresso principalmente no fígado e regula a expressão de enzimas chaves na β -oxidação e no metabolismo de lipoproteínas (SCHOONJANS *et al.* 1996). Em contrapartida, o PPAR- γ é expresso no tecido adiposo, regulando a diferenciação de adipócitos, aumento da captação e armazenamento de ácidos graxos e a melhora da sensibilidade à insulina (SCHOONJANS *et al.*, 1996). A resposta anti-inflamatória dos *n-3* também é mediada através da redução da ativação do NF κ B e consequentemente da produção de citocinas pró-inflamatórias (XI *et al.*, 2001). De acordo com Vanden-Berghe e colaboradores (2003), a interação PPAR- γ com NF κ B inibe a sua translocação para o núcleo e portanto a transcrição de seus genes alvos. A Figura 4 exemplifica as ações dos *n-3* via PPARs sobre o perfil lipídico, glicídico e inflamatório.

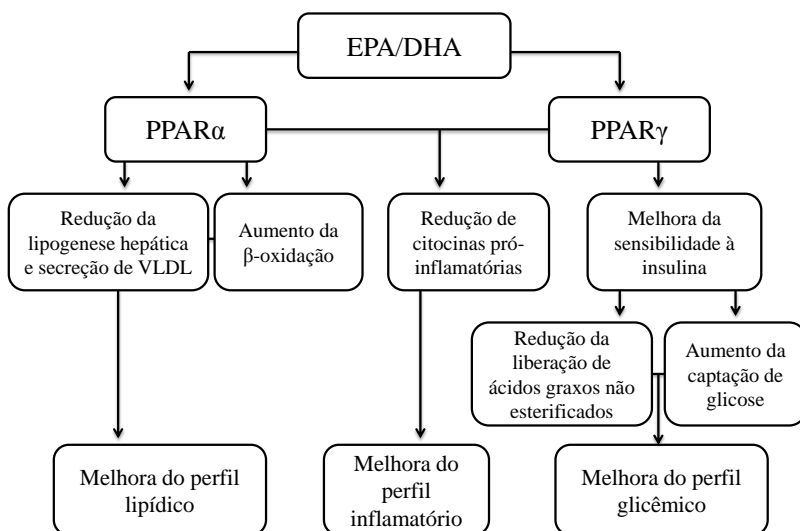


Figura 4. Mecanismos de ação dos *n-3* através dos PPARs. Os ácidos graxos EPA e DHA podem modular positivamente o perfil lipídico via PPAR α no fígado e melhorar o perfil glicêmico e inflamatório via PPAR γ no tecido

adiposo. EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: do ácido docosahexaenóico; PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissomos. Fonte: Adaptado de CALDER, 2012.

A associação positiva da ingestão dos *n-3* com o perfil lipídico foi sugerida na década de 70 por Bang e Dyerberg. Esses pesquisadores observaram que indivíduos nativos da Groelândia que consumiam uma dieta rica em fontes de *n-3* apresentavam baixas concentrações de triacilglicerol circulantes e baixa incidência de doenças cardiovasculares. Desde então, uma série de estudos com humanos e modelos experimentais têm constatado esse efeito, tanto a partir do aumento de *n-3* na dieta quanto por suplementação (HARRIS *et al.*, 1989; SCHMIDT *et al.*, 1993; HEDENGRAN *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016).

A hipertriacilgliceridemia é definida como níveis de triacilglicerol plasmático superiores a 150 mg/dL em humanos (CARROLL; KIT; LACHER 2015) e é umas das características presentes no quadro de SM. Como os *n-3* podem ser uma fonte alternativa para o tratamento da hipertriacilgliceridemia, vários estudos têm investigado os mecanismos responsáveis por esse efeito. Nesse sentido, os *n-3* atuam promovendo o *clearance* de triacilglicerol plasmático através de quatro principais mecanismos: (a) redução da lipogênese hepática via supressão da SREBP-1 (HORTON *et al.*, 1998); (b) aumento da β -oxidação de ácidos graxos (BAYS *et al.*, 2008); (c) inibição de enzimas envolvidas na síntese de triacilglicerol, tais como a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e (d) aumento da expressão das lipoproteínas lípases (BACKES *et al.*, 2016).

Outro potencial efeito dos *n-3* é sobre a sensibilidade à insulina. Enquanto os ácidos graxos saturados reduzem a sensibilidade, os AGPI estão associados com a melhora da sensibilidade e secreção de insulina (BHASWANT *et al.*, 2015). A suplementação com EPA+DHA em animais *ob/ob* promoveu melhora da sensibilidade à insulina através aumento da expressão do PPAR γ , GLUT4, IRS-1 e da AMPK em tecido adiposo (GONZALEZ-PERIZ *et al.*, 2009). Luo e colaboradores (1996) demonstraram que a sensibilidade à insulina foi correlacionada com a composição dos fosfolipídios de membrana, de modo que adipócitos de ratos tratados com óleo de peixe apresentaram maior sensibilidade à insulina. Esses resultados enfatizam a relação da incorporação dos AGPI em membranas celulares e a modulação de respostas intracelulares dependente do perfil dos ácidos graxos. De modo semelhante, houve aumento na expressão do GLUT4 e na captação de glicose em

adipócitos, mas não músculo, de ratos suplementados com óleo de peixe (PEYRON-CASO *et al.*, 2002).

Os mecanismos responsáveis pela prevenção da RI a partir da suplementação com óleo de peixe não estão completamente esclarecidos, mas em modelos de dieta rica em carboidratos o acúmulo de gordura ectópica está diretamente relacionado com a sensibilidade à insulina, de modo que a prevenção da RI nesses animais foi observada a partir dos efeitos hipolipidêmicos dos *n-3* (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Em suma, os *n-3* apresentam efeitos positivos sobre o perfil inflamatório, lipídico e glicêmico, no entanto esses efeitos parecem ser dependentes da dose e tempo de suplementação (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre alterações no metabolismo lipídico e glicídico

Modelo experimental	Óleo de peixe	Principais resultados	Referências
Modelo de obesidade (induzido por dieta rica em gordura) em ratos Wistar machos	21,8% da dieta por 6 semanas	Atenuação no perfil lipídico e melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	CAVALIERE <i>et al.</i> , 2016
Modelo de SM (induzido por dieta rica em frutose) em ratos Wistar machos	2%, 5% e 7% da dieta por 30 dias	Redução no conteúdo de triacilglicerol hepático e nos níveis séricos. Melhora da sensibilidade à insulina e redução da expressão da SREBP-1 e FAS em fígado. Resultados para as dietas com 5% e 7% de óleo de peixe.	DE-CASTRO <i>et al.</i> , 2015

Modelo de obesidade (induzido por GMS) em ratos Wistar machos	1 g/Kg/dia via gavagem por 4 semanas	Melhora da sensibilidade à insulina e da oxidação de glicose muscular. Redução nos níveis plasmáticos de triacilglicerol e colesterol total	YAMAZAKI <i>et al.</i> , 2011
Modelo de SM (induzido por sacarose) em ratos Wistar machos	7,5% da dieta com óleo de peixe por 6 semanas	Redução nos níveis plasmáticos de insulina e lipídeos totais	AGUILERA <i>et al.</i> , 2004

SM: Síndrome metabólica; GMS: Glutamato monossódico; SREBP-1: proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1; FAS: Ácidos graxo sintase.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (IDF), no Brasil mais de 9% da população é diagnosticada com DM2 e movimentam quase 22 bilhões de dólares por ano gastos com essa doença. Sendo assim, esforços para prevenir e tratar o DM2 são questões de prioridade de saúde pública, com benefícios sociais, econômicos e na saúde do paciente.

Ao longo dos anos, modelos experimentais de DM2 têm contribuído significativamente para a compressão dos fatores causais e disfunções associadas à patogênese dessa doença crônica. Entretanto, a maioria desses modelos não são induzidos por agentes que representam fatores de risco para o estabelecimento do DM2 na população (ex., animais geneticamente modificados, modelos cirúrgicos, drogas que lesam as células beta associadas a dietas hiperlipídicas muito acima das recomendações dietéticas).

Agentes farmacológicos como os GC são amplamente utilizados na prática clínica e apresentam efeitos adversos sobre a homeostase glicêmica e lipídica (ex., redução na sensibilidade à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia) dependendo da dose e tempo de administração. Além disso, o aumento no consumo de alimentos adoçados com frutose é fortemente associado com a prevalência de SM na população mundial, a julgar por seus efeitos sobre o aumento da

adiposidade visceral, dislipidemia, esteatose hepática, hiperurecemia, resistência á insulina e hipertensão. Ambos os fatores são utilizados para indução de modelos experimentais de SM e/ou RI, no entanto, não induzem isoladamente um modelo diabético, caracterizado por hiperglicemia acima de 200 mg/dL.

Levando-se em conta os efeitos adversos dos GC e as repercussões metabólicas do consumo de frutose, nós hipotetizamos que a administração crônica e concomitante dessas substâncias poderia resultar em um contexto metabólico equivalente ao DM2 em ratos. Sendo assim, produziríamos um novo modelo experimental para investigação dos parâmetros envolvidos na patogênese do DM2 que nos permitiria envolver propostas interventivas como a suplementação com o óleo de peixe, haja vista que se trataríamos de um modelo com tratamento crônico. Além disso, propomos avaliar as repercussões metabólicas após o término do protocolo experimental, a fim de avaliar se as possíveis alterações do modelo são permanentes ou transitórias, sendo uma metodologia não muito explorada na literatura.

Em síntese, hipotetizamos que a administração conjunta dos insultos promova um fenótipo de DM2 e que a suplementação com óleo de peixe e a retirada dos insultos impacte positivamente sobre os parâmetros metabólicos alterados nesse modelo experimental.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração conjunta de frutose e prednisolona sobre a homeostase glicêmica e lipídica bem como no conteúdo de proteínas chaves em tecidos periféricos e no hipotálamo de ratos. Ainda, avaliar o impacto da suplementação com óleo de peixe e da interrupção da exposição aos insultos sobre os desfechos metabólicos e moleculares.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os parâmetros de caracterização do modelo experimental, com dados murinométricos, metabólicos e a sensibilidade à insulina em ratos tratados com frutose e prednisolona;
2. Avaliar as possíveis alterações moleculares envolvidas com a via de sinalização da insulina e com a via pró-inflamatória em tecidos periféricos (fígado e tecido adiposo) e no hipotálamo;

3. Verificar o impacto da suplementação com óleo de peixe sobre os parâmetros metabólicos e moleculares do modelo experimental proposto;
4. Verificar se as eventuais alterações metabólicas e moleculares são transitórias ou permanentes após o término dos tratamentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta dissertação está inserida em uma proposta maior intitulada “*Repercussões metabólicas da administração crônica de frutose e prednisolona: busca por novos modelos experimentais envolvendo alterações no metabolismo de glicose e do potencial impacto positivo da suplementação com óleo de peixe*” a qual deu origem a duas dissertações de mestrado com vertentes distintas, a fim de otimizar a utilização dos animais e permitir maior exploração do modelo experimental. Dessa forma, os dados de caracterização do modelo experimental são comuns para as duas dissertações.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por caixa) e em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de iluminação claro-escuro (06:00-18:00 claro, 18:00-06:00 escuro), alimentados com ração comercial padrão (Nuvilab®, Nuvital, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC com protocolo de nº PP00782.

4.2 EUTANÁSIA

O procedimento de eutanásia foi realizado em animais jejuados por exposição ao CO₂ seguido por decapitação por guilhotina, de acordo com as normativas do CONCEA.

4.3 DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para execução desta proposta foram utilizados 80 ratos, os quais foram divididos em 7 grupos experimentais de 10 ou 15 animais. Os animais foram aclimatados por 10 dias no biotério setorial do Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas até completarem 40 dias de vida e serem divididos em grupos experimentais. Finalmente, os ratos com 40 dias de vida foram divididos nos seguintes grupos: **Grupo controle (Ctl)** - os animais receberam água potável (filtrada) *ad libitum*

durante todo o protocolo experimental; **Grupo frutose (Fru)** – os animais receberam água potável (filtrada) acrescida de 20% de frutose (Synth, Diadema, SP, Brasil; 0,8 Kcal/mL) *ad libitum* durante 90 dias consecutivos. A introdução da frutose foi realizada de forma escalonada durante os dez primeiros dias, iniciando com 4% (1° ao 3° dia) e seguindo com 8% (4° ao 6° dia), 12% (7° e 8° dia), 16 % (9° e 10° dia) e posteriormente 20% de solução de frutose. A escolha da dose foi baseada em publicações prévias (ALZAMENDI et al., 2009; SHELUDIAKOVA; ROONEY; BOAKES 2012). **Grupo prednisolona (Pred)** – os animais receberam água potável (filtrada) acrescida de 12,5 µg/mL de prednisolona (Prelone ® Aché, Campinas, SP, Brasil) *ad libitum* por 90 dias consecutivos. A introdução da prednisolona foi realizada de forma escalonada, iniciando com 4 µg/mL (1° ao 3° dia) e seguindo com 6 µg/mL (4° ao 6° dia), 8 µg/mL (7° e 8° dia), 10 µg/mL (9° e 10° dia) e posteriormente 12,5 µg/mL de solução de prednisolona. A escolha da dose de prednisolona foi baseada em trabalhos prévios (KARATSOREOS et al., 2010; FRANSSON et al., 2013) e em estudos pilotos realizados em nosso laboratório. **Grupo frutose + prednisolona (FruPred)** – os animais receberam, concomitantemente, os mesmos tratamentos dos grupos Fru e Pred. **Grupo FruPred + óleo de peixe** – Os animais foram tratados nos mesmos moldes do grupo FruPred. A partir do 45° dia do protocolo experimental, os animais foram suplementados com óleo de peixe (1 g/Kg de peso corpóreo, via gavagem) (Nature's Bounty, New York, USA. Quadro 1 e 2) (YAMAZAKI et al., 2011) até o 90° dia do protocolo experimental. A suplementação ocorreu uma vez ao dia, entre as 8:00 e 9:00, por 45 dias consecutivos. **Grupo óleo de peixe (Op)** – os animais receberam água potável (filtrada), assim como o grupo Ctl e foram suplementados com óleo de peixe como descrito no grupo FruPredOp. Os grupos não suplementados com óleo de peixe receberam óleo mineral (1 ml/Kg, via gavagem), e não foi observado nenhum sinal indesejável, como diarreia ou fezes amolecidas. **Grupo FruPred + reversibilidade (Rev)** – após os 90 dias de tratamento com solução de frutose e prednisolona um grupo de animais FruPred foi mantido com água potável (sem frutose e prednisolona) e ração padrão por mais 90 dias. O delineamento do estudo é apresentado na Figura 5. É importante salientar que ao longo do protocolo experimental 3 ratos morreram, sendo um do grupo Ctl e dois do grupo FruPred.

Quadro 1. Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe.

Informação nutricional	
Porção de 1,69g (1cápsula)	
Quantidade por porção	
Valor energético	11Kcal = 46kJ
Gorduras totais, das quais:	1,2g
Gorduras saturadas	0,32g
Gorduras trans	0g
Gorduras monoinsaturadas	0,27g
Gorduras polinsaturadas	0,44g
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	247mg
Ácido docosaexaenoico (DHA)	115mg
Vitamina E	1,26mg

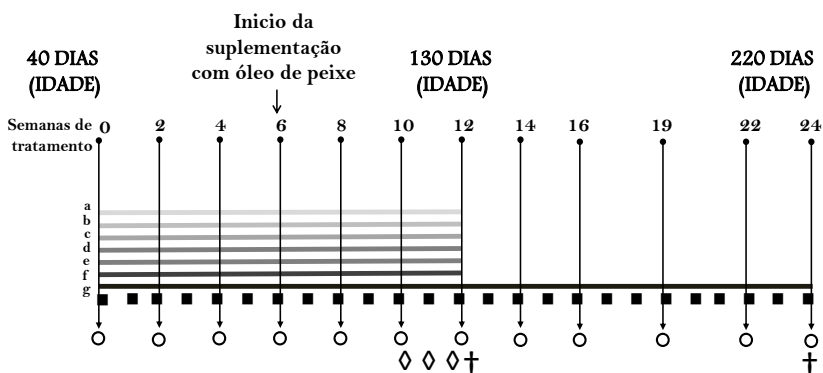
Fonte: Adaptado do rótulo do óleo de peixe encapsulado Nature's Bounty®

Quadro 2. Composição dos ácidos graxos por cápsula de óleo de peixe Nature's Bounty

Composição de ácidos graxos (1,69g)	
Ácido graxo	%
Alfa-linolênico (ômega 3)	0,2
EPA (ômega 3)	25,1
DHA (ômega 3)	18,3
Palmitoleico (ômega 7)	12,0
Linoléico (ômega 6)	2,8

Oleico (ω 6)	10,6
Mirístico (AGS)	10,5
Palmítico (AGS)	16,8
Esteárico (AGS)	3,8

Dados obtidos a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosaexaenoico; AGS: ácidos graxos saturados.



LEGENDA:

- | | | |
|------------|--------------|---|
| a. Ctl | e. Op | ■ Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica |
| b. Fru | f. FruPredOp | ○ Glicemia e triacilgliceridemia |
| c. Pred | g. Rev | ◇ Testes funcionais (ipPTT, oGTT e ipITT) |
| d. FruPred | | † Eutanásia e coleta de órgãos |

Figura 5. Delineamento experimental. Vide o texto para compreensão detalhada

Os dados serão apresentados em módulos. O módulo I tem por objetivo abordar o modelo experimental, comparando os grupos Ctl, Fru, Pred e FruPred. O módulo II tem o objetivo de verificar o efeito da suplementação com óleo de peixe, comparando os grupos Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, e o módulo III tem por objetivo verificar as alterações pós-tratamento, comparando os grupos Ctl, FruPred e Rev. Os dados dos grupos Ctl e FruPred se repetirão entre os módulos.

4.4 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS

4.4.1 Peso corpóreo

A verificação do peso corpóreo foi realizada semanalmente desde o início do protocolo experimental até a eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL; Piracicaba, SP, Brasil).

4.4.2 Consumo de ração

O consumo de ração foi acompanhado semanalmente como descrito para o peso corpóreo. A determinação da ingestão alimentar foi realizada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida pelo número de animais por gaiola. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ração ingeridos por 100 g de peso corpóreo para se obter a normalização destes parâmetros.

4.4.3 Ingestão hídrica

A ingestão hídrica foi acompanhada semanalmente como descrito para o peso corpóreo. A determinação da ingestão hídrica foi realizada pela quantificação do volume de líquido remanescente (não ingerido) descontado do total daquele depositado no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média ingerida por animal foi obtida através da divisão do volume total ingerido pelo número de animais por gaiola. Os resultados foram expressos em mililitros (mL) de líquido ingerido por 100 g de peso corpóreo para se obter a normalização destes parâmetros.

4.4.4 Ingestão calórica

A ingestão calórica foi acompanhada semanalmente assim como peso corpóreo, ingestão alimentar e hídrica. A determinação da ingestão calórica total foi realizada pela soma da Kcal de ingestão de ração, da ingestão hídrica e da suplementação com óleo de peixe, quando foi o caso. Os resultados foram expressos em Kcal por 100 g de peso corpóreo para se obter a normalização destes parâmetros.

4.4.5 Glicose e triacilglicerol sanguíneos

A glicemia foi determinada a cada 15 dias e imediatamente antes da eutanásia na condição de jejum (12 h) através do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir de

gota de sangue obtida da ponta da cauda. O triacilglicerol (TG) também foi determinado nos mesmos períodos de coleta de glicose sanguínea. Para determinação da triacilgliceridemia foi coletado 70 μ l de sangue obtidos da ponta da cauda. O sangue foi alíquotado em eppendorf contendo anticoagulante NaF (Glistalab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil) e centrifugado a 400x g por 10 min a 21°C e o plasma armazenado a - 80°C para posterior quantificação do TG (espectrofotometria) de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica; Varginha, MG, Brasil).

4.4.6 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT)

O ipPTT foi realizado na 10^a semana de tratamento em ratos jejuados (12 h) sem uso de anestésico. Inicialmente, os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi injetada solução de piruvato (1,25 g/Kg de peso corpóreo) e as amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60 e 150 minutos para determinação das concentrações de glicose sanguínea. A área sob a curva (ASC) da glicose sanguínea ($\Delta G = \text{mg/dL} \cdot 150\text{min}^{-1}$) durante o ipPTT foi calculada pelo método trapezoidal (FERREIRA *et al.*, 2012).

4.4.7 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)

O oGTT foi realizado na 11^a semana de tratamento em animais jejuados (12h) sem uso de anestésico. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito anteriormente para o ipPTT. Imediatamente, foi administrada solução de D-glicose 50% (2 g/Kg de peso corpóreo, *o.g.*) e amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 minutos foram posteriormente coletadas para determinação das concentrações de glicose sanguínea. A área sob a curva (ASC) da glicose sanguínea ($\Delta G = \text{mg/dL} \cdot 120\text{min}^{-1}$) durante o oGTT foi calculada pelo método trapezoidal (BERGMAN *et al.*, 1985; RAFACHO *et al.*, 2008).

4.4.8 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

O ipITT foi realizado na última semana de tratamento em animais alimentados, sem uso de anestésico. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito anteriormente para o ipPTT. Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (BioHulin®) equivalente a 1 IU/Kg de peso corpóreo. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para dosagem da glicose sanguínea nos

tempos 0, 20, 30 e 40 minutos. A constante de decaimento de glicose (*Kitt*) foi calculado a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 40 min (RAFACHO *et al.*, 2008).

4.4.9 Componentes bioquímicos

Imediatamente após a eutanásia, o sangue do tronco dos animais foi coletado em tubo de ensaio de vidro contendo ou não anticoagulante NaF (Glistab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400x g por 10 min a 21°C e o plasma ou soro foram aliquotados e armazenados a -80°C. A quantificação de insulina, colesterol total e proteínas totais foi realizada a partir do plasma e o ácido úrico e albumina a partir do soro. A insulina foi determinada por meio do kit AlphaLISA® microesfereas (AL204C) (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA), o colesterol, ácido úrico e albumina foram determinados por espectrofotometria de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica® - Varginha, MG, Brasil) e as proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford.

4.4.10 Avaliação da sensibilidade à insulina pela modelo de análise homeostática (HOMA-IR) e índice TyG

O HOMA foi calculado a partir da fórmula: [glicemia de jejum (mM) x insulinemia de jejum (μIU/mL)]/22.5 (MATTHEWS *et al.*, 1985). O TyG, cálculo alternativo proposto para verificação da sensibilidade periférica à insulina, foi definido a partir da fórmula $\text{Ln}[(\text{triacilgliceridemia de jejum (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)})/2]$ (GUERRERO-ROMERO *et al.*, 2010).

4.4.11 Peso de órgãos

Imediatamente após a eutanásia, os órgãos de interesse foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, SP, Brasil). O peso relativo dos órgãos foi determinado através da normalização pelo peso corpóreo de cada animal.

4.4.12 Conteúdo de glicogênio hepático

Para determinação do glicogênio hepático aproximadamente 400 mg de fígado foram coletados em tubos de ensaio contendo solução de KOH 30% e fervidos por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi acrescido Na₂SO₄ e etanol. As amostras foram homogeneizadas, submetidas ao banho-maria fervente por 15 segundos e centrifugadas a

800 x g por 10 minutos a 21°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água destilada quente. Posteriormente, etanol foi adicionado e novamente o material foi homogeneizado, rapidamente aquecido e centrifugado. Após diluição do precipitado em H₂O destilada, o conteúdo de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria (490 nm) em reação com reagente fenol (LO; RUSSEL; TAYLOR 1970).

4.4.13 Conteúdo de triacilglicerol hepático

Para quantificação do conteúdo de TG hepático, aproximadamente 100 mg de fígado foram coletados em tudo de ensaio contendo NaCl (1M) e homogeneizados (UltraTurrax, IKA®, Staufen, Alemanha). Em seguida, foi adicionado solução de clorofórmio/metanol (2:1) e o material foi centrifugado a 5000 x g por 5 minutos a 21°C. Após centrifugação, foi coletada a fase inferior (metanólica) para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspenso em Trinton X100/Metanol (2:1) e foi feito a dosagem do TG através do ensaio enzimático colorimétrico (Biotécnica® - Varginha, MG, Brasil) (RAFACHO *et al.*, 2008).

4.4.14 Lipólise

Imediatamente após a eutanásia, fragmentos de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram coletados para determinação da lipólise estimulada por isoproterenol. Para tal, fragmentos do tecido adiposo (100mg) foram incubados em solução de Krebs (pH 7.4) contendo albumina sérica bovina (1%), glicose (5,6 mM), CO₂ (5%) e O₂ (95%) pelo período de 1 hora a 37°C na presença ou não de 20 µM de isoproterenol. Ao final da incubação, amostras do meio foram coletadas e mantidas a 4°C. A determinação do glicerol foi realizada por ensaio colorimétrico enzimático (Biotécnica® - Varginha, MG, Brasil) (BUCOLO; DAVID 1973). Os resultados foram expressos como microgramas por miligramas de tecido por hora (µg/mg/1h).

4.5. ANÁLISE DO ESTADO REDOX EM FRAGMENTOS DE FÍGADO

A análise do estado redox foi determinado pela avaliação do estresse oxidativo através de hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas, e da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase.

4.5.1 Hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos lipídicos presentes no fígado foram quantificados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FOX), conforme descrito por Nourroz-Zadeh, Tajaddini-Sarmadi e Wolff (1994). Aliquotas de 50 μL de fígado previamente homogeneizado em solução salina foram centrifugadas por 5 minutos à 5000g com 200 μL de metanol. 18 μL do sobrenadante foi adicionado em uma placa de 96 poços juntamente com 2 μL de metanol (branco da amostra) ou 2 μL de trifetilfosfina (TEP) 10 mM. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Após essa incubação, foi adicionado em cada poço 180 μL do reagente FOX (composto por alaranjado de xilenol 1,0mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM, preparados em H_2SO_4 (ácido sulfúrico) 250 mM, e BHT 4,4 mM). Os LOOH presentes na amostra oxidam os cátions ferrosos (Fe^{2+}) da solução de trabalho (FOX). A produção de Fe^{3+} será menor nas amostras tratadas com TEP, visto que nestas, todos os LOOH serão reduzidos. As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente e lidas no espectrofotômetro em 560nm. A concentração de hidroperóxidos lipídicos foi calculada pela diferença entre as absorbâncias das amostras com metanol (branco) e com TEP. Para curva padrão foi utilizada uma diluição seriada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo que o ponto mais alto da curva foi de 3,1 $\mu\text{mol/mL}$ com diluições sucessivas até o ponto zero. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mL}$.

4.5.2 Carbonilação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonila baseados na reação com dinitrofenilidrazina (DNPH) como previamente descrito por Levine et al. (1990). Foram utilizados 2 microtubos para cada amostra contendo 100 μL de fígado previamente homogeneizado em solução salina. Em 1 microtubo foi adicionado 600 μL de DNPH diluído em HCl 2M. No outro microtubo foi adicionado 600 μL apenas de HCl. Após incubação de 1 hora no escuro com agitação a cada 10 minutos foram adicionados 600 μL de ácido tricloroacético 20% (TCA 20%) e centrifugado por 5 minutos à 11000g, 4°C. Foram realizadas três lavagens com 800 μL etanol-etilacetato (1:1) e centrifugação de 10 minutos à 15000g, 4°C. Após essas lavagens foi adicionado 900 μL de ureia 8M dissolvida em tampão de KH_2PO_4 20mM (fosfato de potássio) com pH 2,3 e incubado em banho-maria por 30 minutos à 60°C com agitação no minuto 15. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14000g, 4°C e lidas em

360nm em espectrofotômetro com temperatura ajustada em 37°C. Uma curva com concentrações de 2mg/mL no ponto mais concentrado e diluição até zero foi feita para normalização dos dados com albumina sérica bovina e a solução de ureia 8M, lida em 280nm (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA). O conteúdo de formação de grupos carbonil foi determinado utilizando um coeficiente de 22.000 molar⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.5.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

O princípio do método descrito por Marklund, S e Marklund G (1974) baseia-se na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na amostra. Inicialmente a auto-oxidação do pirogalol 2 mM foi mensurada em espectrofotômetro à 420 nm por 3 minutos. Após essa etapa, 30µL de amostra de fígado previamente homogeneizada em tampão fosfato 50 mM, pH 8,2 foi diluída em 970µL do mesmo tampão e aquecida à 37°C. A auto-oxidação do pirogalol na presença da amostra foi mensurada em microtubos com ou sem pirogalol, à 420nm por 3 minutos. As leituras foram realizadas em Spectrofotômetro (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA). A atividade foi dada pela quantidade que causou a inibição em 50% da auto-oxidação do pirogalol e dividida pela quantidade de proteína na amostra, em U/mg de proteína.

4.5.4 Atividade da enzima catalase

O princípio do método baseia-se na mensuração da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em H₂O + O₂ pela ação da enzima catalase, proposta por Aebi H (1984). Foram pipetados em uma placa de 96 poços de fundo chato, sensível à luz ultra-violeta, 1µL de amostra de fígado previamente homogeneizado, 5µL de peróxido de hidrogênio 0,6 M e 200µL tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,2. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 240nm por 3 minutos e o decaimento das absorbâncias no período foi registrado. As leituras foram realizadas em Spectrofotômetro (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA). A atividade da enzima catalase foi dada pela constante de consumo do peróxido de hidrogênio por minuto, dividida pela quantidade de proteínas na amostra.

4.6. EXTRAÇÃO PROTEÍCA E WESTERN BLOTTING

Imediatamente após a eutanásia, fragmentos de fígado, tecido adiposo epididimário e hipotálamo foram removidos, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em solução de lise celular a 4°C (Cell Signaling, MA, USA) com ultraturrax (IKA®) por 3 séries de 10 segundos cada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf 5424R). A determinação da concentração proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, USA). Alíquotas de proteína total foram acrescidas com 1:3 do volume com tampão Laemmli 4x (10% de β -mercaptoetanol) (BioRad, CA, USA). Imediatamente antes da eletroforese, alíquotas com volume de proteína pré-determinado foram aquecidas por 8 minutos a 70°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese (Mini Protean II – Bio-Rad, CA, USA) em gel de poli(acrilamida) 10-12%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology, USA) na presença de 20% de metanol e 0,05% de SDS em voltagem constante de 100 mV por 100 minutos. Depois de 2 horas de bloqueio com 5% de leite, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas *overnight* com anticorpo primário a 4°C. Foram utilizados os anticorpos policlonais para AKT total (1:1000), anti-phospho AKT (serina 473) (1:1000), anti-phospho AKT (treonina 308) (1:1000), anti-JNK total (1:1000), anti-phospho JNK (treonina183/tirosina185) (1:1000) e anti- β -actina (1:1000) (Cell Signaling). Anti-NF κ B p65 total (1:500), anti-phospho NF κ B p65 (serina 536) (1:500), anti-NF κ B p52 total (1:500), anti-TLR4 (1:500), anti-I κ B total (1:500), anti-phospho I κ B (1:500), anti-phospho c-JUN63 (serina 63), (1:500), anti-AMPK (1:500), anti-phospho AMPK (treonina 172) (1:500), anti-11 β HSD1(1:500) e anti-GR (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário específico por 2 horas (Santa Cruz Biotechnology) em temperatura ambiente. O anticorpo ligado foi detectado por quimiluminescência por meio do sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA). Após a marcação das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com solução de *stripping* (3x de 7 minutos) e em seguida foram lavadas com solução TBST (3x de 10 minutos) para posteriormente serem bloqueadas com 5% de leite por 2 horas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário para β -

actina a 4°C, para determinação do controle interno, e posteriormente com o anticorpo secundário específico. A densitometria foi realizada pelo programa público ImageJ.

4.7. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM HEMÁCIAS

Para avaliar a incorporação dos ácidos graxos *n-3* nas hemácias, o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (NISHIYAMA-NARUKE *et al.*, 1998).

4.7.1 Extração lipídica de hemácias

Para tal, foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Folch *et al.* (1957). Inicialmente 200µl da papa de hemácias foi homogeneizado com 5ml de salina. Foi retirado o sobrenadante e posteriormente adicionado 3,75 ml de metanol:clorofórmio (2:1) para extração por 60 minutos. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 400g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, realizou-se nova lavagem com adição de 480 µl de clorofórmio e 410 µl de água destilada. A amostra foi agitada e permaneceu em repouso por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e descartado e as alíquotas remanescentes foram lavadas por 3 vezes com 1 ml de solução de Folch. Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi seca em nitrogênio gasoso.

4.7.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos foram ressuspensos em 100 µl de metanol e saponificados com 2,0 mL de solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria sob agitação. A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1 M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 3,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e em seguida as amostras foram derivatizadas com BMCC (Bromo metil metoxi coumirin) (NISHIYAMA-NARUKE *et al.*, 1998).

4.7.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e em seguida mais 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8 °C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizadas foram reconstituídas em 100 mL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados nas amostras 100 µL do reagente 1, 100 µL do reagente 2, e 100µl de acetonitrila e foram homogeneizadas durante 30 segundos e aquecidas por 15 minutos a 60° C. Após derivatização, pequenas alíquotas desta solução, foram injetadas em um sistema HPLC (Varian, modelo LC - 10A) e os compostos foram detectados por fluorescência (325 de excitação e 398 nm de emissão). Os dados foram integrados pelo *software Empower Pro Version 2.0* e expressos em porcentagem. Foi utilizado curva padrão contendo 40 µg/ml dos seguintes ácidos graxos: EPA, DHA, mirístico, araquidônico, palmitoléico, linoléico, palmítico, oléico e esteárico.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Graphpad Prism versão 5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). Os resultados foram descritos como média ± erro padrão da média (EPM). Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Simirnov ou D'Agostin and Pearson. Para os dados contínuos que apresentaram distribuição normal, foi aplicado análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguido de *post test* de Tukey ou ANOVA para medidas repetidas. Para dados contínuos que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado Kruskal-Wallis ANOVA seguido de *post test* de Dunns. Para verificação de outliers foi utilizado o programa GraphPad QuickCalcs. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS DO MÓDULO I: *Modelo experimental*

5.1 PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

5.1.1 Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica

Nenhuma diferença foi observada no peso corpóreo entre os quatro grupos experimentais no início do tratamento (Figura 6. A). A partir da terceira semana de tratamento os grupos tratados com prednisolona (Pred e FruPred) apresentaram redução no ganho de peso corpóreo, que persistiu até o final das 12 semanas ($p < 0,05$, $n = 9-13$). O ganho de peso do grupo Fru não diferiu significativamente do grupo Ctl. Ao final do protocolo experimental os grupos Pred e FruPred apresentaram redução de 15% e 20% no peso corpóreo em relação ao grupo Ctl, respectivamente. Redução significativa na ingestão alimentar e paralelo aumento na ingestão hídrica foi observado nos grupos tratados com frutose (Fru e FruPred) em relação aos grupos Ctl e Pred após a primeira semana de tratamento, que se mantiveram até o final do protocolo experimental ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 6. B e C). A ingestão alimentar ao final do tratamento para os grupos Ctl, Fru, Pred e FruPred foi de $6,3 \pm 0,2$, $3,2 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,2$ e $3,2 \pm 0,1$ g/100 g p.c., respectivamente. A ingestão hídrica, no mesmo período, foi de $9,2 \pm 0,1$, $11,1 \pm 0,1$, $9,5 \pm 0,2$ e $13,1 \pm 0,1$ ml/100 g p.c. para os animais Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente. A ingestão calórica total de ambos os grupos experimentais se manteve semelhante (Figura 6. D). Nas primeiras semanas os grupos Fru e FruPred apresentaram aumento de 24% e 21% em relação aos grupos Ctl e Pred. Após a terceira semana, os quatro grupos experimentais apresentaram a mesma ingestão calórica, que reduziu ao longo do tratamento. A ingestão calórica inicial foi de 47 ± 1 , 45 ± 1 , 46 ± 1 e 46 ± 1 Kcal/100 g p.c., enquanto que a ingestão calórica final foi de $24 \pm 0,8$, $21 \pm 0,8$, 24 ± 1 e $23 \pm 0,6$ Kcal/100 g p.c para os grupos Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente. Esses dados demonstram que a prednisolona induz redução do ganho de peso corpóreo independente do balanço isocalórico entre os grupos experimentais.

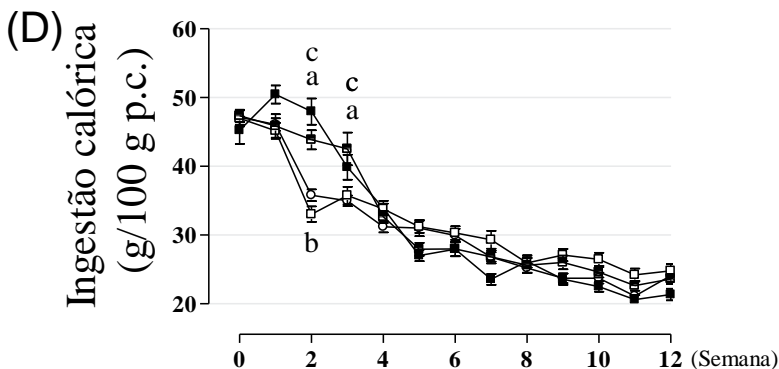


Figura 6. Peso corpóreo (A), ingestão alimentar (B), ingestão hídrica (C) e ingestão calórica total (D) ao longo de 12 semanas de tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. “c” indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

5.1.2 Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático ao longo do tratamento

Para verificar se a combinação de frutose e prednisolona foi capaz de promover alterações na homeostase glicêmica e lipídica durante o protocolo experimental, os valores de glicemia e triacilgliceridemia em jejum foram monitorados. Os ratos FruPred não apresentaram alterações na glicemia em jejum ao longo do tratamento em relação aos grupos Ctl e Pred (NS, $n = 9-13$; Figura. 7. A, B). Os animais Fru apresentaram um modesto, porém significativo, aumento na área sob a curva comparados com o grupo controle, no entanto não foi detectado hiperglicemia nesses animais ao longo do período de tratamento. Em relação aos valores de triacilglicerol, os grupos Fru e FruPred apresentaram aumento expressivo a partir da terceira semana de tratamento. Ao término do protocolo experimental (90º dia), esses animais apresentaram concentrações significativamente elevadas em relação ao grupo controle, 92 ± 6 , 156 ± 15 , 100 ± 7 e 133 ± 10 mg/dL para Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 7. C, D).

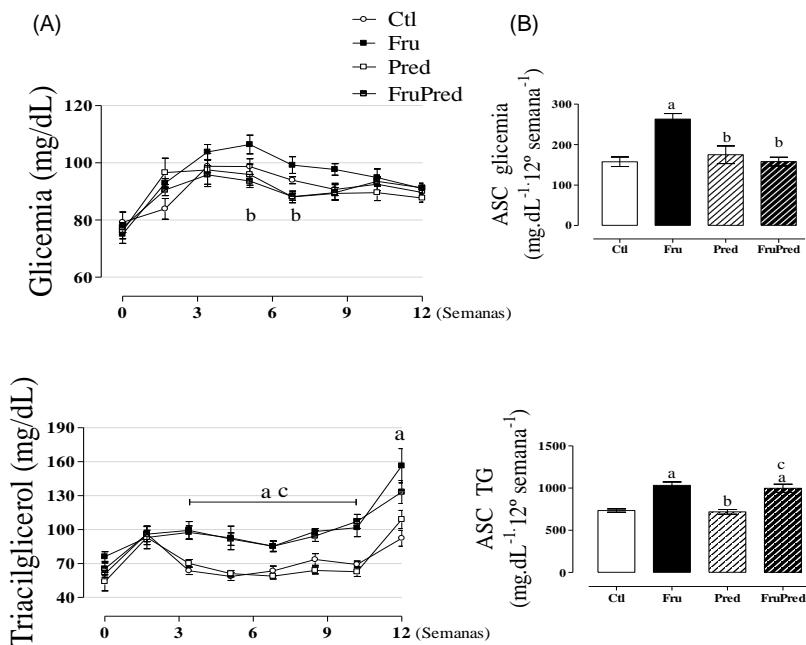


Figura 7. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea em jejum (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B), triacilglicerol plasmático em jejum (C) e a respectiva área-sob-a-curva (D). Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. “c” indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

5.1.3 Tolerância ao piruvato

Com a finalidade de estimar a taxa de gliconeogênese em cada animal, os ratos foram submetidos ao desafio intraperitoneal com piruvato após 10 semanas de tratamento. O grupo Fru apresentou incremento na glicemia, de origem predominantemente hepática em relação ao grupo Ctl, que pode ser observado após 30 minutos da administração de piruvato (250 ± 10 e 178 ± 12 mg/dL para Fru e Ctl, respectivamente) ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 8. A). Os valores da área-sob-a-curva durante o ipPTT apontam redução da tolerância ao piruvato do

grupo FruPred em relação ao grupo Fru ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 8. B). No entanto, não houve alterações na produção de glicose hepática nos grupos Pred e FruPred em relação ao grupo Ctl (NS, $n = 9-13$).

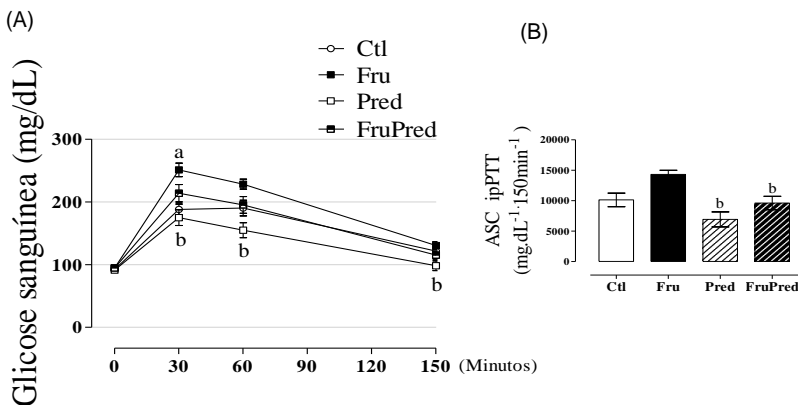


Figura 8. Valores de glicemia durante o teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) após 10 semanas de tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

5.1.4 Tolerância à glicose

A fim de investigar a tolerância à glicose, uma semana antes da eutanásia os animais foram desafiados com um *bolus* de glicose por via oral. O grupo FruPred apresentou melhor capacidade em lidar com a sobrecarga de glicose quando comparado ao grupo Ctl, como pode ser observado nos minutos 30 (145 ± 5 e 170 ± 5 mg/dL para FruPred e Ctl, respectivamente) e 120 (92 ± 1 e 108 ± 6 mg/dL para FruPred e Ctl, respectivamente) ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 9. A). De acordo com os valores de área-sob-a-curva (ASC) da glicose durante o GTT, o grupo FruPred apresentou aumento da tolerância à glicose em relação ao grupo Ctl ($p < 0,05$, $n = 9-13$), não havendo alterações significativas na tolerância à glicose nos demais grupos (NS, $n = 9-13$; Figura 9. A, B).

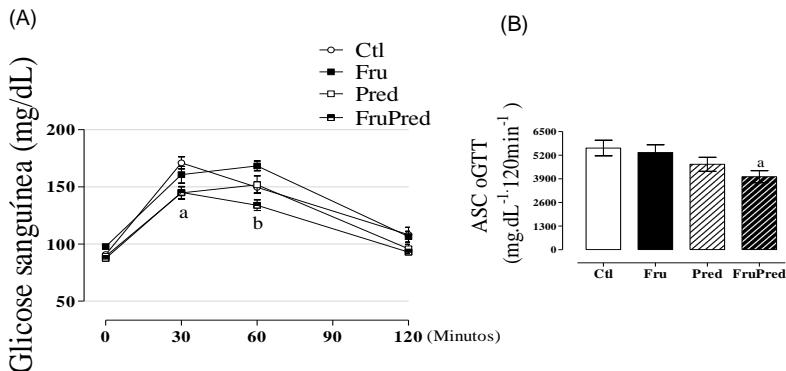


Figura 9. Valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose oral (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) após 11 semanas de tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-14$.

5.1.5 Sensibilidade à insulina

Na 12^a semana de tratamento os animais foram submetidos ao ipITT, para avaliação da sensibilidade à insulina. Ambos os grupos tratados com prednisona (Pred e FruPred) apresentaram redução na sensibilidade à insulina, dada pelos valores de glicose nos minutos 20, 30 e 40 após a administração de insulina e pela constante de decaimento da glicose obtida durante o ipITT ($p < 0,05$, $n = 8-13$; Figura 10. A, B). Os valores do K_{ITT} foram $1,3 \pm 0,1$, $1,3 \pm 0,1$, $0,9 \pm 0,1$ e $0,8 \pm 0,09\% \cdot \text{min}^{-1}$ para os grupos Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente.

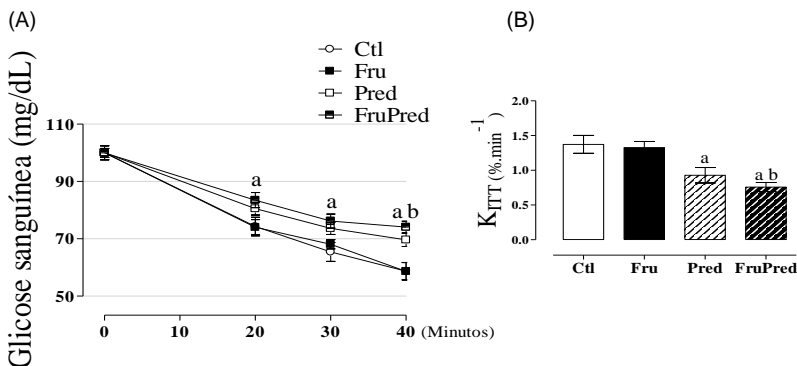


Figura 10. Valores de glicemia durante o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (A) e a respectiva constante de decaimento (KITT). Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-13$.

5.1.6 Parâmetros sanguíneos após o tratamento

Após as dose semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e as concentrações plasmáticas de insulina, colesterol, proteínas e ácido úrico do soro foram mensurados. Além disso, os cálculos HOMA-IR e TyG foram realizados. As concentrações de insulina e albumina foram substancialmente aumentadas nos grupos Pred e FruPred. Os níveis de insulina nesses animais foram 3 e 4.4 vezes maiores do que o grupo Ctl ($p < 0,05$, $n = 8-13$; Tabela. 7). Apenas a combinação dos insultos promoveu significativo aumento nos níveis de ácido úrico ($p < 0,05$, $n = 9-13$). Os valores de colesterol total não foram alterados com os tratamentos (NS, $n = 9-13$). O HOMA-IR, calculado a partir da glicemia e insulinemia em jejum foi significativamente maior nos grupos Pred e FruPred em relação aos grupos Ctl e Fru, corroborando com a redução na sensibilidade à insulina nesses animais ($p < 0,05$, $n = 8-13$; Figura 11. A). O índice TyG, formulado a partir da glicemia e triacilgliceridemia em jejum, aponta para redução da sensibilidade à insulina nos grupos Fru e FruPred, demonstrando o potencial efeito dislipidêmico da frutose sobre esse parâmetro ($p < 0,05$, $n = 8-13$; Figura 11. B).

Tabela 7. Parâmetros sanguíneos dos animais jejuados após 12 semanas de tratamento

	Ctl	Fru	Pred	FruPred
Insulina (pg/mL)	78 \pm 15	131 \pm 17	237 \pm 38 ^a	341 \pm 40 ^{ab}
Albumina (g/dL)	2,1 \pm 0,07	2,5 \pm 0,07	3,1 \pm 0,1 ^a	3,6 \pm 0,1 ^{abc}
Ácido úrico (mg/dL)	0,5 \pm 0,07	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,09	1,2 \pm 0,07 ^{abc}

Coolesterol	121±0	127±16	113±10	117±8
total (mg/dL)				

Dados são média ± EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. “c” indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-13$.

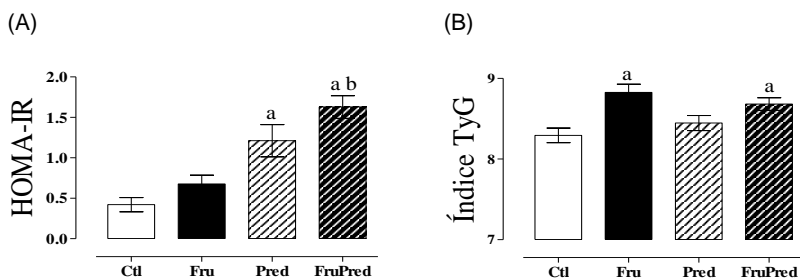


Figura 11. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) após 12 semanas de tratamento. Dados são média ± EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-13$.

5.1.7 Massa relativa dos órgãos

A determinação da massa relativa dos órgãos foi realizada imediatamente após a eutanásia (Tabela 8). O tratamento com frutose promoveu aumento significativo na massa relativa de gordura abdominal total nos grupos Fru e FruPred em relação aos grupos Ctl e Pred ($p < 0,05$, $n = 9-13$). Houve aumento de 63% (Fru) e de 81% (FruPred) na massa de TA epididimal e de 75% (Fru) no TA retroperitoneal. A combinação de frutose e prednisolona revelou acentuado aumento na massa relativa das gorduras omental (94% em relação ao Ctl) e marrom (49% em relação ao Ctl), enquanto que os grupos Fru e Pred não apresentaram alterações significativas (NS, $n = 9-13$). Em relação à massa relativa do fígado, a administração combinada de frutose e prednisolona resultaram em aumento significativo em relação ao grupo Ctl, não havendo alterações nos grupos Fru e Pred. Não houve alterações significativas na massa relativa do baço e adrenais entre os quatro grupos experimentais (NS, $n = 9-13$). Esses dados demonstram que o grupo FruPred apresenta aumento de TA abdominal por efeito

majoritário da frutose, no entanto apenas a combinação dos insultos leva aumento nas gorduras omental e marrom.

Tabela 8. Massa relativa dos órgãos após 12 semanas de tratamento

	Ctl	Fru	Pred	FruPred
Pâncreas (mg/100 g p.c)	282±10	267±10	295±10	317±10
Fígado (g/100 g p.c)	3,1±0,1	3,2±0,1	3,2±0,1	3,6±0,1 ^a
Baço (mg/100 g p.c)	208±7	192±8	189±4	191±3
Adrenais (mg/100 g p.c)	16±0,6	15±1,1	16±0,5	16±0,6
Gordura epididimal (g/100 g p.c)	1,1±0,07	1,8±0,1 ^a	1,5±0,07	2,0±0,1 ^{ac}
Gordura retroperitoneal (g/100 g p.c)	1,6±0,1	2,8±0,1 ^a	1,5±0,1 ^b	1,6±0,1 ^b
Gordura omental (mg/100 g p.c)	136±10	213±10	120±10 ^b	265±30 ^{ac}
Gordura marrom (mg/100 g p.c)	95±8	100±4	110±7	143±12 ^{ab}
Gordura abdominal total (g/100 g p.c)	2,9±0,2	4,8±0,2 ^a	3,1±0,2 ^b	3,9±0,2 ^a

Dados são média ± EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru. “c” indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

5.1.8 Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos

O conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos foram analisados após a eutanásia dos animais. Ambos os grupos tratados com frutose (Fru e FruPred) apresentaram incremento no conteúdo de glicogênio hepático em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 12. A). Os valores do conteúdo de glicogênio foram $3,6 \pm 0,4$, $7,4 \pm 1,2$, $4,6 \pm 0,5$, $9,9 \pm 0,6$ mg/g de tecido para os grupos Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente. Em relação ao conteúdo de triacilglicerol hepático, a combinação de frutose e prednisolona foi responsável pelo aumento de 3.2 e 3.4 vezes em relação aos grupos Pred e Fru. A administração isolada desses insultos não alterou significativamente este parâmetro (NS, $n = 9-13$; Figura 12. B).

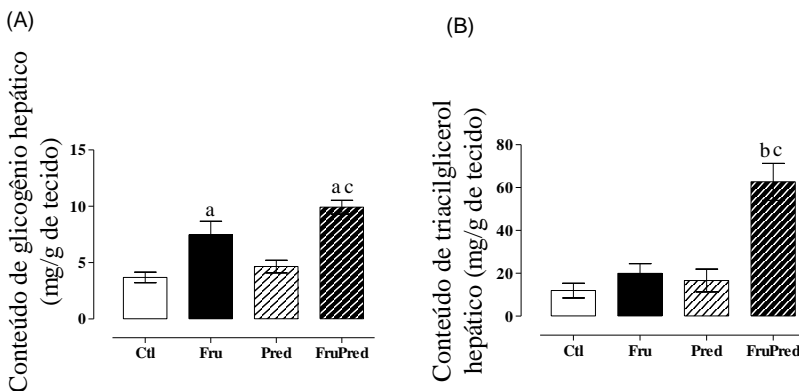


Figura 12. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) após 12 semanas de tratamento. Dados são média ± EPM. Letra "a" indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; "b" indica diferença significativa em relação ao Fru. "c" indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

5.1.9 Secreção de glicerol estimulado por isoproterenol

A lipólise do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foi determinada na presença ou ausência do agonista adrenérgico isoproterenol em experimento *ex vivo*. A taxa de lipólise basal tanto em tecido epididimal quanto em retroperitoneal foi similar entre os quatro grupos experimentais (NS, $n = 9-13$; Figura 13. A, C). Quando

estimulada por isoproterenol a liberação de glicerol foi aumentada em ambos os grupos em relação ao seu estado basal, apresentando a mesma responsividade entre eles ($p < 0,05$, $n = 9-13$). Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado dos quatro grupos não foram estatisticamente diferentes (NS, $n = 9-13$; Figura 13, B, D).

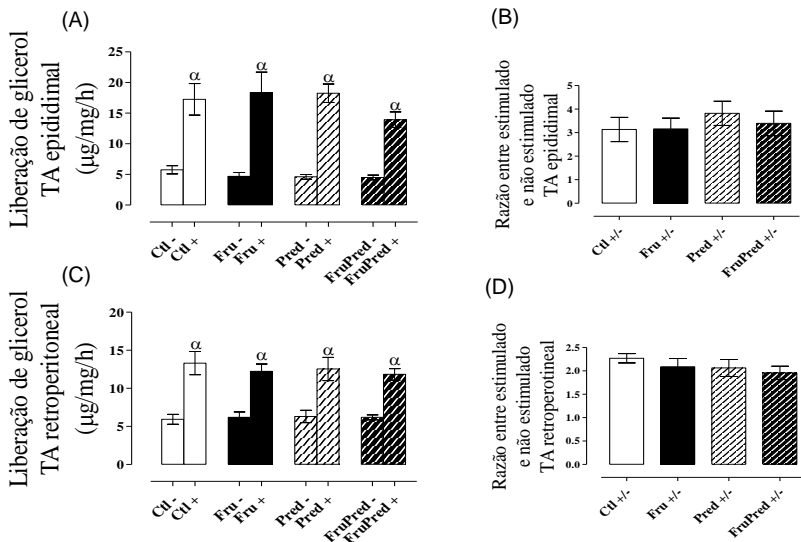


Figura 13. Liberação de glicerol em TA epididimal (A) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (B), liberação de glicerol em TA retroperitoneal (C) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (D) após 12 semanas de tratamento. Dados são média \pm EPM. Alfa (α) indica diferença significativa em relação à condição basal. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$. TA: tecido adiposo.

5.1.10 Determinação do estado REDOX em fígado

A determinação do estado REDOX em fragmentos de fígado foi realizada após o término do protocolo experimental, a partir da análise do estresse oxidativo por hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas, e da atividade antioxidante das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD). A combinação dos tratamentos promoveu

aumento significativo no conteúdo de hidroperóxidos lipídicos em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$, $n = 8-13$; Figura 14. A). A média dos valores foi de $3,5 \pm 0,2$, $4,2 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,1$ e $13,2 \pm 1,5$ $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ para Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente. O conteúdo de proteínas carboniladas não foi alterado em nenhum grupo experimental (NS, $n = 7-8$; Figura 14. B). Em relação a atividade da catalase, apenas a combinação dos tratamentos promoveu redução nesse parâmetro, com valores médios de 242 ± 9 , 271 ± 16 , 232 ± 15 e 166 ± 6 para Ctl, Fru, Pred e FruPred, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 14. C). Em contra partida, a atividade da SOD foi expressivamente aumentada nos grupos Fru (148%), Pred (58%) e FruPred (51%) em relação ao grupo Ctl ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 14. D).

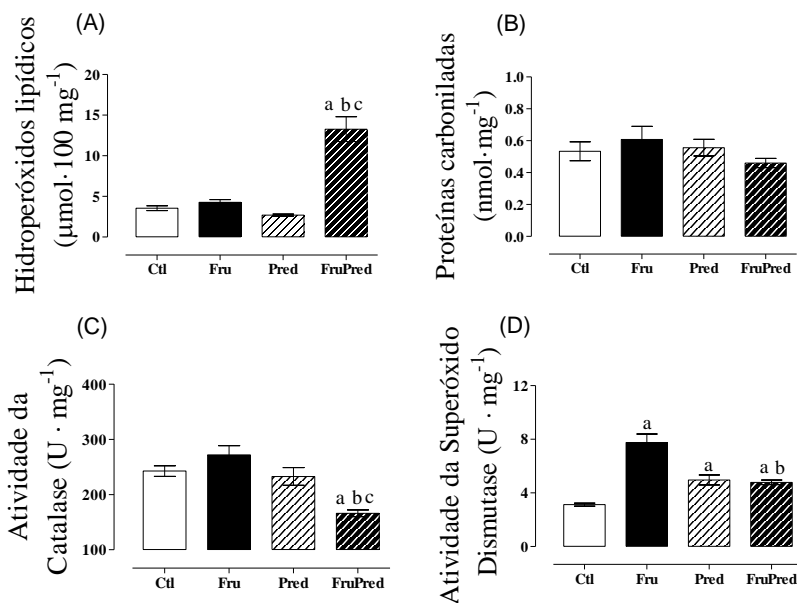
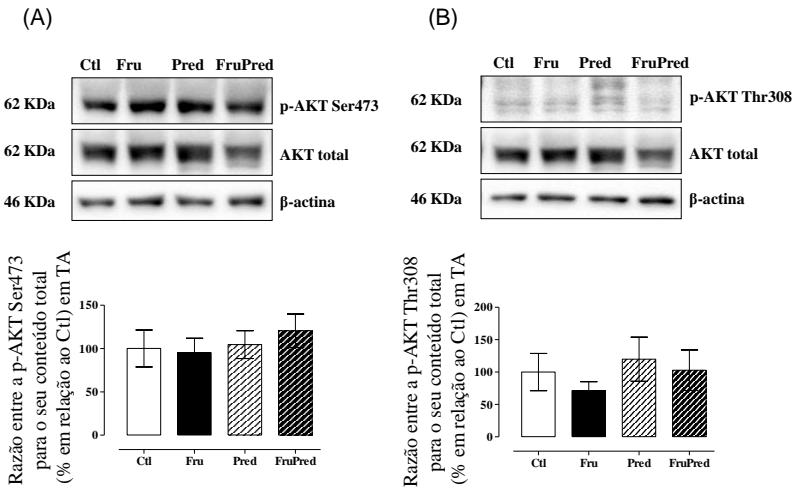


Figura 14. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado de rato após 12 semanas de tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl; “b” indica diferença significativa em relação ao Fru; “c” indica diferença significativa em relação ao grupo Pred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 7-13$.

5.1.11 Conteúdo da proteína cinase B (PKB/AKT) em tecido adiposo e fígado

Após constatada as alterações metabólicas, investigamos o conteúdo proteico da AKT, uma importante cinase da via de sinalização da insulina. O conteúdo dessa proteína foi quantificado em tecido adiposo epididimal (TA) e fígado de ratos jejuados após 12 semanas de tratamento. Em TA, o conteúdo de AKT total e fosforilado em ambos os resíduos de serina 473 e treonina 308 não foram alterados significativamente pelos tratamentos nos três grupos experimentais, nem a razão entre eles (NS, $n=6$; Figura 15. A, B). O conteúdo de AKT total em fígado foi reduzido nos grupos tratados com GC, sendo 51% e 71% menor nos grupos Fru e FruPred em relação ao grupo Ctl ($p<0,05$, $n=6$; Figura 15. C).



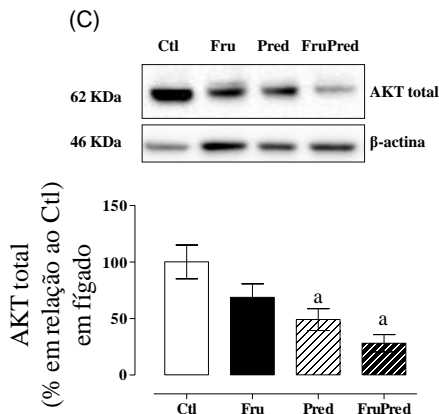


Figura 15. Valores da razão entre o conteúdo proteico da AKT fosforilada em serina 473 pelo seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (B). Conteúdo proteico da AKT total em fígado (C) após 12 semanas de tratamento. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$.

5.1.12 Conteúdo da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) em tecido adiposo e fígado

Após constatada as alterações no metabolismo lipídico, a julgar pela dislipidemia e aumento de triacilglicerol hepático, analisamos o conteúdo fosforilado e total da AMPK. Em TA, apenas o grupo tratado com a combinação FruPred apresentou redução na razão entre o conteúdo fosforilado e total dessa cinase ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 16. A). Ambos os grupos tratados com GC apresentaram redução significativa na razão entre o conteúdo fosforilado e total da AMPK em fígado, os grupos Pred e FruPred apresentaram redução de 40% e 50% na razão dessa cinase ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 16. B).

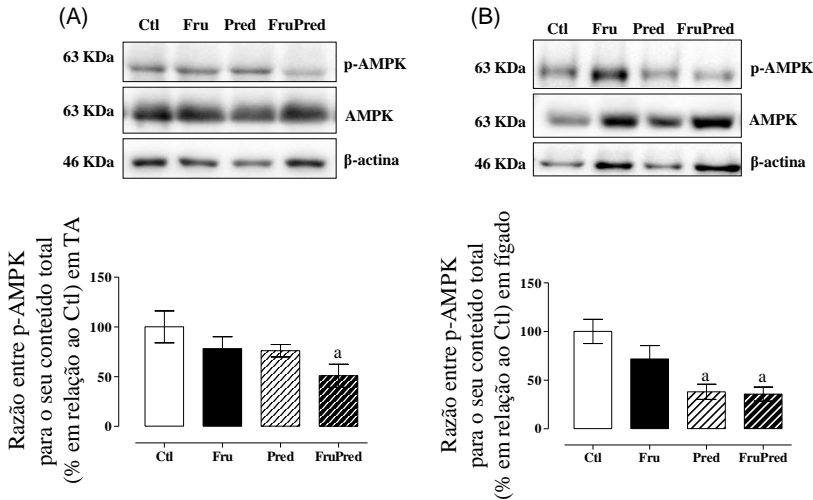


Figura 16. Valores da razão entre o conteúdo de AMPK fosforilada pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (A) e fígado (B) de após 12 semanas de tratamento. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$.

5.2. SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA

5.2.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, I κ B, NF κ B e GR em tecido adiposo

Para analisar o possível envolvimento da via pró-inflamatória com as disfunções metabólicas encontradas, o conteúdo proteico das cinases JNK, c-JUN, I κ B e NF κ B e do receptor de glicocorticoide (GR) foram quantificados. Não houve diferenças significativas no conteúdo das proteínas analisadas em tecido adiposo, bem como na razão entre o conteúdo fosforilado e total da JNK, I κ B e NF κ Bp50, no conteúdo total do NF κ Bp50 e GR ou do conteúdo fosforilado da c-JUN (NS, $n = 6$; Figura 17. A-F).

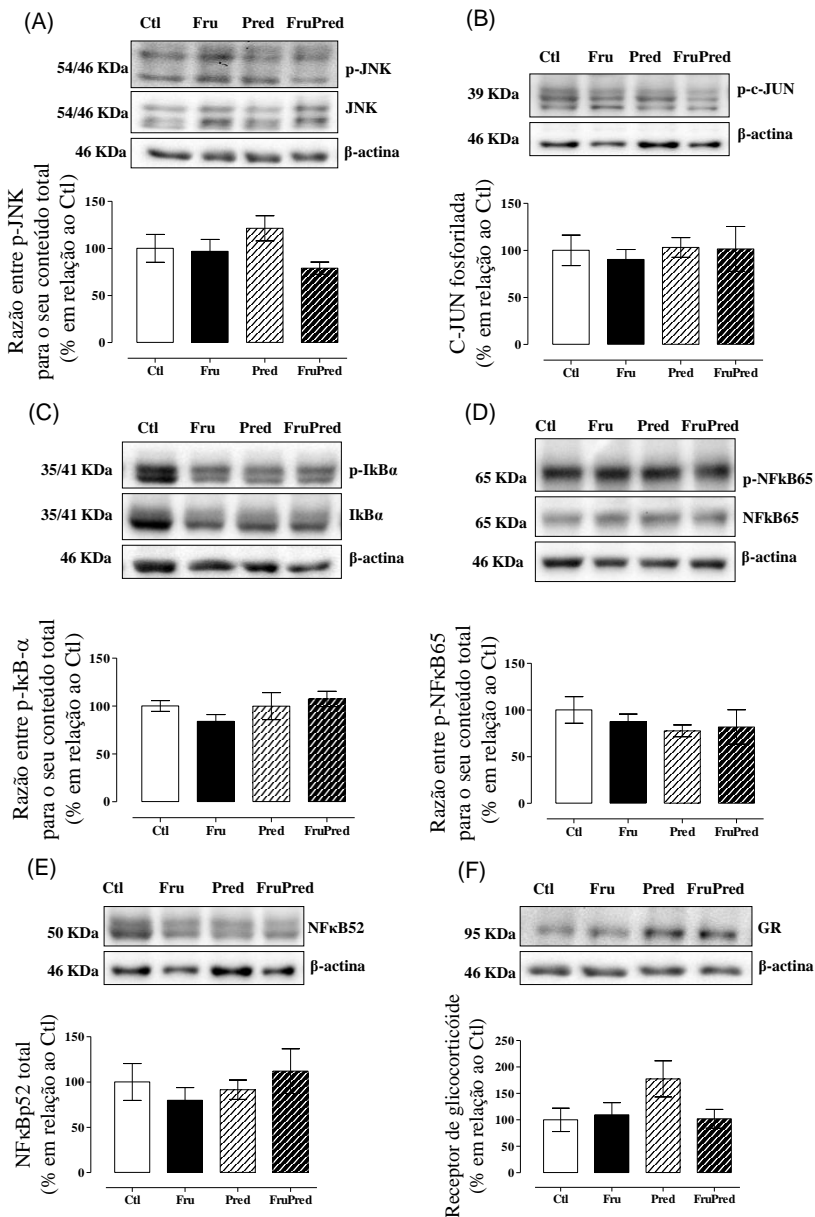
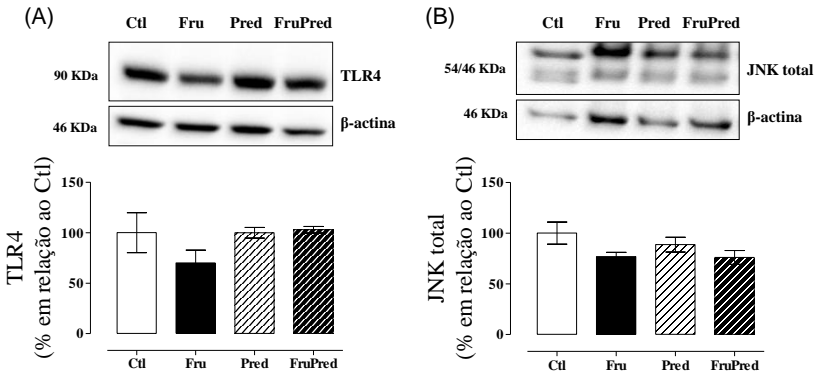


Figura 17. Valores da razão entre o conteúdo de JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo de C-JUN fosforilada (B), razão entre IkB fosforilada e seu conteúdo total (C) e entre NFκBp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo

total de NFkBp52 (E) e GR (F) em tecido adiposo epididimal após 12 semanas de tratamento. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$.

5.2.2 Conteúdo proteico do TLR4, da JNK e da 11 β -HSD1 em fígado

Em fígado, o conteúdo do receptor TLR4, da JNK e da 11 β -HSD1 foram quantificados. O conteúdo total do receptor TLR4 e da JNK não foram alterados pelo tratamento crônico com frutose e GC no fígado (NS, $n = 6$; Figura 18. A, B). O conteúdo da enzima 11 β -HSD1 também não foi alterado em relação aos grupos controles (NS, $n = 6$; Figura 18. C). Com base nas proteínas avaliadas neste trabalho, a redução na sensibilidade à insulina parece não estar envolvida com vias inflamatórias em órgãos periféricos como fígado e tecido adiposo.



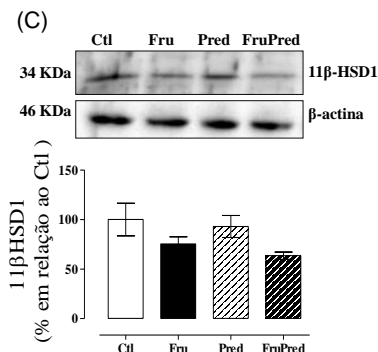


Figura 18. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11βHSD1 (C) em fígado após 12 semanas de tratamento. Imagens são blots representativos. Dados são média ± EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$.

5.2.3 Conteúdo proteico do NFκB e TLR4 em hipotálamo

A fim de avaliar o papel de mediadores inflamatórios centrais sobre a sensibilidade à insulina, o conteúdo proteico do NFκBp65 e TLR4 foram mensurados no hipotálamo. A razão entre o conteúdo fosforilado e total do NFκBp65 não foi alterada entre ambos os grupos experimentais, assim como o conteúdo do receptor TLR4 hipotalâmico (NS, $n = 5-6$; Figura 19. A, B).

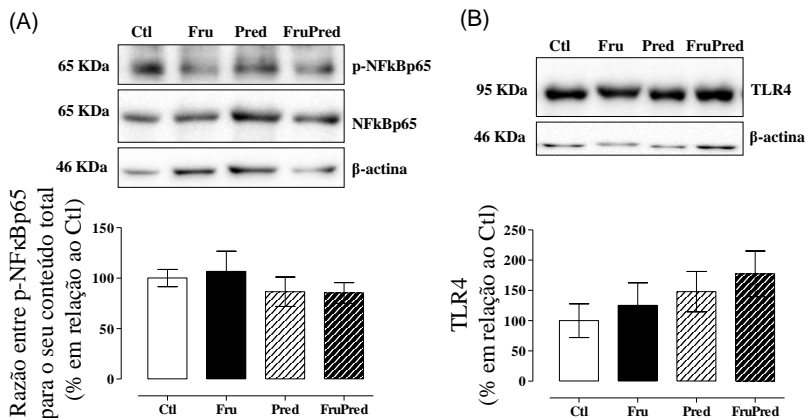


Figura 19. Valores da razão entre a fosforilação do NFκBp65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo após 12 semanas de tratamento.

Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 5-6$.

O tratamento combinado de frutose e GC não resultou num modelo experimental de diabetes (hiperglicemia), mas promoveu um fenótipo com características de SM no grupo FruPred. Esses animais apresentaram hipertriacilgliceridemia, redução na sensibilidade à insulina, com aumento compensatório nas concentrações plasmáticas de insulina, hiperurecemia, aumento da adiposidade abdominal e presença gordura hepática, aumento no estresse oxidativo em fígado e redução na razão do conteúdo proteico da AMPK em fígado e tecido adiposo. Essas características não foram relacionadas com alterações na via pró-inflamatória investigada.

6. RESULTADOS DO MÓDULO II: *Intervenção mediante suplementação com óleo de peixe rico em n-3*

6.1. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM HEMÁCIAS

Para verificar se houve mudança no perfil de ácidos graxos dos animais suplementados com óleo de peixe, foi analisada a incorporação de EPA e DHA em hemácias, um marcador de longo prazo. Ambos os grupos suplementados com óleo de peixe apresentaram: *i*) aumento na incorporação de EPA, DHA e ácido palmitoleico e *ii*) subsequente redução no AA ($p < 0,05$, $n = 10-14$; Tabela 9).

Tabela 9. Percentual (%) de ácidos graxos em hemácias de animais suplementados com óleo de peixe

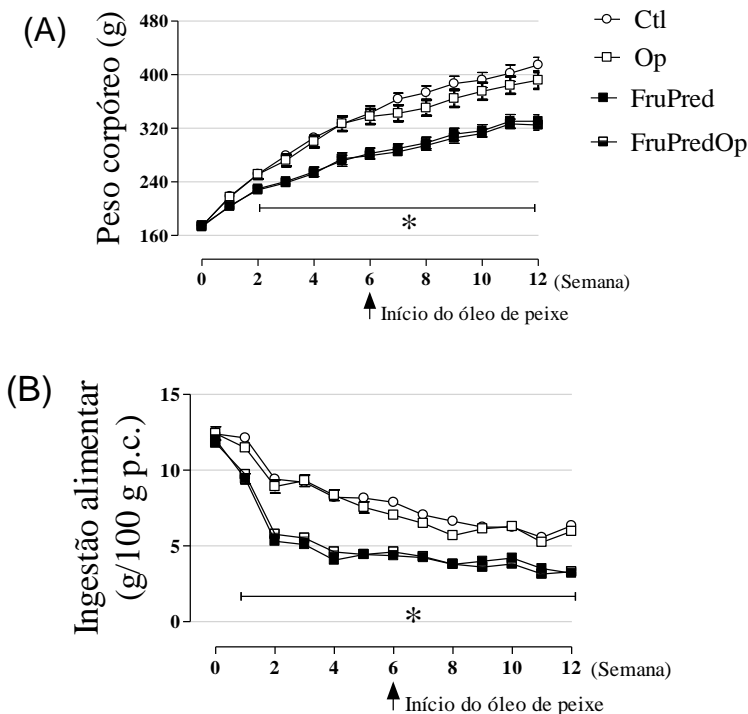
Ácido graxo	Ctl	Op	FruPred	FruPredOp
EPA (ômega 3)	0,2±0,0	2,2±0,2 #	0,5±0,0	5,5±0,2 *#
DHA (ômega 3)	3,4±0,1	6,0±0,3 #	3,5±0,0	7,1±0,1 #
Mirístico (AGS)	0,03±0,0	0,04±0,0	0,04±0,0	0,05±0,0
AA (ômega 6)	34±0,9	28±0,9 #	35±0,3	24±0,6 #
Palmitoleico (ômega 7)	1,2±0,0	2,5±0,0 #	0,8±0,0	2,8±0,0 #
Linoleico (ômega 6)	13±0,2	13±0,4	11±0,3	12±0,3
Palmítico (AGS)	27±0,9	27±1,1	26±0,5	27±1,0
Oleico (ômega 6)	6,3±0,2	6,2±0,3	8,0±0,3	7±0,2
Esteárico (AGS)	13±0,3	13±0,6	13±0,3	13±0,5

Dados são média ± EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 10-14$. EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexanoico; AA: ácido araquidônico; AGS: ácido graxo saturado.

6.2. EFEITOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MOLECULARES

6.2.1 Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica

A partir de 6 semanas do início do tratamento com frutose e GC, um grupo paralelo de animais FruPred foi suplementado com óleo de peixe por mais 6 semanas, até o final do período experimental. A suplementação com óleo de peixe, nas condições aqui definidas, não promoveu nenhum efeito sobre a redução no ganho de peso corpóreo induzida pela combinação FruPred (NS, $n= 9-15$; Figura 20. A). Ao final do tratamento, a média de peso corpóreo foi de 402 ± 12 , 385 ± 12 , 330 ± 10 e 326 ± 7 g para os grupos Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente. Em relação a ingestão alimentar e hídrica, a suplementação com óleo de peixe não teve influências sobre esses parâmetros, de modo que ambos os grupos experimentais permaneceram com o mesmo balanço calórico (NS, $n= 9-15$; Figura 20. B-D).



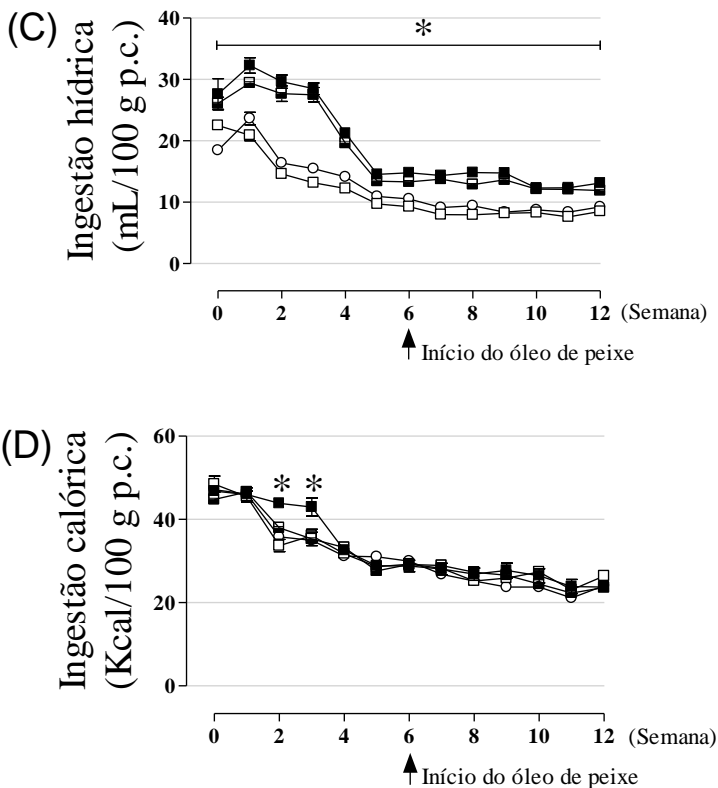


Figura 20. Peso corpóreo (A), ingestão alimentar (B), ingestão hídrica (C) e ingestão calórica total (D) ao longo de 12 semanas em animais suplementados ou não com óleo de peixe. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmo utilizados no módulo 1.

6.2.2 Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático ao longo do tratamento e suplementação

Os valores de glicose sanguínea, mensurados semanalmente, não foram alterados pela suplementação com óleo de peixe (NS, $n = 9-15$; Figura 21. A, B). A dislipidemia, observada no grupo FruPred foi normalizada após 6 semanas consecutivas de suplementação, apresentando valores médios de 92 ± 7 , 73 ± 7 , 133 ± 10 e 99 ± 5 mg/dL para

os grupos Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente, na 12ª semana do protocolo experimental (Figura 21. C, D).

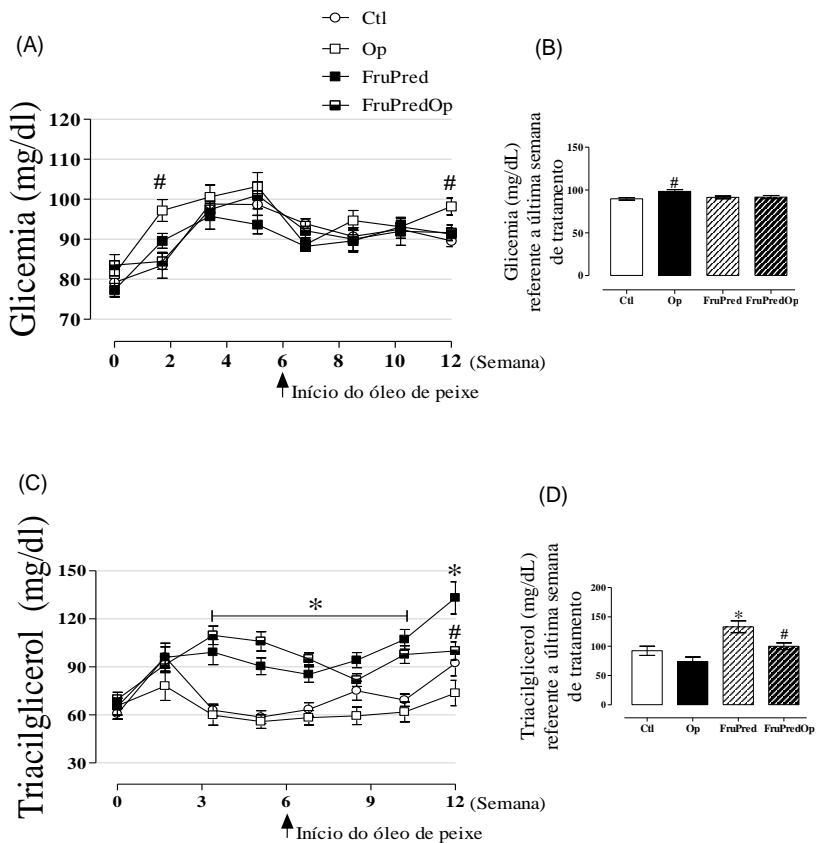


Figura 21. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea (A) e o último ponto mensurado após 12 semanas de tratamento (B). Triacilglicerol plasmático temporal (C) e o último ponto mensurado após 12 semanas de tratamento (D). Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1

6.2.3 Tolerância ao piruvato

A suplementação do modelo experimental FruPred com óleo de peixe não teve efeitos sobre a produção de glicose hepática (NS, $n= 8-13$; Figura 22. A, B). No entanto, o grupo Op apresentou redução na ASC do teste de tolerância ao piruvato, sendo estatisticamente significativo quando aplicado o teste “*t*” de Student ($p<0,05$). Os valores médios da ASC para os grupos Ctl e Op foram 10.135 ± 1.120 e 6.637 ± 1.110 , respectivamente.

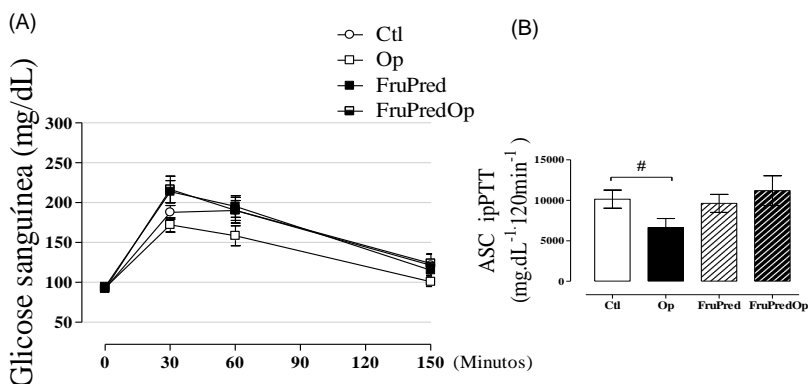


Figura 22. Valores de glicemia durante o teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) em ratos suplementados com óleo de peixe. Dados são média \pm EPM. (#) indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl, utilizando teste “*t*” de Student para Ctl *vs* Op. Foi utilizado ANOVA de uma via, para comparação múltipla das amostras $p<0,05$, $n= 8-13$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.4 Tolerância à glicose

A capacidade em lidar com a sobrecarga de glicose foi semelhante entre ambos os grupos tratados com a combinação FruPred, não havendo efeitos da suplementação nesses animais. Após 2 horas do *bolus* de glicose os valores médios de glicose sanguínea foram 108 ± 6 , 120 ± 8 , 93 ± 1 e 101 ± 4 mg/dL para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente (Figura 23. A, B).

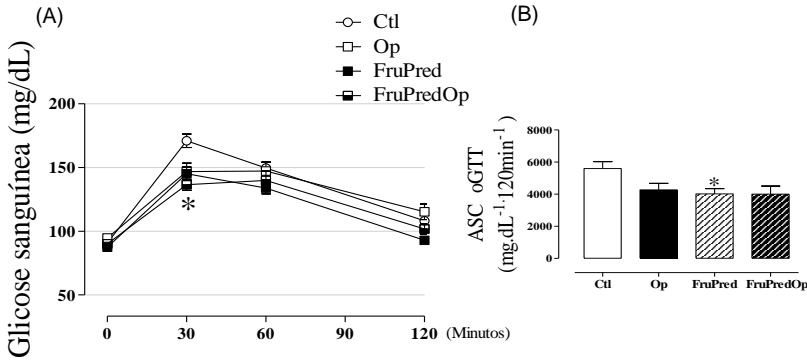


Figura 23. Valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose oral (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B) em ratos suplementados com óleo de peixe. Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-14$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.5 Sensibilidade à insulina

A redução na sensibilidade à insulina foi uma das características do modelo experimental FruPred. A partir da análise da sensibilidade determinado pelo ipITT a suplementação com óleo de peixe não apresentou qualquer efeito sobre esse parâmetro (NS, $n = 8-15$; Figura 24. A, B).

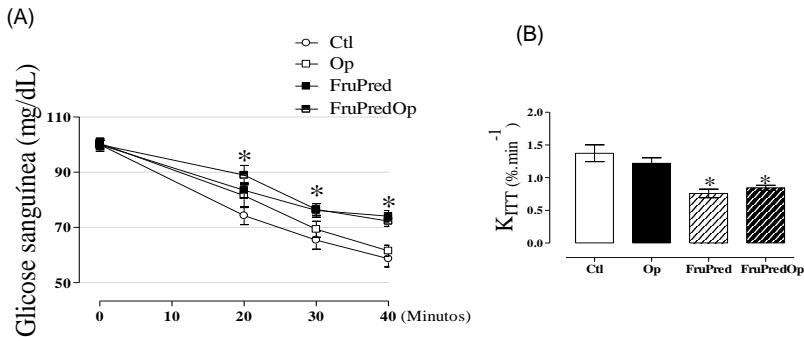


Figura 24. Valores de glicemia durante o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (A) e a respectiva constante de decaimento (KITT) em ratos suplementados com óleo de peixe. Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica

diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.6 Parâmetros sanguíneos após o tratamento e suplementação

Após as 12 semanas de tratamento, sendo 6 de suplementação, os animais foram eutanasiados e os parâmetros sanguíneos propostos foram avaliados. A suplementação com óleo de peixe preveniu o aumento dos níveis de ácido úrico aumentados pelo tratamento conjunto de frutose e GC ($p < 0,05$, $n = 9-15$; Tabela 10). O óleo de peixe *per si* foi responsável por incrementar as concentrações circulantes de albumina, levando ao acréscimo de 47% para o grupo Op vs Ctl e de 16% para o grupo FruPredOp vs FruPred, promovendo um efeito aditivo sobre as concentrações já aumentadas no grupo FruPred. Em relação aos níveis plasmáticos de insulina e colesterol a suplementação não teve efeitos significativos (NS, $n = 9-15$). Em relação ao HOMA-IR, a suplementação não teve efeitos sobre esse dado, corroborando com o ipITT (NS, $n = 8-14$; Figura 25. A). O impacto positivo da suplementação sobre o perfil de triacilglicerol plasmático foi responsável pela atenuação do índice TyG ($8,2 \pm 0,09$, $8,2 \pm 0,09$, $8,7 \pm 0,07$ e $8,4 \pm 0,05$ para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente) ($p < 0,05$, $n = 9-14$; Figura 25. B). Esses últimos dados demonstram que a redução na sensibilidade à insulina observada no modelo experimental é resultante dos efeitos adversos dos GCs sobre a homeostase glicêmica e a suplementação com óleo de peixe não exerce influência significativa sobre esses parâmetros.

Tabela 10. Parâmetros sanguíneos dos animais jejuados suplementados com óleo de peixe

	Ctl	Op	FruPred	FruPredOp
Insulina (pg/mL)	78±15	111±16	341±40 *	370±91 *
Albumina (g/dL)	2,1±0,07	3,1±0,1 #	3,6±0,1 *	4,2±0,02 * #
Ácido úrico (mg/dL)	0,5±0,07	0,5±0,07	1,2±0,07 *	0,8±0,06 #

Colesterol total (mg/dL)	121±10	86±13	117±8	114±8
-------------------------------------	--------	-------	-------	-------

Dados são média ± EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

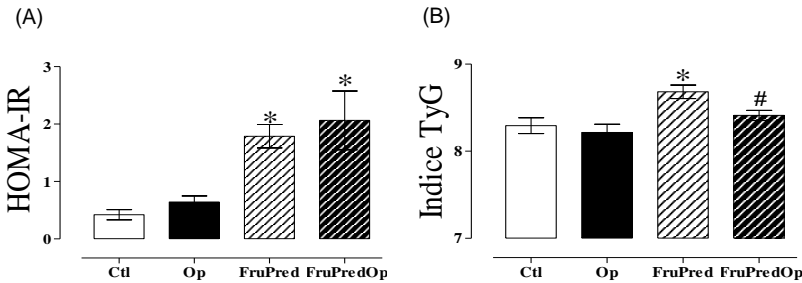


Figura 25. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média ± EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 8-14$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo

6.2.7 Massa relativa dos órgãos

Após a eutanásia, a massa dos órgãos foi quantificada. As alterações na massa relativa dos órgãos encontradas no grupo FruPred não foram alteradas pela suplementação com óleo de peixe (NS, $n = 9-15$; Tabela 11). Esses resultados demonstram que o óleo de peixe não apresenta efeitos sobre estes parâmetros analisados na dose/tempo administrada.

Tabela 11. Massa relativa dos órgãos dos animais suplementados com óleo de peixe

	Ctl	Op	FruPred	FruPredOp
Pâncreas (mg/100 g p.c)	282±10	288±9	317±10	314±7
Fígado (g/100 g p.c)	3,1±0,1	3,1±0,1	3,6±0,1 *	3,3±0,1
Baço (mg/100 g p.c)	208±7	209±6	191±3	183±3
Adrenais (mg/100 g p.c)	16±0,6	17±0,6	16±0,6	16±0,1
Gordura epididimal (g/100 g p.c)	1,1±0,07	1,3±0,1	2,0±0,1 *	1,7±0,08
Gordura retroperitoneal (g/100 g p.c)	1,6±0,1	1,8±0,1	1,6±0,1	1,7±0,09
Gordura omental (mg/100 g p.c)	136±10	130±10	265±30 *	205±10
Gordura marrom (mg/100 g p.c)	95±8	110±8	143±12 *	139±8
Gordura abdominal total (g/100 g p.c)	2,9±0,2	3,3±0,3	3,9±0,2 *	3,6±0,1

Dados são média ± EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p<0,05$, $n=9-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.8 Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos

O conteúdo de glicogênio hepático, aumentado no modelo experimental FruPred, foi prevenido pela suplementação com óleo de peixe, a julgar pelos valores médios apresentados sendo 3,6±0,4, 5,8±0,7, 9,9±0,6 e 5,5±0,5 mg/g para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente (Figura 26. A). Em relação ao conteúdo de triacilglicerol hepático a suplementação não teve efeito atenuador sobre esse parâmetro. Os valores médios foram 11±3, 10±2, 67±10 e 45±7

mg/g de tecido para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente (Figura 26. B).

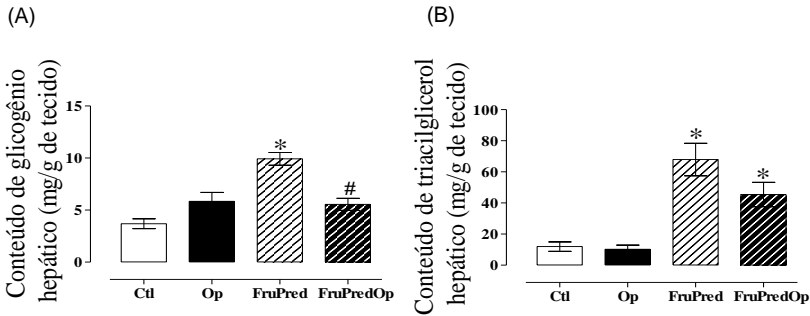
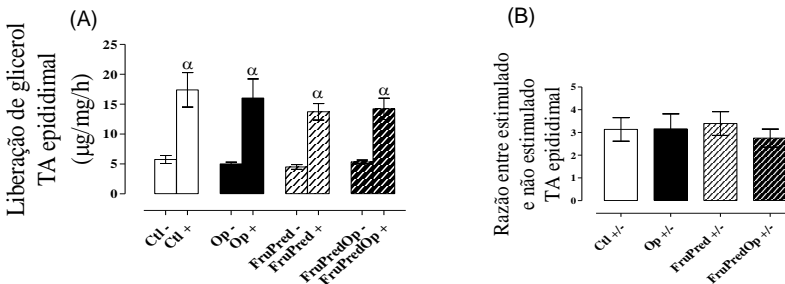


Figura 26. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.9 Secreção de glicerol estimulada por isoproterenol

O perfil lipolítico avaliado pela taxa de lipólise em tecido adiposo epididimal e retroperitoneal não foi alterado pelo tratamento combinado de frutose e prednisolona, assim como pela suplementação com óleo de peixe (NS, $n = 9-15$; Figura 27. A-D).



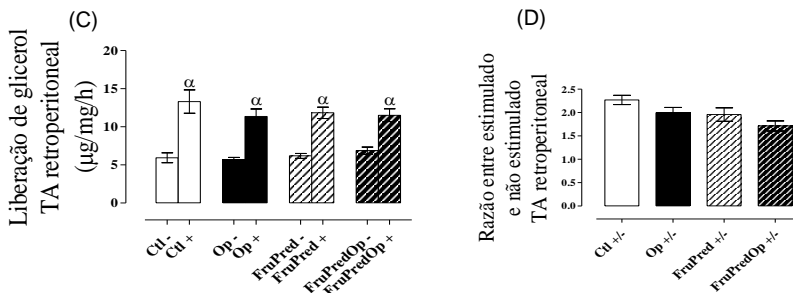


Figura 27. Liberação de glicerol em TA epididimal (A) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada (B), liberação de glicerol em TA retroperitoneal (C) e a respectiva razão entre a condição estimulada e não estimulada após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média \pm EPM. Alfa (α) indica diferença significativa em relação à condição basal. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-15$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.10 Determinação do estado REDOX em fígado

A suplementação do modelo experimental com óleo de peixe promoveu incremento no conteúdo de hidroperóxidos lipídicos em relação ao grupo FruPred. A média dos valores foi de $3,5 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $13,2 \pm 1,5$ e $17,1 \pm 0,9 \mu\text{mol} \cdot 100 \text{mg}^{-1}$ para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 28. A). No entanto, o grupo tratado apenas com óleo de peixe (Op) não apresentou alterações nesse parâmetro (NS, $n = 7-8$; Figura 28. A). O conteúdo de proteínas carboniladas não foi alterado por efeito do tratamento ou da suplementação (NS, $n = 7-8$; Figura 28. B). Em relação à redução da atividade da catalase promovida pela combinação dos tratamentos, não houve alterações por efeito do óleo de peixe (NS, $n = 8-10$; Figura 29. B). Em contra partida, a atividade da SOD foi significativamente reduzida no grupo FruPredOp em relação aos grupos FruPred e Op, com valores médios de $3,1 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,1$ e $2,7 \pm 0,3 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ para Ctl, Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 28. D).

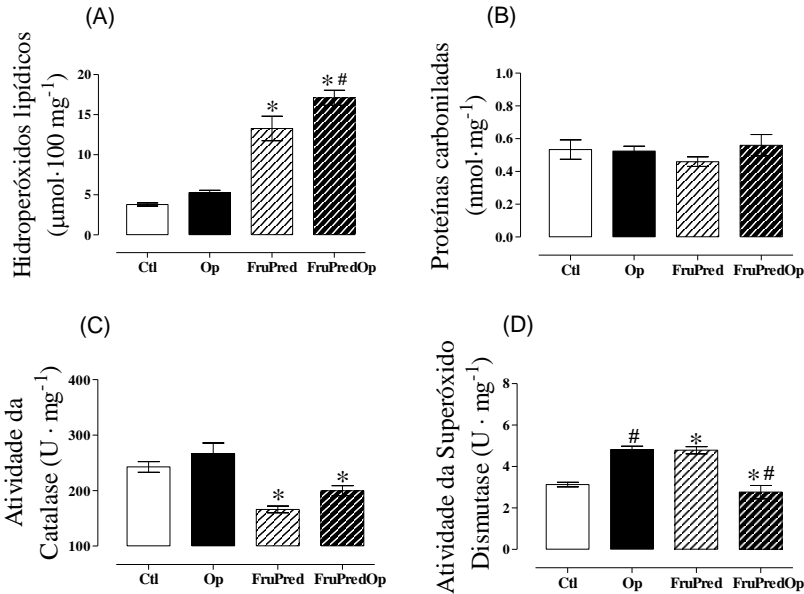


Figura 28. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. (#) indica diferença significativa por efeito do Op. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 7-10$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

6.2.11 Conteúdo do receptor PPAR γ em tecido adiposo

Através da ativação dos PPARs, os AGPI podem controlar a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose, de lipídios e na adipogênese. A suplementação com óleo de peixe por 6 semanas não promoveu alterações significativas no conteúdo total do receptor PPAR γ em tecido adiposo (NS, $n = 6$; Figura 29). Os valores médios obtidos por imunoblotting não foram estatisticamente diferentes, sendo 143 ± 33 , 98 ± 20 e $82 \pm 10\%$ para Op, FruPred e FruPredOp em relação ao grupo Ctl.

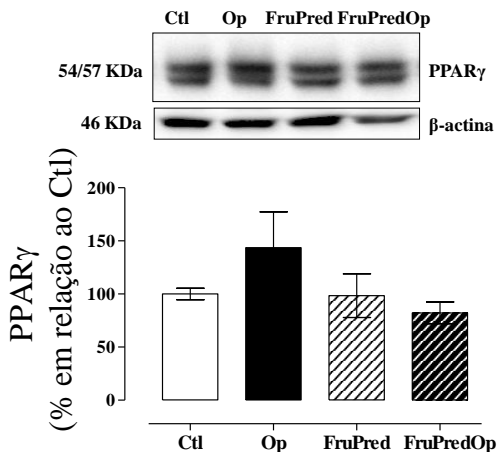


Figura 29. Conteúdo de PPAR γ em tecido adiposo epididimal após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média \pm EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$.

6.2.12 Conteúdo da cinase AKT em tecido adiposo e fígado

A determinação do conteúdo total e fosforilado da AKT em estado basal não foi alterado pela suplementação com óleo de peixe. A razão entre o conteúdo fosforilado em ambos os resíduos para o seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal foi similar entre ambos os grupos experimentais (NS, $n = 6$; Figura 30. A, B). Em fígado, a redução no conteúdo de AKT total presente no modelo experimental não foi modulado pela suplementação, com valores médios de 67 ± 13 , 47 ± 13 e 43 ± 10 % para Op, FruPred e FruPredOp em relação ao Ctl (Figura 30. C).

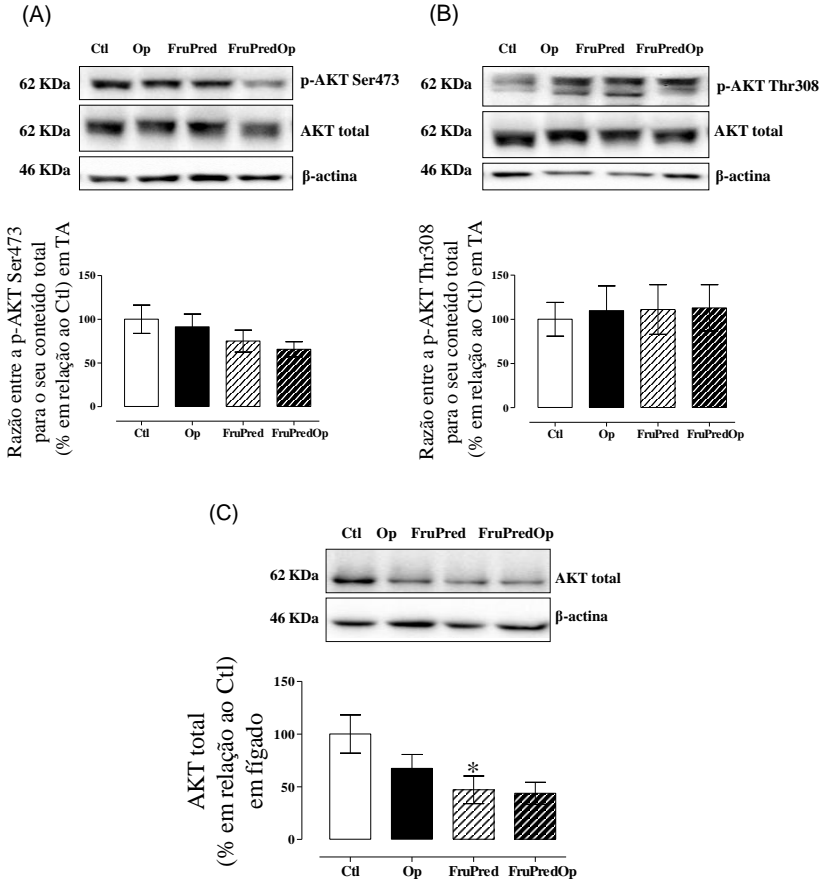


Figura 30. Razão entre o conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 para o seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 para o seu conteúdo total em tecido adiposo (B) e conteúdo total de AKT em fígado (C) após o tratamento e/ou suplementação. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

6.2.13 Conteúdo da proteína AMPK em tecido adiposo e fígado

A suplementação com óleo de peixe não teve efeitos sobre a redução na razão entre o conteúdo fosforilado e total da AMPK observado no modelo experimental FruPred. Os valores da razão entre o conteúdo fosforilado e total foram similares entre os grupos FruPred e FruPredOp sendo 53 ± 10 e $66 \pm 10\%$ em relação ao Ctl, respectivamente, em tecido adiposo (NS, $n=6$; Figura 31. A). Em fígado, os valores médios entre os grupos analisados foram 80 ± 8 , 57 ± 8 e $63 \pm 7\%$ em relação ao grupo Ctl, para Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente (Figura 31. B).

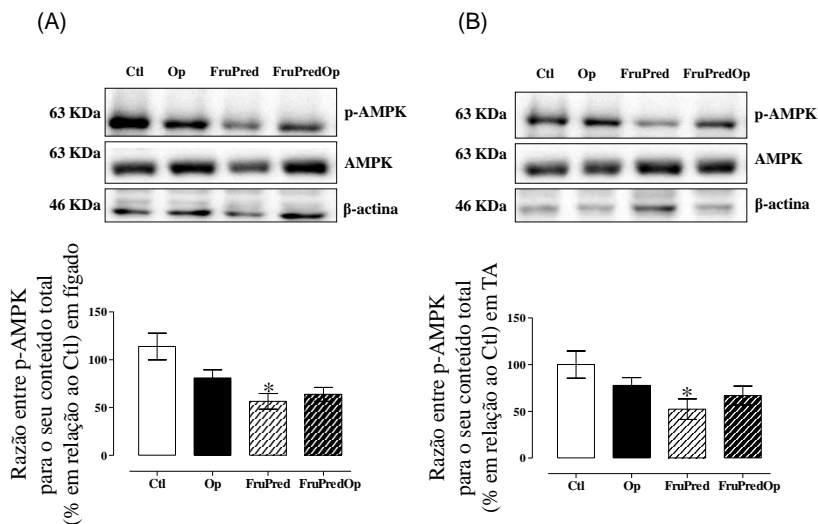
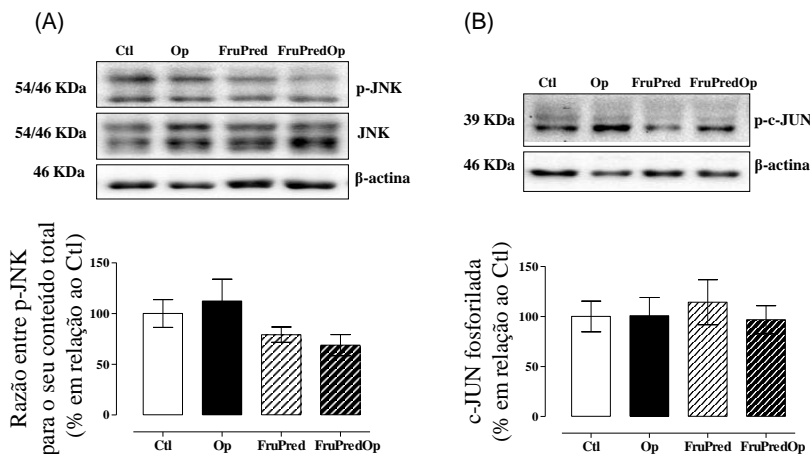


Figura 31. Valores da razão entre o conteúdo de AMPK fosforilada pelo seu conteúdo total em tecido adiposo epididimal (A) e fígado (B) após o tratamento e/ou suplementação. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa por efeito do tratamento FruPred. Utilizando ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n=6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

6.3. EFEITOS SOBRE A SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA

6.3.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, I κ B, NF κ B e GR em tecido adiposo

Embora o modelo experimental não tenha apresentado alterações no conteúdo das proteínas JNK, c-JUN, I κ B, NF κ B e GR, foi analisado se a suplementação com óleo de peixe teria algum impacto sobre a sinalização inflamatória e sobre o GR. A intervenção, mediante suplementação com óleo de peixe por 6 semanas não teve influências sobre a razão entre o conteúdo fosforilado e total das cinases JNK, I κ B, NF κ B e sobre a fosforilação da c-JUN (NS, $n=6$; Figura 32. A-E). Houve uma tendência de aumento no conteúdo do GR no grupo Op, com valores de 162 ± 28 , 105 ± 18 e 83 ± 15 % para Op, FruPred e FruPredOp, respectivamente, em relação ao Ctl, no entanto não foi estatisticamente relevante (NS, $n=6$; Figura 32. F).



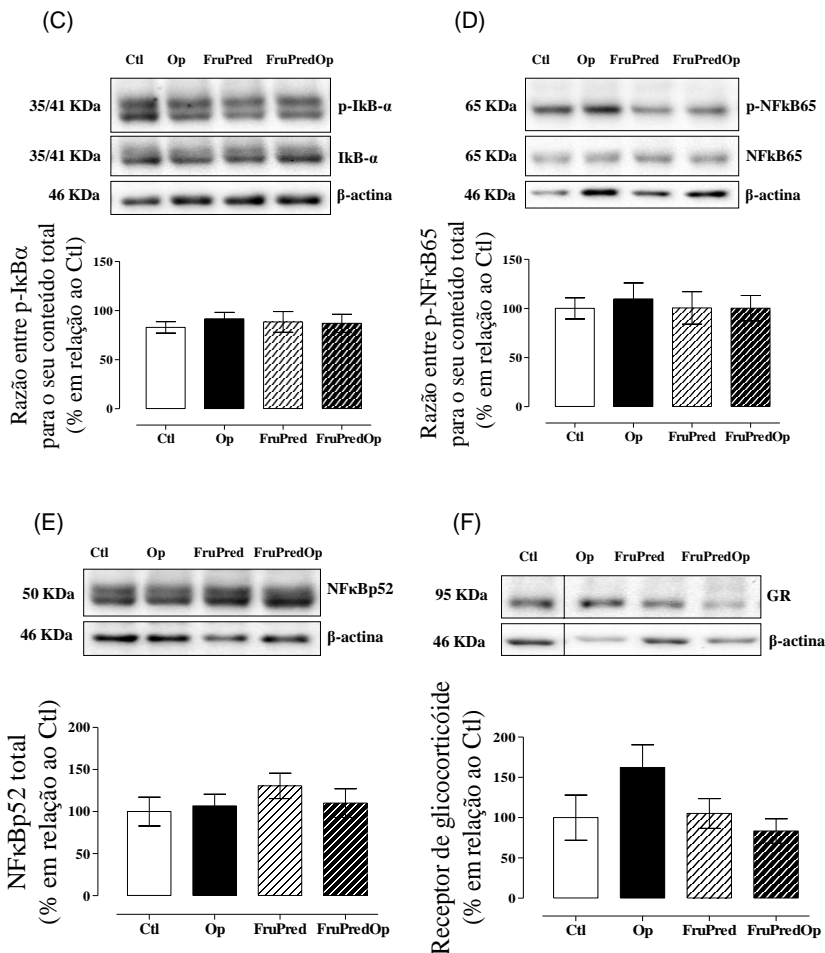


Figura 32. Valores da razão entre o conteúdo de JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo da c-JUN fosforilada (B), razão entre IkB fosforilada e seu conteúdo total (C) e entre NFκBp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo total de NFκBp52 (E) e receptor de glicocorticoide (GR) (F)* em tecido adiposo epididimal após o tratamento e suplementação. *Os blots representativos foram obtidos da mesma membrana. Dados são média ± EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

6.3.2 Conteúdo proteico da JNK, do TLR4 e da 11 β -HSD1 em fígado

Após analisado o tecido adiposo, verificou-se os possíveis efeitos do óleo de peixe sobre proteínas da via inflamatória e da enzima ativadora da 11-dehidrocortisterona intracelular em fígado. A suplementação com óleo de peixe não teve efeitos sobre o conteúdo proteico de ambas as proteínas analisadas no modelo experimental (NS, $n= 6$; Figura 33. A-C).

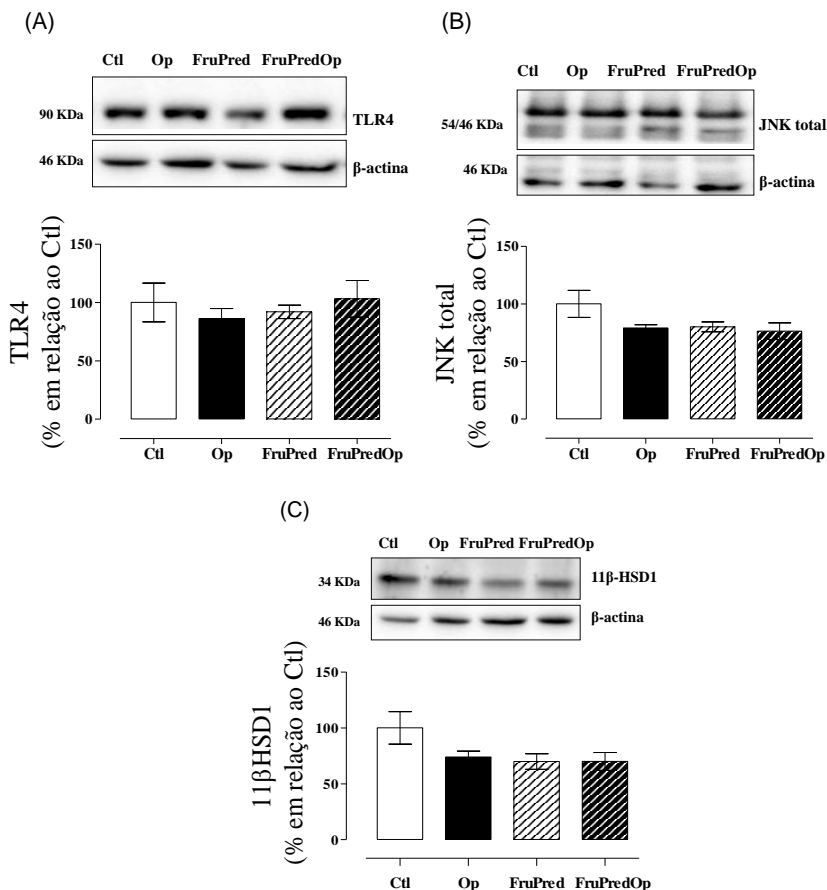


Figura 33. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11 β -HSD1 (C) em fígado após o tratamento e/ou suplementação. Dados são média \pm EPM.

Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

6.3.3 Conteúdo proteico do NFκB e do TLR4 em hipotálamo

A avaliação do efeito do óleo de peixe sobre mediadores inflamatórios centrais não revelou alterações no conteúdo proteico do NFκB e TLR4 em hipotálamo. Os valores médios da razão entre o conteúdo fosforilado e total do NFκBp65 para Op, FruPred e FruPredOp foram 99 ± 80 , 98 ± 12 e $80 \pm 18\%$ em relação ao Ctl (NS, $n = 6$; Figura 34. A). O conteúdo total do receptor TLR4 não diferiu, sendo 124 ± 25 , 156 ± 44 e $100 \pm 24\%$ para Op, FruPred e FruPredOp em relação ao Ctl (NS, $n = 6$; Figura 34. B). Em conjunto, esses dados demonstram que a suplementação com óleo de peixe a 1 mg/kg de peso corpóreo durante 6 semanas não promoveu nenhum efeito positivo sobre o conteúdo de proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose e de lipídios, bem como na via inflamatória, tanto em hipotálamo quanto em fígado e tecido adiposo.

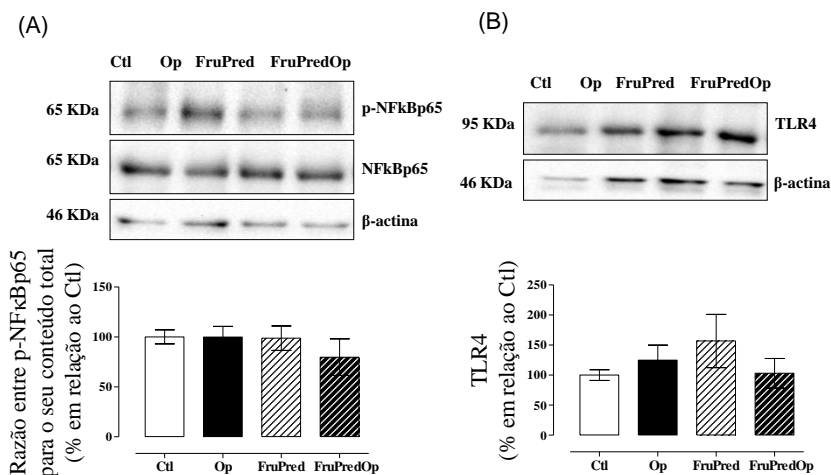


Figura 34. Valores da razão entre a fosforilação do NFκBp65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo após o tratamento e/ou suplementação. Imagens são blots representativos. Dados são média \pm EPM.

Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 5-6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

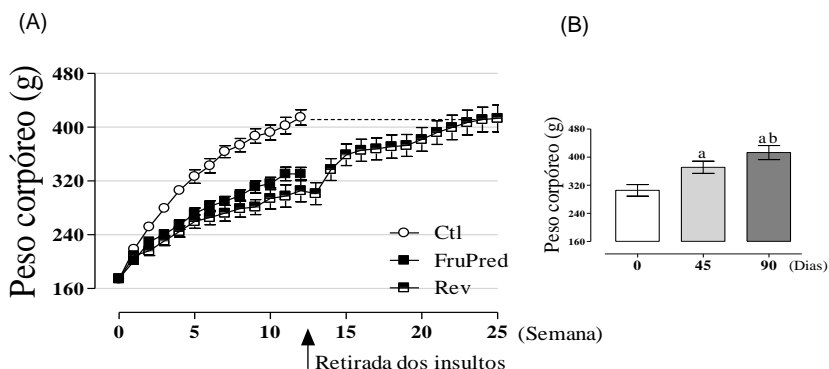
Como estratégia de intervenção do modelo experimental, a suplementação com óleo de peixe por 6 semanas foi suficiente para promover a incorporação de $n-3$ em hemácias e a mudança no perfil de ácidos graxos. A suplementação foi eficaz em normalizar as concentrações plasmáticas triacilglicerol, a hiperurecemia e o conteúdo de glicogênio hepático. Em contra partida, o efeito da suplementação no grupo FruPred promoveu incremento em marcadores de estresse oxidativo em fígado. Não houve efeitos sobre a sensibilidade à insulina ou sobre os parâmetros moleculares investigados.

7. RESULTADOS DO MÓDULO III: Acompanhamento dos parâmetros após interrupção dos tratamentos

7.1 EFEITOS SOBRE PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

7.1.1 Peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica

A fim de investigar a possível normalização dos parâmetros alterados pelo tratamento com frutose e prednisolona, um grupo paralelo de animais FruPred foi mantido por mais 12 semanas após a interrupção dos tratamentos em condições controle. A retirada dos insultos teve um impacto positivo sobre o ganho de peso corpóreo. Após 45 e 90 dias do término do tratamento houve um aumento de 21 e 35%, respectivamente, em relação ao último ponto avaliado durante o tratamento ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 35. A, B). A ingestão alimentar dos animais Rev aumentou significativamente, partindo de $3,3 \pm 0,1$ para $5,7 \pm 0,2$ e $5,3 \pm 0,2$ g/100 g p.c. após 45 e 90 dias do término do tratamento ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 35. C, D). A ingestão de água potável reduziu 35 e 42% após 45 e 90 dias da retirada da frutose ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 35 E, F). Em relação à ingestão calórica, os ajustes entre a ingestão alimentar e hídrica mantiveram o balanço calórico semelhante nos primeiros 45 dias pós-interrupção dos tratamentos, com posterior redução nesse parâmetro. Os valores médios da ingestão calórica total foram 22 ± 1 , $22 \pm 0,9$ e $20 \pm 0,8$ Kcal/100 g p.c. para os dias 0, 45 e 90 após o término do tratamento ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 35. G, H).



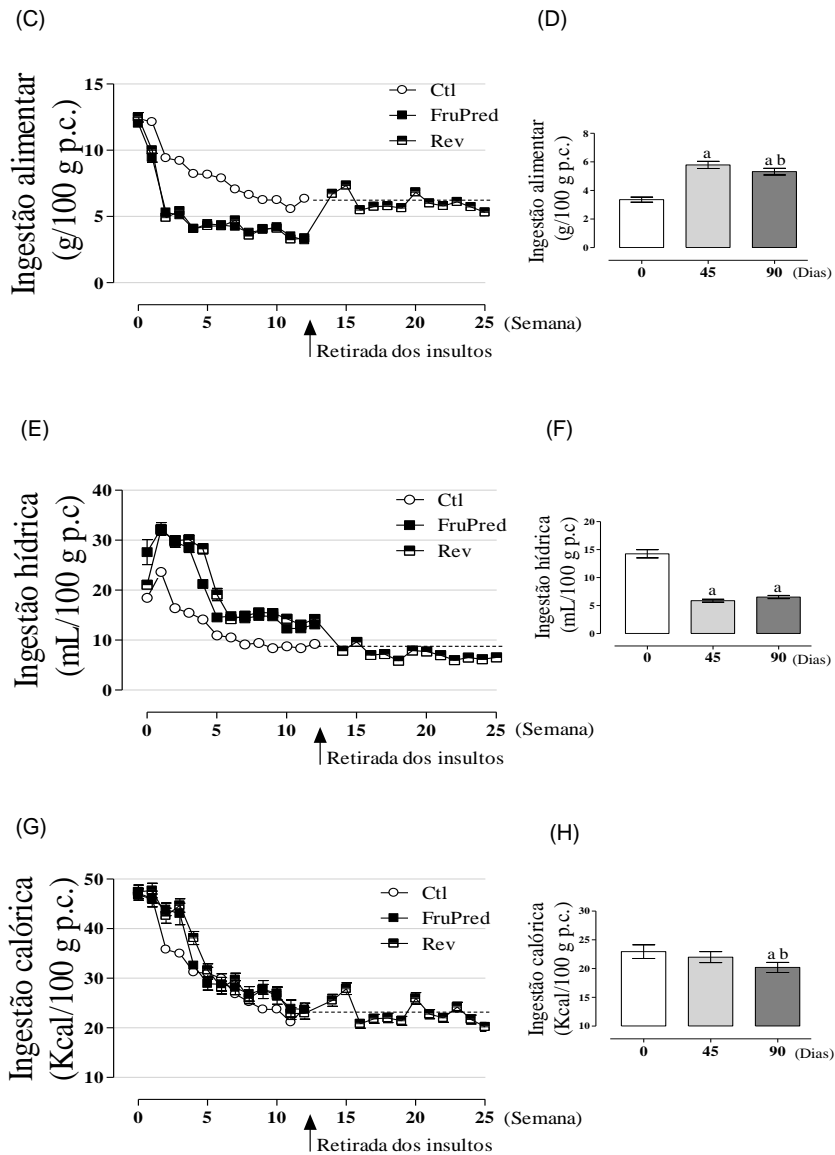


Figura 35. Acompanhamento temporal do peso corpóreo (A) e pós-tratamento do grupo Rev (B). Ingestão alimentar temporal (C) e pós-tratamento do grupo Rev (D). Ingestão hídrica temporal (E) e pós-tratamento do grupo Rev (F). Ingestão calórica temporal (G) e pós-tratamento do grupo Rev (H). Dados são média \pm EPM. Letra

“a” indica diferença significativa em relação ao baseline. “b” indica diferença significativa em relação aos 45 dias após a interrupção do tratamento. Utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas, $p < 0,05$, $n = 10$. Os dados de Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

7.1.2 Glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático pós-tratamento

Os animais Rev permaneceram normoglicêmicos no período pós-tratamento, com valores médios de 96 ± 3 , 91 ± 2 e 85 ± 1 mg/dL para os dias 0, 45 e 90, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 36. A, B). A dislipidemia observada no modelo experimental foi significativamente atenuada, partindo de 118 ± 6 para 76 ± 8 e 86 ± 5 mg/dL após 45 e 90 dias ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 36. C, D).

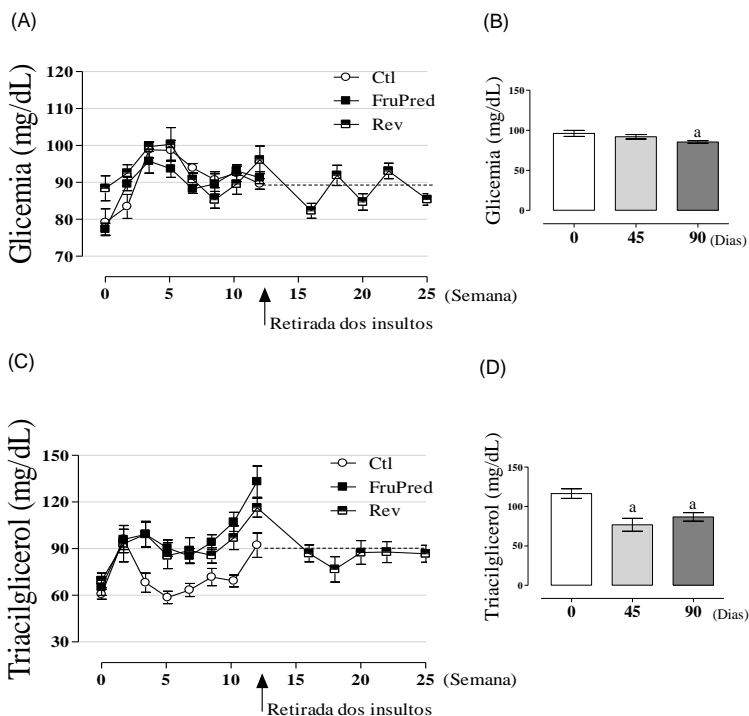


Figura 36. Acompanhamento temporal da glicose sanguínea (A) e pós-tratamento do grupo Rev (B). Triacilglicerol plasmático temporal (C) e pós-tratamento do grupo

Rev (D). Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao baseline. Utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas, $p < 0,05$, $n = 10$. Os dados de Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

7.1.3 Parâmetros sanguíneos pós-tratamento

Ao final dos 90 dias pós-tratamento as concentrações plasmáticas de insulina, proteínas, colesterol e ácido úrico do soro foram dosados. Além disso, os cálculos HOMA-IR e TyG foram realizados para determinar a sensibilidade à insulina. Os animais Rev apresentaram redução nas concentrações circulantes de insulina e ácido úrico ($p < 0,05$, $n = 10$; Tabela 12), no entanto as concentrações de albumina não foram alteradas em relação aos animais FruPred, permanecendo com as concentrações elevadas (NS, $n = 10$; Tabela 12). Houve melhora da sensibilidade à insulina após 90 dias de interrupção do tratamento, a julgar pelos valores do HOMA-IR ($0,4 \pm 0,08$, $1,7 \pm 0,2$ e $0,9 \pm 0,1$ para Ct, FruPred e Rev) e TyG ($8,2 \pm 0,09$, $8,7 \pm 0,07$ e $8,2 \pm 0,04$ para Ctl, FruPred e Rev) ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 37. A, B). Esses dados demonstram que o fenótipo de RI e hiperglicemia é transitório, podendo ser revertido com a retirada dos insultos.

Tabela 12. Parâmetros sanguíneos 90 dias pós-tratamento

	Ctl	FruPred	Rev
Insulina (pg/mL)	78 \pm 15	341 \pm 40 ^a	190 \pm 34 ^b
Albumina (g/dL)	2,1 \pm 0,07	3,6 \pm 0,1 ^a	3,8 \pm 0,1
Ácido úrico (mg/dL)	0,5 \pm 0,07	1,2 \pm 0,07 ^a	0,8 \pm 0,04 ^b
Colesterol total (mg/dL)	121 \pm 10	117 \pm 8	95 \pm 8

Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

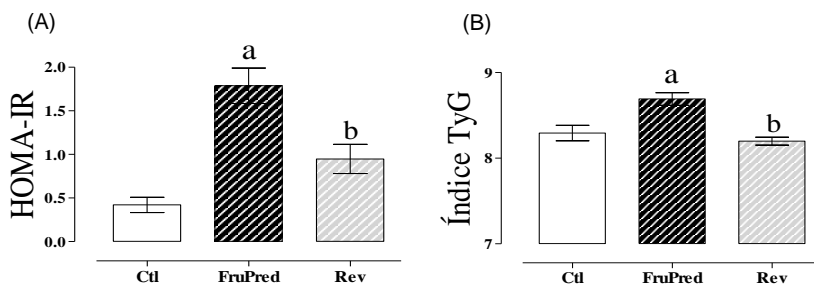


Figura 37. Valores do cálculo HOMA-IR (A) e índice TyG (B) 90 dias pós-tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 10$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

7.1.4 Massa relativa dos órgãos

Para verificar o impacto da retirada dos insultos sobre a massa dos órgãos, 90 dias após a interrupção do tratamento, o grupo Rev teve os órgãos removidos e pesados, e comparados com o grupo FruPred. O aumento relativo da massa de fígado e gordura marrom observado no modelo experimental FruPred reduziu significativamente após a interrupção do tratamento ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Tabela 13). A massa relativa das gorduras epididimal, omental e abdominal total não foram alteradas pós-tratamento (NS, $n = 9-13$; Tabela 13).

Tabela 13. Massa relativa dos órgãos 90 dias pós-tratamento

	Ctl	FruPred	Rev
Pâncreas (mg/100 g p.c)	282 \pm 10	317 \pm 10	282 \pm 8
Fígado (g/100 g p.c)	3,1 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1 ^a	2,9 \pm 0,1 ^b
Baço (mg/100 g p.c)	208 \pm 7	191 \pm 3	189 \pm 7
Adrenais (mg/100 g p.c)	16 \pm 0,6	16 \pm 0,6	15 \pm 1,1

Gordura epididimal (g/100 g p.c)	1,1±0,07	2,0±0,1 ^a	1,6±0,1
Gordura retroperitoneal (g/100 g p.c)	1,6±0,1	1,6±0,1	2,0±0,1
Gordura omental (mg/100 g p.c)	136±10	252±30 ^a	179±20
Gordura marrom (mg/100 g p.c)	95±8	143±12 ^a	99±7 ^b
Gordura abdominal total (g/100 g p.c)	2,9±0,2	3,9±0,2 ^a	3,8±0,2

Dados são média ± EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmo utilizados no módulo 1.

7.1.5 Conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepáticos

O conteúdo de glicogênio hepático no grupo Rev não foi alterado em relação ao grupo FruPred. Após 90 dias de interrupção do tratamento os valores permaneceram similares, sendo 3,4±0,5, 9,2±0,8 e 11±2 mg/g de tecido para Ctl, FruPred e Rev, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 9-13$; Figura 38. A). Em relação ao conteúdo de triacilglicerol hepático, o grupo Rev apresentou valores 5.6 vezes menores do que o modelo experimental, revertendo à condição de acúmulo de gordura hepática ($p < 0,05$, $n = 10$; Figura 38. B).

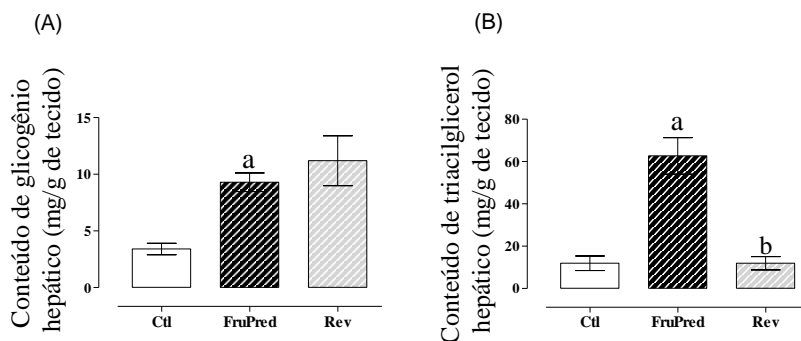


Figura 38. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e triacilglicerol hepático (B) 90 dias pós-tratamento. Dados são média ± EPM. Letra “a” indica diferença

significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 9-13$.

7.1.6 Determinação do estado REDOX em fígado

Após 90 dias da interrupção dos tratamentos o conteúdo de hidroperóxidos lipídicos reduziu significativamente em relação ao grupo FruPred, revertendo esse parâmetro alterado. A média dos valores foi de $3,5 \pm 0,2$, $13,2 \pm 1,5$ e $3,6 \pm 0,4 \mu\text{mol} \cdot 100 \text{mg}^{-1}$ para Ctl, FruPred e Rev, respectivamente ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 39. A). O conteúdo de proteínas carboniladas e a atividade da enzima catalase não foram alterados no grupo Rev (NS, $n = 7-8$; Figura 39. B, C). A atividade da SOD foi maior no grupo Rev do que no grupo FruPred, apresentando um incremento de 15% em relação ao FruPred ($p < 0,05$, $n = 8-10$; Figura 39. D).

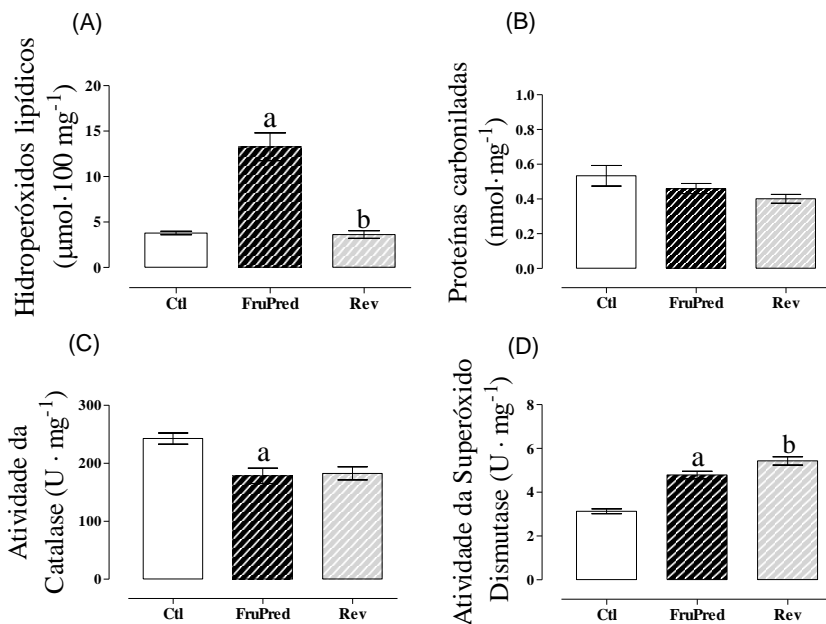
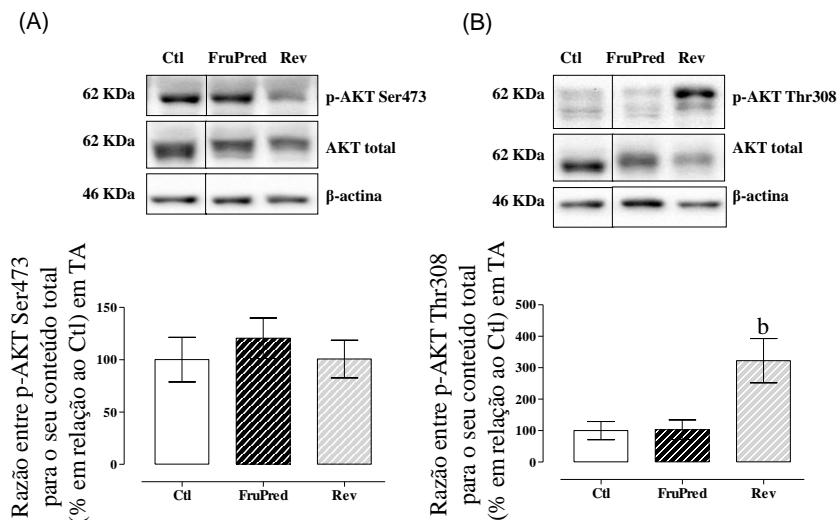


Figura 39. Hidroperóxidos lipídicos (A), proteínas carboniladas (B), atividade da catalase (C) e atividade da superóxido dismutase (D) em fragmentos do fígado 90 dias pós-tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença

significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 7-10$. Os valores dos grupos Ctl e FruPred são os mesmos utilizados no módulo 1.

7.1.7 Conteúdo proteico da AKT em tecido adiposo e fígado

Para verificar se a melhora da sensibilidade à insulina foi acompanhada de modificações moleculares, o conteúdo proteico da AKT foi determinado em tecido adiposo e fígado após 90 dias do término do tratamento. Em tecido adiposo, a razão entre o conteúdo fosforilado e total da AKT foi alterado de maneira resíduo específico, não havendo alterações para fosforilação em serina 473 (NS, $n = 6$; Figura 40. A). A razão entre a fosforilação da AKT em treonina 308 para o seu conteúdo total foi substancialmente aumentada, com valores médios de $102 \pm 31\%$ para FruPred vs $322 \pm 70\%$ para Rev ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 40. B). Em fígado, o grupo Rev apresentou aumento no conteúdo total da AKT em relação aos valores reduzidos do modelo experimental, sendo 100 ± 12 , 33 ± 8 e $96 \pm 11\%$ para Ctl, FruPred e Rev, respectivamente, normalizados pelo Ctl ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 40. C).



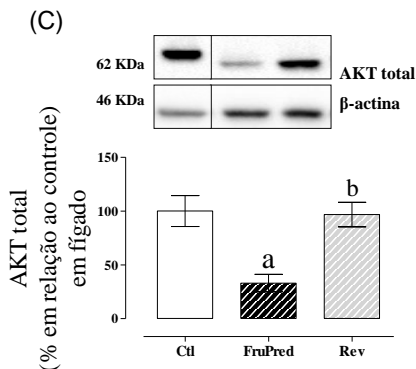


Figura 40. Razão entre o conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 para o seu conteúdo total (A) e fosforilada em treonina 308 para o seu conteúdo total em tecido adiposo (B) e conteúdo total de AKT em fígado (C) 90 dias pós-tratamento. Os blots representativos em A, B e C foram obtidos da mesma membrana. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1, porém em imunoblottings distintos.

7.1.8 Conteúdo proteico da AMPK em tecido adiposo e fígado

O conteúdo de AMPK foi determinado tecido adiposo e fígado. Em tecido adiposo, os valores médios da razão foram significativamente aumentados, sendo $50 \pm 11\%$ para FruPred vs $101 \pm 10\%$ para Rev, em relação ao Ctl ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 41. A). Em fígado, a redução nos valores da razão entre a AMPK fosforilada e total observada no modelo FruPred permaneceu reduzida após o término do tratamento (NS, $n = 6$; Figura 41. B). Esses dados indicam a capacidade de normalização do conteúdo da AMPK em tecido adiposo, mas não em fígado, 90 dias após o término do tratamento.

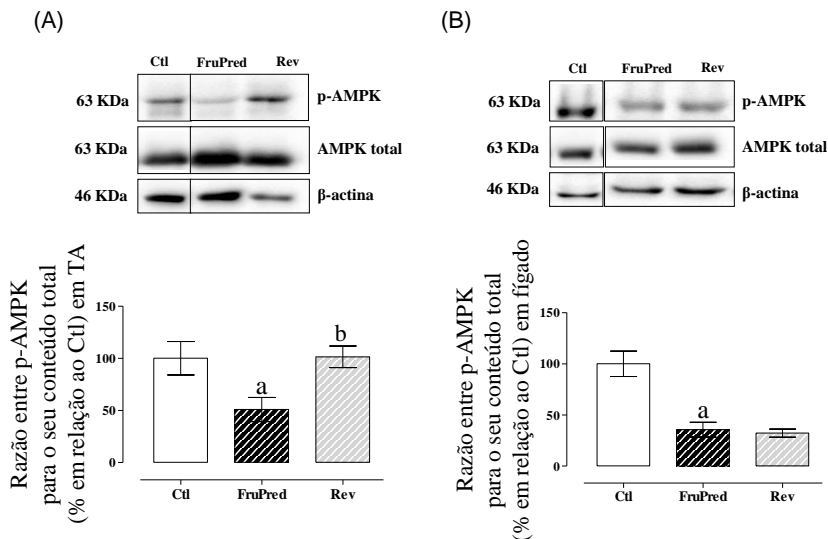


Figura 41. Razão entre o conteúdo da AMPK fosforilada para o seu conteúdo total em tecido adiposo (A) e fígado (B) 90 dias pós-tratamento. Dados são média \pm EPM. Letra “a” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl. “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Os blots representativos foram obtidos da mesma membrana. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1.

7.2. SINALIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA

7.2.1 Conteúdo proteico da JNK, c-JUN, I κ B, NF κ B e GR em tecido adiposo

Para investigar se o conteúdo das proteínas pró-inflamatórias e do GR foi alterado 90 dias após a interrupção do tratamento, determinamos o conteúdo proteico da JNK, c-JUN, I κ B, NF κ B e do GR dos animais Rev. Não houve alterações em ambas as proteínas pró-inflamatórias analisadas, os animais Rev apresentaram o mesmo perfil observado no grupo FruPred em tecido adiposo (NS, $n = 6$; Figura 42. A-E). O conteúdo total do GR foi significativamente aumentado nos animais Rev em relação ao grupo FruPred. Os valores médios normalizados foram $101 \pm 17\%$ para FruPred vs $242 \pm 50\%$ para Rev, em relação ao Ctl ($p < 0,05$, $n = 6$; Figura 42. F).

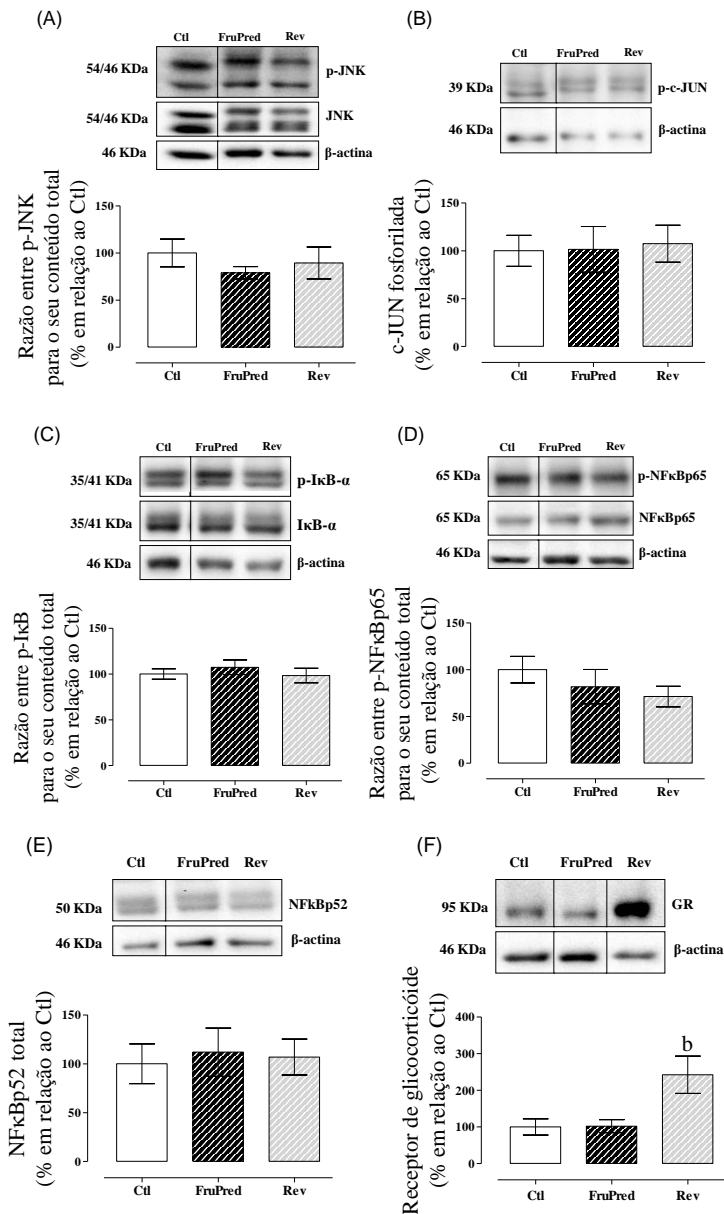


Figura 42. Valores da razão entre o conteúdo da JNK fosforilada pelo seu conteúdo total (A), conteúdo da c-JUN fosforilada (B), razão entre I κ B fosforilada e seu

conteúdo total (C) e entre NF κ Bp65 fosforilada e seu conteúdo total (D). Conteúdo total de NF κ Bp52 (E) e GR (F) em tecido adiposo epididimal 90 dias pós-tratamento. Os blots representativos foram obtidos da mesma membrana. Dados são média \pm EPM. Letra “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1

7.2.2 Conteúdo proteico da JNK, TLR4 e 11 β HSD1 em fígado

A análise do conteúdo do receptor TLR4, da cinase JNK e da enzima 11 β HSD1 em fígado, revelaram que essas proteínas não foram moduladas pela combinação do tratamento FruPred ou pela retirada do mesmo. O conteúdo dessas proteínas foram semelhantes entre os grupos FruPred e Rev (NS, $n = 6$; Figura 43. A-C).

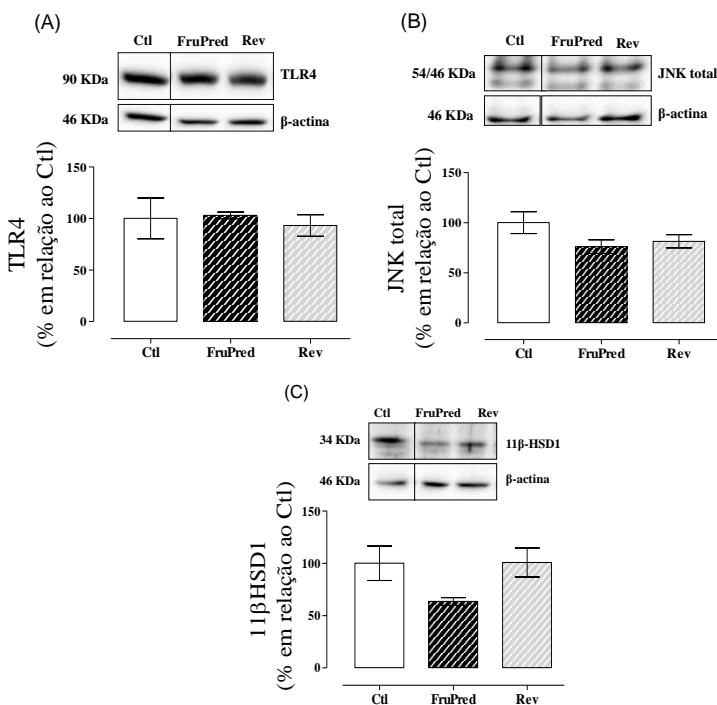


Figura 43. Valores do conteúdo total do TLR4 (A), da JNK (B) e da 11 β HSD1 (C) em fígado 90 dias pós-tratamento. Os blots representativos foram obtidos da mesma

membrana. Dados são média \pm EPM. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1.

7.2.3 Conteúdo proteico do NF κ B e TLR4 em hipotálamo

A determinação do conteúdo do NF κ Bp65 no hipotálamo dos animais Rev, revelou significativo aumento na razão entre o conteúdo fosforilado e total desse fator de transcrição, sendo 70% maior do que no grupo FruPred ($p < 0,05$, $n = 5-6$; Figura 44. A). O conteúdo total do receptor TLR4 permaneceu semelhante ao grupo FruPred, não apresentando alterações ao final do tratamento ou 90 dias após o término do tratamento (NS, $n = 5-6$; Figura 44. B).

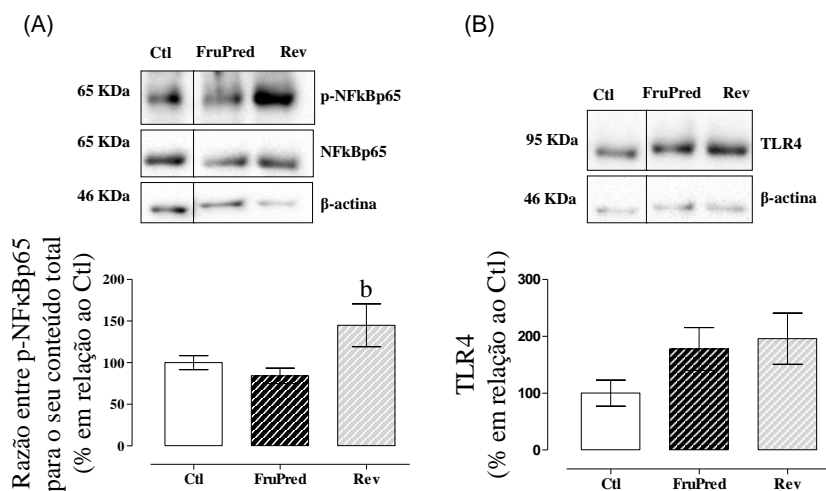


Figura 44. Valores da razão entre a fosforilação do NF κ Bp65 e o seu conteúdo total (A) e do conteúdo total do TLR4 (B) em hipotálamo 90 dias pós-tratamento. Os blots representativos foram obtidos da mesma membrana. Dados são média \pm EPM. Letra “b” indica diferença significativa em relação ao grupo FruPred. Utilizado ANOVA de uma via, $p < 0,05$, $n = 5-6$. As amostras de Ctl e FruPred são as mesmas utilizadas no módulo 1.

Em conjunto, esses dados indicam que parte das características encontradas no modelo experimental podem ser reversíveis com a retirada dos insultos, como a recuperação do ganho de peso corpóreo, normalização das concentrações de triacilglicerol plasmáticas e no fígado, hiperurecemia, sensibilidade à insulina e estresse oxidativo, assim como a normalização da AMPK em tecido adiposo. No entanto, novas características podem ser observadas, a julgar pelo aumento do conteúdo proteico da AKT em tecido adiposo e fígado, do GR em tecido adiposo e do NFκBp65 em hipotálamo após 90 dias da interrupção do tratamento.

8. DISCUSSÃO

Modulo I. O modelo experimental

No presente trabalho, foi demonstrado que os efeitos promovidos pela combinação de frutose e prednisolona na água de beber sobre os parâmetros metabólicos envolvem: 1) redução no ganho de peso corpóreo mesmo a uma dada ingestão calórica similar ao grupo Ctl, 2) aumento da adiposidade abdominal, 3) aumento nas concentrações de triacilglicerol plasmáticas, 4) aumento no conteúdo de gordura e glicogênio hepático, 5) hiperinsulinemia e redução da sensibilidade à insulina, 6) hiperurecemia e 7) aumento de marcadores de estresse oxidativo. A redução na sensibilidade à insulina não esteve associada com aumento no conteúdo e/ou fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização pró-inflamatória nos tecidos analisados (adiposo, hepático e hipotalâmico). Ainda que tais alterações foram acompanhadas de normoglicêmia, foi observada a redução no conteúdo proteico da AKT e da AMPK em fígado do grupo FruPred. Em síntese, a combinação dos tratamentos não promoveu um modelo de diabetes, mas um fenótipo com características de SM.

Ao longo do protocolo experimental foi observado redução no ganho de peso corpóreo dos animais Pred e FruPred. No entanto, esses animais apresentaram a mesma ingestão calórica total do que os grupos Ctl e Fru, os quais apresentaram ganho de peso contínuo ao longo do tratamento. Isso poderia indicar que ambos os animais tratados com GC apresentam uma maior demanda energética ou que esses animais apresentam prejuízo no desenvolvimento ósseo e na massa muscular. De fato, os GCs impactam negativamente sobre a formação óssea, que pode ser observado pela grande incidência (30-50%) de osteoporose relacionada à terapia com GC (DEMPSTER, 1989; HOES *et al.*, 2010). Esse efeito pode ser através da supressão da osteoblastogênese, assim como pela apoptose de osteoblastos (MANOLAGAS; WEINSTEIN 1999). Ratos tratados com dexametasona (0,1 mg/Kg/s.c) por 5 semanas apresentaram redução no ganho de peso corpóreo e osteoporose, com redução nos osteoblastos e na osteocalcina, um marcador de formação óssea liberado pelos osteoblastos (ZHANG *et al.*, 2016). Outro ponto que pode contribuir para a redução do ganho de peso corpóreo se deve ao efeito catabólico dos GCs sobre a massa muscular (KIM *et al.*, 2012). A determinação dos níveis plasmáticos de albumina e proteínas totais sugerem um aumento na mobilização desses substratos nos grupos Pred

e FruPred, especialmente no grupo tratado com a combinação. Sendo assim, o efeito dos GCs sobre a formação óssea e mobilização de substratos proteicos parece contribuir para a redução no ganho de peso corpóreo dos animais com comportamento normofágico. Além disso, em um rato Wistar adulto (300 g) em condições normais a composição corpórea é majoritariamente composta por massa livre de gordura, sendo equivalente a 92% do peso total do animal, enquanto que a massa adiposa total equivale a menos que 8% do peso corpóreo (SUZUKI *et al.*, 1996) , o que indica que apesar de haver aumento na massa adiposa esse é o fator que pouco contribui para o peso total dos animais. Em última análise, o aumento da massa relativa de tecido adiposo marrom pode indicar aumento na termogênese e desperdício energético nesse grupo experimental. Embora a atividade termogênica não tenha sido avaliada, como por exemplo, pela verificação da temperatura retal dos animais, pode ser que isso corrobore para o menor ganho de peso nesses animais.

Em relação à adiposidade, os animais do grupo experimental FruPred e Fru apresentaram aumento no tecido abdominal total. É válido salientar que o aumento na massa de tecido adiposo associado à ingestão de frutose não se baseia principalmente na quantidade de calorias ingeridas, uma vez que ambos os grupos consumiram a mesma quantidade de calorias, mas sim no metabolismo da frutose. O aumento da deposição de gordura abdominal pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento das concentrações circulantes de triacilglicerol e da secreção de hepática VLDL, uma vez que a hipertriacilgliceridemia pode promover deposição de gordura no tecido adiposo visceral, como demonstrado por outros trabalhos (RUTLEDGE; ADELI 2007; STANHOPE; HAVEL 2008; BOCARSLY *et al.*, 2010). Ainda, alguns autores defendem o efeito da frutose sobre a hipertrofia e hiperplasia de adipócitos (ZUBIRIA *et al.*, 2013; 2016) e sobre a redução na taxa de oxidação de gordura (COX *et al.*, 2012). Ambos os trabalhos corroboram para os potenciais efeitos da frutose sobre a obesidade. Além disso, o aumento da adiposidade pode estar relacionado com a redução da atividade da AMPK em tecido adiposo. Em adipócitos a AMPK é capaz de inibir enzimas e fatores de transcrição lipogênicos (ACC, FAS, SREBP1 e PPAR γ) e favorecer a oxidação de ácidos graxos através da redução da formação de malonil-CoA, um precursor lipídico que tem efeito inibitório sobre o transporte de ácidos graxos para matriz mitocondrial via CPT-1 (cartinina palmitoil transferase I) (ROSSMEISL *et al.*, 2004). Dessa forma, a redução da fosforilação da

AMPK observada no grupo FruPred, pode colaborar para a deposição de gordura nesse grupo experimental.

Em relação aos compartimentos de gordura, nota-se um efeito tecido-específico. O tratamento com frutose promoveu aumento na massa relativa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. No entanto, nos animais que receberam a administração conjunta de frutose e GC não houve incremento no tecido retroperitoneal. O que indica um possível efeito dos GC sobre o armazenamento de gordura nessa região. É sabido que os GC apresentam um efeito dual sobre os depósitos de gordura, promovendo lipogênese e adipogênese em tecido adiposo visceral e redução dos depósitos periféricos, por provável ação lipolítica (RAFACHO *et al.*, 2014). No entanto, a taxa de lipólise não foi alterada em ambos os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal, indicando que a ausência do incremento de gordura no tecido retroperitoneal (FruPred) pode estar relacionado com outros mecanismos. O redirecionamento do depósito de gordura para outros compartimentos de tecido adiposo tal como o omental, bem como o depósito de gordura ectópica observado em fígado e pâncreas (dados de pâncreas não mostrados nesta dissertação) poderia ser uma explicação. Interessantemente, os animais tratados apenas com GC não apresentaram alterações significativas em nenhum depósito de gordura (provavelmente pela dose utilizada no presente trabalho), de modo que em doses farmacológicas o efeito pode ser negativo quando associado a um segundo insulto metabólico.

A análise do perfil lipídico, revelou que apenas os animais FruPred apresentaram aumento nos níveis circulantes de triacilglicerol, redução da fosforilação da AMPK e paralelo aumento no conteúdo de gordura hepática. Embora os efeitos dislipidêmicos da frutose e dos GC sejam bem documentados na literatura, apenas a combinação dos tratamentos promoveu a deposição de gordura hepática, o que indica um efeito sinérgico de ambos os tratamentos. Por efeitos da frutose, os animais FruPred e Fru apresentaram aumento na triacilgliceridemia, como já descrito por outros autores (SOFTIC; COHEN; KAHN 2016). A ausência de efeito do GC sobre esse parâmetro pode ser devido ao fármaco de escolha (prednisolona) e a dose utilizada, uma vez que em outros contextos os CG elevam as concentrações de triacilglicerol (RAFACHO *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2013; MOTTA *et al.*, 2015). No entanto, por efeito da prednisolona houve redução no conteúdo fosforilado da AMPK nos grupos FruPred e Pred. A AMPK hepática modula o metabolismo de lipídios, estimulando a β -oxidação e inibindo a lipogênese (FULLERTON, 2016), portanto a redução na sua ação

poderia colaborar para a deposição de gordura hepática. Alguns trabalhos corroboram com a redução da atividade da AMPK em quadros de obesidade e diabetes, e em especial na NAFLD (SMITH *et al.*, 2016). Assim, a combinação do aumento do triacilglicerol plasmático e da redução da atividade da AMPK hepática coincidem com a deposição de gordura hepática, promovida pelo efeito conjunto dos tratamentos.

Outra característica singular do grupo FruPred foi o aumento nos das concentrações plasmáticas de ácido úrico, que corroboram com o aumento da deposição de gordura hepática. O ácido úrico é um metabólito oriundo da redução na razão ATP:AMP intracelular e do aumento da atividade da enzima deaminase-AMP (AMPD) nos hepatócitos. Vários trabalhos têm demonstrado que a redução da biodisponibilidade de ácido úrico impede o desenvolvimento da NAFLD em animais alimentados com frutose (LANASPA *et al.*, 2012) ou em modelos de esteatose hepática espontânea (XU *et al.*, 2010; LANASPA *et al.*, 2012). Um mecanismo pelo qual o ácido úrico favorece a síntese de ácidos graxos é através do aumento do estresse oxidativo mitocondrial e do acúmulo de citrato intracelular, que por sua vez atua como substrato para síntese de ácidos graxos além de ser um ativador alostérico da ACC (LANASPA *et al.*, 2012). Sendo assim, o aumento da urecemia observada no grupo FruPred sugere que tal mecanismo favoreça o acúmulo de gordura hepática observado nesse grupo, uma vez que o grupo tratado apenas com frutose não apresentou nenhuma dessas características.

Em contextos de SM, ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução de mecanismos antioxidantes favorecendo o surgimento do estresse oxidativo celular (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO 2013; KELANY *et al.*, 2016). Entre os marcadores de estresse oxidativo hepáticos, observou-se aumento do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos, associado à redução da ação antioxidante da catalase e aumento da SOD no grupo FruPred. A defesa antioxidante limitada observada no grupo FruPred parece favorecer o aumento do estresse oxidativo nesse grupo experimental, indicando que a sinergia dos tratamentos foi suficiente para promover o balanço pró-oxidativo. Esse resultado vai ao encontro do aumento no conteúdo de gordura hepática desse grupo experimental (também observamos fenótipo de esteatose hepática neste grupo; dados não apresentados nesta dissertação). Corroborando com nossos dados, ratos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura apresentaram aumento da atividade da NOX (NADPH oxidases), da peroxidação de lipídios, de proteínas carboniladas e redução em defesas antioxidantes associados ao

desenvolvimento da NAFLD (CARMIEL-HAGGAI *et al.*, 2005). De acordo com esses autores, o contexto dislipidêmico favorece a NAFLD, caracterizada principalmente pela deposição de gordura hepática, com paralelo estresse oxidativo. Não é possível afirmar com clareza a exata ordem desses eventos, no entanto, alguns autores discutem que na patogênese da NAFLD, o acúmulo de lipídio hepático sobrecarrega a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que por sua vez leva ao aumento de ROS e produtos da peroxidação de lipídios. O aumento desses mediadores prejudica a função mitocondrial e reduz a β -oxidação de lipídios, promovendo a esteatose hepática a partir desse ciclo vicioso (KOEK; LIEDORP; BAST 2011; TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO 2013). De acordo com Takami e colaboradores (2010), em hepatócitos de humanos com NAFLD a expressão da SOD é aumentada. Em nosso trabalho, foi observado aumento da atividade da SOD em ambos os grupos experimentais (Fru, Pred e FruPred), no entanto apenas a redução da atividade da catalase no grupo FruPred pode ter promovido o aumento do estresse oxidativo nesse grupo.

Em relação ao conteúdo de glicogênio hepático, foi observado aumento em ambos os grupos tratados com frutose. Após a administração aguda de frutose em roedores o aumento do glicogênio hepático parece ser resultado do metabolismo da frutose e da inibição da glicogênio fosforilase, promovendo acúmulo de glicogênio a partir do aumento da disponibilidade de frutose (GERGELY *et al.*, 1985; BIZEAU; PAGLIASSOTTI 2005). Além disso, administração de frutose contribui mais para a síntese de glicogênio hepático do que a administração de quantidade equivalente de glicose (TAPPY; LÊ 2010).

Os animais FruPred não apresentaram hiperglicemia, assim como os demais grupos experimentais, dessa maneira a combinação dos tratamentos não foi suficiente para promover um modelo experimental de diabetes que estaria baseado numa hiperglicemia e intolerância à glicose. A normoglicemia foi acompanhada por aumento nos níveis circulantes de insulina (e também por aumento da massa relativa de células β ; dados não apresentados nesta dissertação), o que indica uma resposta compensatória das células β frente à redução na sensibilidade periférica, a fim de preservar a homeostase glicêmica (BONNER-WEIR *et al.*, 1981; RAFACHO *et al.*, 2008; 2009). Embora normoglicêmicos, tanto os animais FruPred quando Pred apresentaram redução na sensibilidade à insulina, a julgar pela constante de decaimento da glicose sanguínea durante o ipITT, índice Homa e TyG. A interpretação do índice TyG demonstra o potencial impacto dislipidêmico da frutose sobre a RI, no entanto os níveis circulantes de insulina e o ITT não

foram influenciados pela frutose, o que significa que o efeito majoritário da RI pode ser atribuído ao GC. Esse efeito dos GC sobre a atenuação da sensibilidade à insulina é corroborado com uma série de trabalhos experimentais em roedores e humanos (SCHNEITER; TAPPY 1998; VAN RAALTE *et al.*, 2010; RAFACHO *et al.*, 2008). Vale a pena destacar, que os efeitos diabetogênicos da prednisolona talvez sejam mais sobre os tecidos periféricos do que sobre a função das células β , pelo menos na dose e tempo utilizadas em nosso protocolo experimental, embora não tenhamos observado alterações na fosforilação da AKT em condições basais. Contudo, há evidências em humanos mostrando que a prednisolona (30 mg por 15 dias) reduz a função das células β e secreção de insulina (VAN RAALTE *et al.*, 2010).

A maior tolerância à glicose observada no grupo FruPred reforça a resposta compensatória das células β após um desafio com glicose, onde a secreção de insulina (não analisada neste trabalho) provavelmente foi superior à demanda exigida pela redução da sensibilidade periférica, com provável melhora da disponibilidade da glicose (consumo e armazenamento). Outro ponto que deve ser levado em conta é esses animais também podem ter menor atividade da enzima que degrada a insulina (IDE), como demonstrado por Protzek e colaboradores (2016), onde roedores tratados com dexametasona apresentaram redução no *clearance* de insulina devido a redução da atividade da IDE. Assim, a soma desses fatores pode contribuir para a maior tolerância à glicose nesses animais. Vale a pena destacar que houve maior incremento nos níveis circulantes de insulina no grupo FruPred do que no grupo Pred, apesar de não haver diferença estatística, assim como maior tolerância à glicose, o que indica que a combinação dos tratamentos promove um fenótipo mais robusto de RI, sem que implique negativamente sobre a função das ilhotas pancreáticas até o momento investigado.

A alteração da sensibilidade à insulina determinada pelo ITT prediz a sensibilidade principalmente do músculo e tecido adiposo, uma vez que a captação de glicose pelo fígado é independente da ação da insulina e que o *bolus* de insulina inibe a gliconeogênese hepática (KOWALSKI; BRICE 2014). Para avaliação da sensibilidade à insulina no fígado foi avaliada a produção de glicose hepática a partir de piruvato, um substrato para a gliconeogênese, a qual ocorre predominantemente no fígado. Ambos os animais experimentais mantiveram a responsividade hepática à insulina inalterada, a julgar pelos dados do ipPTT. No entanto, a determinação do conteúdo total da

AKT em fígado revelou redução significativa em ambos os grupos resistentes à insulina (Pred e FruPred). Apesar de ter sido observado redução no conteúdo total da AKT hepática não tivemos sucesso em quantificar a fosforilação dessa cinase, assim não podemos afirmar prejuízos sobre essa via de sinalização. Esses dados indicam que o fígado pode ter sua via insulínica afetada num momento mais tardio e que talvez a disfunção inicial seja no tecido adiposo ou músculo (MOTTA *et al.*, 2015). É válido salientar que os testes funcionais (ipPTT e oGTT) foram realizados a 2 e 1 semanas da eutanásia, respectivamente, o que pode não refletir a tolerância desses animais aos 90 dias de tratamento.

A análise do conteúdo total e fosforilado da AKT em tecido adiposo não foi alterado pelo tratamento com frutose e prednisolona. É importante salientar que a determinação do conteúdo proteico foi realizada em amostras provenientes de animais jejuados e numa condição não estimulada, o que pode mascarar o impacto sobre a via de sinalização da insulina. Além disso, não avaliamos o conteúdo proteico dessa cinase em músculo, onde a captação de glicose também é insulino-responsiva. Em condições de RI induzida por GC, a redução na fosforilação de proteínas da via de sinalização da insulina em tecido adiposo e músculo é demonstrada por vários autores, especialmente na condição estimulada por insulina (SAAD *et al.*, 1993; BURÉN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2015). No entanto, a redução na sensibilidade à insulina observada em nosso modelo experimental parece não ser deletéria até o momento, já que o pâncreas parece participar com as compensações funcionais necessárias para a manutenção da homeostase glicêmica.

Após a consolidação de um modelo com características de SM (FruPred), investigamos se haveria alguma associação entre a redução da sensibilidade à insulina com o aumento do conteúdo de proteínas envolvidas em vias pró-inflamatórias. Como resultado, o conteúdo de nenhuma das proteínas investigadas (JNK, c-JUN, NFκBp65-p52 e TLR4) foi alterada nos tecidos analisados. Em humanos obesos, a RI esta associada com aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-α e IL-6 e infiltração de macrófagos em tecido adiposo (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMEN 1993; HEILBRONN; CAMPBELL 2008). Em modelos experimentais de RI induzida por dieta rica em gordura ou em frutose, é possível observar o aumento na expressão tecidual e nas concentrações circulantes dessas citocinas, bem como o aumento na expressão das cinases JNK, NFκB, IKK e do receptor TLR4 em tecido adiposo e/ou fígado (HIROSUMI, 2001;

HOTAMISLIGIL, 2003; FINUCANE *et al.*, 2014; AMINE *et al.*, 2016; KELANY *et al.*, 2016). No entanto, apesar do incremento na adiposidade e da redução na sensibilidade à insulina observada no nosso modelo experimental, ele não foi robusto o suficiente para promover alterações nos conteúdos proteicos e provavelmente em citocinas pró-inflamatórias (não analisadas aqui no presente trabalho) que explicasse a redução na sensibilidade periférica. Sendo assim, sugerimos que a redução na sensibilidade à insulina, promovida principalmente por efeito do GC pode ser resultado de outros parâmetros não analisados, tais como: *i*) a influência das PKCs atípicas, as quais são ativadas por mediadores lipídicos presentes no quadro dislipidêmico e *ii*) a influência negativa da proteínas PTEN e da MKP-3 (RAFACHO; NUNES; BORDIN 2015).

A fim de avaliar o impacto dos GC tanto exógeno quanto endógeno, determinamos o conteúdo proteico do GR e da enzima 11- β HSD1 em tecido adiposo e fígado, respectivamente. O conteúdo de ambas as proteínas permaneceu inalterado após as 12 semanas de tratamento. É sabido que os GC promovem infra-regulação em seus respectivos receptores, o que pode ser um mecanismo protetor dos efeitos deletérios da exposição prolongada ou das altas concentrações do hormônio (BURNSTEIN; CIDLOWSKI 1992). O fato de não haver redução no conteúdo do GR nos animais que receberam prednisolona pode indicar que as concentrações administradas não foram elevadas o suficiente para promover tal efeito. No entanto, isso pode corroborar para a ampliação das ações negativas dos GCs, uma vez que as ações mediadas tanto pelo GR quanto pela enzima 11 β -HSD1 (biodisponibilidade endógena) não estariam completamente suprimidas.

Para verificar se houve alguma alteração na sinalização inflamatória no hipotálamo, quantificamos o conteúdo do NF κ Bp65 e do receptor TLR4. Tem sido demonstrado que em contextos de dislipidemia induzido por dieta, especialmente o aumento dos ácidos graxos saturados, pode induzir uma resposta inflamatória no hipotálamo, levando a um progressivo prejuízo nos neurônios que controlam a ingestão alimentar e gasto energético, e então, predispondo a obesidade (MILANSKI *et al.*, 2009; VELLOSO, SCHWARTZ 2011; ARAUJO *et al.*, 2016). De acordo com os nossos dados, o conteúdo proteico do NF κ Bp65 e do TLR4 hipotalâmico não foi alterado em nenhum grupo experimental, o que vai ao encontro da ausência de alterações no comportamento alimentar desses animais, a julgar pela ingestão calórica similar entre ambos os grupos, como descrito anteriormente. Esses dados indicam que após 90 dias de tratamento, as alterações metabólicas

encontradas no nosso modelo experimental não foram acompanhadas por prejuízos aparente no hipotálamo.

Modulo II. Suplementação com óleo de peixe

No presente trabalho, foi demonstrado que os efeitos promovidos pela suplementação com óleo de peixe no modelo experimental envolvem: 1) atenuação das concentrações de triacilglicerol plasmáticos, 2) redução no conteúdo de glicogênio hepático, 3) redução das concentrações plasmáticas de ácido úrico e 4) incremento no estresse oxidativo hepático. Não houve influências sobre os demais parâmetros metabólicos e murinométricos, e sobre os alvos moleculares quantificados.

Após suplementar os ratos FruPred por 6 semanas com óleo de peixe verificamos a incorporação dos ácidos graxos *n-3* em hemácias, levando-se em consideração que é um marcador de longo prazo. Foi observado aumento na proporção dos ácidos graxos *n-3* EPA e DHA e do ácido graxo *n-7* palmitoleico, além de redução do AA, validando o efeito da suplementação sobre o perfil de ácido graxos.

Em relação aos parâmetros de caracterização do modelo experimental FruPred, a suplementação não teve influencia sobre o ganho de peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e calórica, bem como sobre as concentrações de albumina plasmáticas e adiposidade abdominal. No trabalho realizado por Yamazaki e colaboradores (2011), a suplementação de ratos obesos com óleo de peixe (1 g/Kg/dia por 4 semanas) também não influenciou nenhum destes parâmetros. Esses autores reforçam o impacto positivo dos *n-3* sobre o perfil lipídico e sensibilidade à insulina. Além disso, esses dados são corroborados por outros trabalhos produzidos em nosso grupo pesquisa, onde a suplementação com óleo de peixe (1 g/Kg/dia por 4 semanas) em animais tratados com frutose (10% e 30% por 60 dias) não impactou sobre a adiposidade e outros parâmetros murinométricos analisados (Sulis e colaboradores 2016; dados ainda não publicados).

A suplementação com o óleo de peixe *per se* está associada ao aumento nas concentrações de albumina plasmática. A albumina é a proteína mais abundante no plasma, correspondente a 50-60% das proteínas séricas totais. Essas proteínas transportam muitas substâncias, entre as quais os ácidos graxos. Essa ligação e transporte contribuem para a solubilização e distribuição dos ácidos graxos em diferentes tecidos (PAVICEVIC *et al.*, 2014). Além disso, os níveis circulantes de albumina podem ser utilizados para indicar a função hepática. Lee e

colaboradores (2009) demonstraram que crianças com doença hepática suplementadas com óleo de peixe apresentaram redução nos níveis de triacilglicerol hepático com paralelo aumento nos níveis circulantes de albumina. Esses autores discutem que a albumina poderia refletir uma melhora da função de biossíntese hepática, que junto à melhora no perfil lipídico apontam para os benefícios do óleo de peixe sobre os processos hepáticos. Outro ponto a ser considerado, é que com o aumento da carga de ácidos graxos a partir da suplementação ocorra um aumento paralelo nas proteínas transportadoras dessas substâncias.

O efeito dos *n-3* sobre o perfil lipídico é bem estabelecido na literatura. Em nosso modelo foi possível observar que o óleo de peixe promoveu atenuação das concentrações de triacilglicerol circulante após 45 dias de suplementação, sem alterar o conteúdo de gordura hepática. Esse resultado indica que o *clearance* de triacilglicerol pode ser devido a maior β -oxidação em tecido adiposo e/ou aumento na expressão das lipoproteínas lipases, permitindo maior captação de ácidos graxos pelos adipócitos (CONIGLIO 1992; BACKES *et al.*, 2016), sem modular majoritariamente as funções hepáticas no grupo FruPredOp. Esse resultado pode ser corroborado pela redução no conteúdo proteico da AMPK hepática observada no grupo FruPred e pela ausência de efeito do óleo de peixe sobre esse parâmetro, contribuindo para deposição de gordura hepática. Outro ponto a ser considerado é que os animais FruPredOp não apresentaram hiperurecemia. Embora a síntese de ácido úrico colabore para a deposição de gordura hepática, esse não parece ser o principal fator envolvido com essa via, uma vez que mesmo sem hiperurecemia os ratos FruPredOp ainda apresentaram aumento no conteúdo de gordura hepática. Um estudo realizado com indivíduos saudáveis submetidos ao tratamento com óleo de peixe por 8 semanas promoveu expressiva redução nos níveis circulantes de ácido úrico quando comparado ao estado basal (HUANG *et al.*, 2015). Os mecanismos envolvidos na redução do ácido úrico pelos *n-3* não estão esclarecidos e são escassos os trabalhos com essa abordagem na literatura.

Um importante mecanismo de ação dos *n-3* se dá por meio da modulação dos fatores de transcrição PPARs. O PPAR γ é um potente estimulador do estoque de ácidos graxos no tecido adiposo, uma vez que aumenta a capacidade de estoque e o influxo de ácidos graxos nos adipócitos (FERRÉ, 2004), o que pode contribuir para redução do triacilglicerol plasmático. A quantificação proteica do PPAR γ não foi alterada por efeito da suplementação em nosso modelo. Apesar da constatação da incorporação dos *n-3*, o conteúdo de PPAR γ parece não

ser modulado pela quantidade de *n-3* incorporados. Isso pode indicar que a contribuição do PPAR γ para a redução do conteúdo de triacilglicerol plasmático pode ocorrer sem o aumento no seu conteúdo proteico. Além disso, não mensuramos a ativação do PPAR γ , então não podemos excluir a hipótese de que o efeito dos *n-3* foi mediado por maior ativação. De forma semelhante, a atenuação das concentrações circulantes de triacilglicerol ocorreu independentemente de aumento do conteúdo proteico do PPAR γ em ratos suplementados com óleo de peixe (1 g/Kg por 15 dias) (BARBOSA *et al.*, 2016).

É sabido que a suplementação com óleo de peixe pode aumentar o prejuízo lipoxidativo devido à alta quantidade de ácidos graxos insaturados incorporados na membrana (VIGERUST *et al.*, 2012). Os AGPI são mais suscetíveis ao ataque por radicais livres do que os AGS, potencializando a peroxidação lipídica (PAMPLONA, 2008). No entanto, alguns trabalhos sugerem que os *n-3* podem reduzir o estresse oxidativo, especialmente por aumentar as defesas antioxidantes (ASSIS *et al.*, 2012; VALENZUELA *et al.*, 2012). Valenzuela e colaboradores (2012) demonstraram que a suplementação com *n-3* na ração de camundongos obesos promoveu redução do conteúdo de gordura hepática com concomitante aumento da resposta antioxidante. Esses resultados são corroborados por Hirotani *et al.* (2015), a partir da suplementação com EPA (1 g/Kg por 6 semanas) em camundongos obesos. De fato, a suplementação com óleo de peixe no grupo controle (Op) foi capaz de aumentar a atividade da SOD sem alterar o conteúdo de hidroperóxidos lipídicos, promovendo a manutenção desses marcadores de estresse oxidativo. Em um contexto de aumento da sobrecarga de lipídios hepática promovida pela combinação FruPred aliada ao aumento de AGPI (FruPredOp), houve incremento na peroxidação lipídica e paralela redução na atividade antioxidante da SOD. Nesse caso, a sinergia de ambos os tratamentos resultou na redução da SOD, que não foi capaz de compensar o aumento do estresse oxidativo. Em modelos de obesidade induzido por dieta rica em gordura tem sido observado redução na atividade da SOD e da glutatona (HIROTANI *et al.*, 2015) assim como em modelos de esteatose hepática (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2013), revelando que frente a dado insulto os mecanismos de defesa antioxidantes não conseguem compensar o aumento das ROS e são infra-regulados. Em nosso modelo, a suplementação com óleo de peixe enriquecido em *n-3* não é o principal responsável pelo aumento do estresse oxidativo, mas sim pela maior suscetibilidade em um contexto onde já se tem aumento de substratos para peroxidação de lipídios.

A suplementação dos animais FruPred com óleo de peixe também promoveu redução no conteúdo de glicogênio hepático, contrapondo os efeitos da frutose. Hein e colaboradores (2012) demonstram que o mecanismo de restauração do conteúdo de glicogênio hepático mediado por *n-3* se deve a normalização da atividade da glicogênio sintase (GS). Após 6 meses da ingestão de uma dieta em rica sacarose os animais apresentaram aumento no conteúdo de glicogênio hepático e da atividade da GS e da glicose-6-fosfatase. A partir da ingestão de *n-3* na dieta por duas semanas foi possível observar a restauração de todos esses parâmetros alterados (HEIN; CHICCO; LOMBARDO 2012; BIZEAU; PAGLIASSOTTI 2005).

O efeito dos *n-3* sobre a sensibilidade à insulina tem sido previamente demonstrado, no entanto esse efeito parece ser dependente do contexto experimental, da quantidade de *n-3* e do tempo de administração. Quando o óleo de peixe é substituído por um terço da fração de lipídios da dieta, a RI parece ser prevenida em modelos experimentais com dieta rica em gordura (STORLIEN *et al.*, 1987; 1991). Em contextos onde a RI já está instalada o efeito dos *n-3* parece ser menos robusto ou ausente, de acordo com o tempo de suplementação (1 g/Kg por 15 dias ou 10% da dieta com EPA por 9 semanas) (GILLAM *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2016; CORPOREAU *et al.*, 2016). Em nosso modelo experimental, a RI observada no grupo FruPred não foi alterada por efeito do óleo de peixe, assim como o conteúdo proteico da AKT em fígado e tecido adiposo. Esses dados indicam que a suplementação com óleo de peixe utilizada em nosso modelo não foi suficiente para promover a melhora da sensibilidade à insulina, que pode ser devido à dose, tempo de administração ou contexto experimental.

As ações anti-inflamatórias do EPA e DHA têm sido bem documentadas na literatura. Essas ações podem ser mediadas através do PPAR γ , do receptor acoplado a proteína G (GPR120) e da atenuação do conteúdo do receptor TLR2-6, ambas as vias promovem inibição do NF κ B e da JNK (KALUPAHANA *et al.*, 2011; CALDER, 2015). Em camundongos obesos a suplementação com óleo de peixe (4, 8 ou 16 mg/Kg por 4 semanas) promoveu redução da expressão do NF κ Bp65 e do TLR4 em tecido adiposo e das citocinas TNF α , IL1- β e IL-2 (BASHIR *et al.*, 2016). Esses resultados são corroborados por uma série de estudos *in vitro* com adipócitos (CALDER, 2009; 2015). Embora a suplementação com *n-3* pareça ter ações anti-inflamatórias, não pudemos avaliá-las uma vez que não houve qualquer alteração aparente sobre os alvos pró-inflamatórios analisados no nosso modelo

experimental FruPred. Vale ressaltar, que os efeitos dos *n-3* destacados na literatura parecem ser atenuadores sobre o perfil inflamatório em um contexto onde a inflamação de baixo grau já é consolidada (p.e. obesidade, artrite) ou induzida (p.e. LPS).

Módulo III. Acompanhamento dos parâmetros após a interrupção dos tratamentos

A interrupção dos tratamentos do modelo experimental envolvem: 1) recuperação do ganho de peso corpóreo, 2) redução da massa de tecido adiposo marrom, 3) normalização das concentrações de triacilglicerol plasmático, 4) normalização do conteúdo de gordura hepática, 5) normalização da hiperurecemia, 6) redução de marcadores de estresse oxidativo hepáticos, 7) redução da insulinemia e melhora na sensibilidade periférica à insulina com 8) normalização do conteúdo proteico da AKT (fígado) e da AMPK (tecido adiposo). Além desses dados, novas características moleculares foram encontradas, tais como o aumento na fosforilação da AKT e no conteúdo do GR em tecido adiposo e do NFκBp65 em hipotálamo.

A constatação de que a administração combinada de frutose e prednisolona impactam sobre o ganho de peso corpóreo é plausível, uma vez que a retirada desses insultos promoveu a recuperação imediata do ganho de peso nos animais do grupo Rev. Esse parâmetro foi acompanhado da reversão entre o consumo de ração e de água potável e do mesmo balanço calórico inicial. No entanto, 90 dias após a interrupção dos tratamentos houve redução no balanço calórico total. Considerando o desenvolvimento e avanço na idade desses animais essa pode ser uma característica inerente ao metabolismo. Thomas e colaboradores (2002) observaram que com a senescência ocorre redução no consumo energético e aumento na suscetibilidade ao ganho de peso, especialmente por aumento nos depósitos de gordura em roedores. De fato, o grupo Rev manteve o aumento da gordura abdominal total mesmo após a retirada dos tratamentos e normalização do conteúdo proteico da AMPK, o que pode ser um efeito da idade. O incremento no conteúdo relativo de tecido adiposo marrom do grupo FruPred, foi normalizado nos ratos Rev. Como esse depósito de gordura parece não ser influenciado pela idade (THOMAS *et al.*, 2002), esse resultado indica a adaptação do organismo frente aos insultos e que a redução nesse tecido pode contribuir, pelo menos parcialmente, para o ganho de peso.

A normalização das concentrações plasmáticas de triacilglicerol, ácido úrico e do conteúdo de gordura hepática foi observada nos animais do grupo Rev. Esses dados confirmam a inter-relação entre esses fatores, promovidos pela combinação FruPred, que contribuem para a deposição de gordura hepática. Além disso, a associação entre a redução do conteúdo da AMPK hepática com a deposição de gordura parece não ser decisiva nesse contexto, uma vez que mesmo após a reversão desses parâmetros metabólicos o conteúdo proteico da AMPK hepática continua similar ao do grupo FruPred. Ainda, a associação da sobrecarga hepática de lipídios com o aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos parece ser verdadeira, pois a partir da normalização do perfil lipídico no grupo Rev houve paralela redução desses marcadores de estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante da SOD, embora a catalase ainda tenha permanecido reduzida. O conteúdo de glicogênio hepático que se mostrou elevado no grupo FruPred também encontrou-se elevado no grupo Rev. No entanto, apesar da maioria das características hepáticas serem transientes, não podemos descartar o fato de que esses resultados são em relação aos animais FruPred (4 meses de idade) e não houve um grupo controle paralelo ao grupo Rev (7 meses de idade), para a interpretação do efeito aditivo da idade.

Modelos experimentais de SM são constantemente explorados na literatura, assim como estratégias de intervenção na tentativa de atenuar ou reverter os efeitos adversos, porém são escassas as abordagens que verificam se o modelo é transiente ou permanente. Rafacho e colaboradores (2010) observaram que as alterações funcionais e morfológicas das ilhotas pancreáticas induzidas pelo tratamento com DEX (1 mg/Kg por 5 dias) foram normalizadas após 10 dias do término do tratamento. Posteriormente, esses resultados de reversibilidade da hiperinsulinemia e hiperglicemia e paralela normalização da fosforilação da AKT foram corroborados por Fransson e colaboradores (2013), em um modelo de SM induzida por corticosterona na água de beber em camundongos. Em nosso modelo, o tratamento crônico com frutose e prednisolona promoveu redução na sensibilidade à insulina com a resposta hiperinsulinêmica compensatória. Após a interrupção dos tratamentos, em especial do efeito do GC sobre a sensibilidade periférica, a demanda pela insulina provavelmente diminuiu e então a compensação pancreática (a julgar pela insulinemia reduzida no grupo Rev) foi devidamente reajustada, adaptando-se a nova demanda metabólica. Além disso, o conteúdo proteico da AKT total em fígado foi

reestabelecido (houve redução no grupo FruPred), o que poderia contribuir para a melhora da sensibilidade à insulina.

Contudo, novas características foram encontradas no grupo Rev, como o aumento do conteúdo proteico da AKT fosforilada em treonina 308 e do conteúdo do GR em tecido adiposo e do NFκBp65 em hipotálamo. A AKT é uma cinase chave na via de sinalização da insulina, sendo fosforilada em resíduos de treonina 308 pela PDK1. Para a completa ativação, a AKT também precisa ser fosforilada em resíduos serina 473 e então, promove a regulação *downstream* da via de sinalização da insulina (MANNING; CANTLEY 2007). A redução na sensibilidade à insulina dos animais FruPred não foi acompanhada por alterações na fosforilação da AKT, no entanto nos animais Rev o conteúdo proteico dessa cinase foi aumentada. Isso nos levou a pensar em duas possibilidades: *i*) o conteúdo de AKT fosforilada em animais mais velhos pode ser maior do que em animais mais jovens, uma vez que não mantivemos um grupo controle para a idade ou *ii*) esse pode ser um efeito compensatório tardio, o que permitira uma maior sensibilidade aos efeitos da insulina. Embora não tenhamos realizado o ITT nesses animais, a interpretação do cálculo HOMA-IR demonstrou a melhora deste parâmetro. Vale lembrar que a ativação da AKT em tecido adiposo não está envolvida apenas com respostas metabólicas, mas também com proliferação e sobrevida, então não podemos descartar a hipótese da infra-regulação de outras vias (MANNING; CANTLEY 2007). De forma semelhante, houve aumento no conteúdo proteico do GR, o que poderia indicar uma suprarregulação compensatória tardia após a interrupção do tratamento crônico. O NFκB, como discutido nas seções anteriores, está envolvido com a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, exacerbadas no contexto obesogênico. A quantificação das proteínas envolvidas com vias pró-inflamatórias não revelou qualquer alteração em ambos os grupos imediatamente após o tratamento, mas 90 dias após o término do tratamento houve aumento dessa proteína, o que poderia mais uma vez indicar uma resposta tardia ao contexto de SM. Como os animais não apresentaram qualquer efeito adverso tardio e como não quantificamos os níveis de citocinas nesses animais, não podemos afirmar que essa alteração teve qualquer impacto negativo.

Em suma, a ingestão concomitante de frutose e prednisolona por 90 dias consecutivos promoveu um fenótipo com características de SM, a julgar pelo aumento na adiposidade abdominal, pela hipertriacilgliceridemia, redução na sensibilidade à insulina, deposição de gordura hepática, hiperurecemia e aumento de marcadores de estresse

oxidativo. Tais alterações, contudo, não resultaram em prejuízo na glicemia e tolerância à glicose indicando preservação das funções pancreáticas neste contexto. No mesmo sentido, este conjunto de alterações que tornam o modelo com características de SM não esteve associado à suprarregulação de proteínas envolvidas na sinalização pró-inflamatória em tecido adiposo, fígado e hipotálamo. A suplementação tardia com o óleo de peixe enriquecido em *n-3* foi capaz de atenuar especialmente as alterações observadas no triacilglicerol circulante. Já a interrupção da ingestão de frutose e prednisolona se mostrou muito mais eficiente no reestabelecimento da maioria das alterações metabólicas e moleculares observadas por ação da frutose e prednisolona.

9. CONCLUSÃO

Concluimos que a combinação da ingestão de frutose e de prednisolona compromete o crescimento corpóreo e induz um quadro característico de SM, enquanto a suplementação com OP parece atenuar algumas alterações relacionadas ao metabolismo lipídico. Também concluimos que as alterações metabólicas causadas pela combinação dos insultos são transitórias e normalizadas em sua maioria após a interrupção dos tratamentos. Esses achados alertam para os riscos da associação de uma terapia baseada em GC e o consumo regular de bebidas adoçadas e acrescentam informações alentadoras acerca da plasticidade do organismo e dos benefícios da interrupção dos fatores causais dos efeitos adversos.

10. PERSPECTIVAS

Para pesquisas futuras, restam algumas perguntas que esse trabalho não foi capaz de responder: *i*) quais as proteínas envolvidas com o prejuízo na sinalização da insulina em fígado, músculo e tecido adiposo? *ii*) qual o efeito da combinação FruPred em fêmeas? Será que os efeitos adversos encontrados em machos podem ser generalizados? *iii*) qual o impacto de iniciar a suplementação com óleo de peixe no início do protocolo experimental? Será que seria capaz de prevenir a RI? *iv*) qual o impacto da idade nas novas características encontradas no grupo Rev? São por efeito da senescência ou de uma resposta compensatória tardia? *v*) qual o efeito da substituição da prednisolona

por dexametasona? Será que a administração de um GC sintético mais potente seria capaz de promover hiperglicemia.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, M.H et al. Effects of tempol on altered metabolism and renal vascular responsiveness in fructose-fed rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.41, p.210–218, 2016.

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clin Chemistry**, v.40, p.1707-1712, 1994.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzimol**, v.105, p.121-6, 1984.

AGUILERA, A.A. et al. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**, v.14, p.350-357, 2004.

ALESSI, D.R. et al. Characterization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase balpha. **Curr Biol**, v.7, p.261-269, 1997.

ALZAMENDI, A. et al. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. **Endocrine**, v.35, p.227-232, 2009.

AMINE, H. et al. Odontella aurita-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance. **J Endocrinol**, v.228, p.1-12, 2016.

ANAGNOSTIS, P. et al. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94, p.2692-2701, 2009.

ANDERSEN, G. et al. Dietary Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats. **Ann Nutr Metab**, v. 52, p.250-256, 2008.

ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin Sci**, v.96, p.513-523, 1999.

ARAUJO, E.P. et al. Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. **Eur J Endocrinol**, v.175, p.97-105, 2016.

ASSIS, A.M. Ω Polynsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. **Mol Cell Biochem**, v.361, p. 151-160, 2012.

BACKES, J. et al. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. **Lipids Health Dis**, v.15, p.118, 2016.

BALDWIN, W. et al. Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. **Diabetes**. v.60, p.1258–1269, 2011.

BANG, H.O.; DYERBERG, J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. **Acta Med Scand**, v.192, p.85-99, 1972.

BAR-ON; STEIN. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. **J Nutr**, v.94, p.95–105, 1968.

BARBOSA, A.M. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Appl. Physiol Nutr Metab**, v.41, p.382-390, 2016.

BASHIR, S. et al. Amelioration of obesity associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by Fish oil supplementation. **J Nutr Biochem**, v.33, p.82-90, 2016.

BAYS, H.E. et al. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. **Expert Rev Ther**, v.6, p.391-409, 2008.

BEARD, J.C. et al. Dexamethasone-induced insulin resistance enhances B cell responsiveness to glucose level in normal men. **Am J Physiol**, v.247, p. E592-596, 1984.

BERGMAN, R. et al. Assessment of insulin sensitivity in vivo. **Endocrinol Rev**, v.6, p.45–86, 1985.

BHASWANT, M.; POUDYAL, H.; BROWN, L. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. **J Nutr Biochem**, v.26, p.571-584, 2015.

BIZEAU, M.E.; PAGLIASSOTTI, M.J. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. **Metab Clin Exp**, v.54, p.1189-1202, 2005.

BOCARSLY, M.E. et al. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. **Pharmacol Biochem Behav**, v.97, p.101-106, 2010.

BONNER-WEIR, S. et al. Limited β -cell regeneration deficient rat model: studies with dexamethasone. **Metabolism**, v.30, p.914-918, 1981.

BOUCHER, J. et al. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors are required for normal expression of imprinted genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.111, p.14512-14517, 2014.

BRAY, G.A. et al. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **Am J Clin Nutr**, v.79, p.537-543, 2004.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin. Chem**, v.19, p.476-482, 1973.

BURNSTEIN, K.L.; CIDLOWSKI, J.A. The down side of glucocorticoid receptor regulation. **Mol and Cell Endocrinol**, v.82, p.1-8, 1992.

BURÉN, J. et al. Insulin action and signaling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v.474, p.91-101, 2008.

CALDER, P.C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **J. Nutr**, v.142, p.592S-599S, 2012.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgrad. Med**, v.121, p.148-157, 2009.

CASSUTO, H. et al. Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. **J of Biological Chemistry**, v.280, p.33873–33884, 2005.

CASTRO, M.C. et al. Lipoic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: Role of oxidative stress. **Biochim Biophys Acta Gen**, v.1840, p.1145–1151, 2014.

CHEESEMAN, C.I. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. **Gastroenterology**, v.105, p.1050–1056, 1993.

CORPE, C.P. et al. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v.28, p.364–374, 1999.

CORPOREAU, C. et al. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.290, p.78-86, 2006.

CARMIEL-HAGGAI, M.; et al. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **FASEB J**, v.19, p.136-138, 2005.

CARROLL, M.; KIT, B.; LACHER, D. Trends in elevated triglyceride in adults: United States. **NCHS Data Brief**, v.198, p.1-9, 2015.

CASERTA, D. et al. Metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome: an intriguing overlapping. **Gynecol Endocrinol**, v.30, p.397-402, 2014.

CAVALIERE, G. et al. Polyunsaturated fatty acids attenuate diet induced obesity and insulin resistance, modulating mitochondrial respiratory uncoupling in rat skeletal muscle. **PLoS One**, v.11, e0149033, 2016.

CHOI, J.W. et al. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drink and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis Rheum**, v.59, p.109-116, 2008.

CHONG, M.F. et al. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. **Am J Clin Nutr**, v.85, p.1511-1520, 2007.

CORTEZ-PINTO, H. et al. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. **JAMA**, v.282, p.1659–1664, 1999.

COX, C.L. et al. Consumption of fructose sweetened beverages for 10 weeks reduces net fat oxidation and energy expenditure in overweight/obese men and women. **Eur J Clin Nutr**, v.66, p.201-208, 2012.

DAVIS, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v.103, p.239-252, 2000.

DE-CASTRO, G.S. et al. Dietary Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid Influence Liver Triacylglycerol and Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fructose Diet. **Mar. Drugs**, 13: 1864-1881, 2015.

DELLUC, G. et al. La nutrition préhistorique. **Perigueux**, v.36, p.199-200, 1995.

DEMIRTAS, C.Y. et al. The investigation of melatonin effect on liver antioxidant and oxidant level in fructose-mediated metabolic syndrome model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v.19, p.1915-1921, 2015.

DEMPSTER, D.W. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.4, p.137-141, 1989.

DE SOUZA, C.T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v.146, p. 4192-4199, 2005.

DONNELLY, R. et al. Tissue-dependent activation of protein kinase C in fructose-induced insulin resistance. **Endocrine**, v.3, p.129-133, 1995.

DUMA, D. et al. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. **J steroid Biochem Mol Biol**, v.102, p.11-21, 2006.

DUVEL, K. et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **Mol Cell**, v.39, p.171-183, 2010.

FAEH, D. et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy males. **Diabetes**, v.54, p.1907–1913, 2005.

FARINA, J.P. et al. Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. **Clin. Sci.**, v.125, p.87–97, 2013.

FEEK, C.M. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Clin Endocrinol Metab**, v.12, p.597-618, 1983.

FERRÉ, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. **Diabetes**, v.53, s1, 2004.

FERREIRA, D.S. et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **PLoS One**, v.7, e38795, 2012.

FOLCH, J. et al. Simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v.226, p.497-509, 1957.

FRANSSON, L. et al. β -Cell adaptation in a mouse model of glucocorticoid-induced metabolic syndrome. **J Endocrinol**, v.219, p.231-241, 2013.

FULLERTON, M.D. AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v.27, p.172-180, 2016.

FINUCANE, O.M. et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis, **Plos One**, v.9, e113369, 2014.

GAO, X. et al. *Dioscorea opposita* reverses dexamethasone induced insulin resistance. **Fitoterapia**, v.78, p.12- 15, 2007.

GE, C.X. et al. Betaine prevented fructose-induced NAFLD by regulating LXR α /PPAR α pathway and alleviating ER stress in rats. **Eur. J. Pharmacol**, v.770, p.154–164, 2006.

GERGELY, P. et al. Effect of fructose 1-phosphate on the activation of liver glycogen synthase. **Biochem J.**, v.15, p.133-137, 1985.

GILLAM, M. et al. Improved n-3 fatty acid status does not modulate insulin resistance in fa/fa Zucker rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.81, p.331-339, 2009.

GONZALEZ-PERIZ, A. et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **FASEBJ**, v.23, p.1946-1957, 2009.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 95, p. 3347-3351, 2010;

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev.**, v.18, p.2195-2224, 2004.

HARRIS, W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. **J Lipid Res**, v.30, p.785-807, 1989.

HEDENGRAN, A. et al. N-3 PUFA esterified to glycerol or as ethyl esters reduce non-fasting plasma triacylglycerol in subjects with hypertriglyceridemia: a randomized trial. **Lipids**, v.50, p.165-175, 2015.

HEIN, G.J.; CHICCO A.; LOMBARDO, Y.B. Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet. **Lipids**, v.47, p.141-150, 2012.

HEILBRONN, L.K.; CAMPBELL, L.V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Current pharmaceutical design**, v.14, p.1225-1230, 2008.

HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v.420, p.333-336, 2002.

HIROTANI, Y. et al. Effects of eicosapentaenoic acid on hepatic dyslipidemia and oxidative stress in high fat diet-induced steatosis. **Int J Food Sci Nutr.**, v.66, p.569-573, 2015.

HOES, J.N. et al. High incidence rate of vertebral fractures during chronic prednisone treatment, in spite of bisphosphonate or alfacalcidol use. Extension of the alendronate or alfacalcidol in glucocorticoid-induced osteoporosis-trial. **Clin Exp Rheumatol**, v.28, p.354-359, 2010.

HORTON, J.D. et al. Regulation of sterol regulatory and their element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proc Natl Acad USA**, v.95, p.5987-5992, 1998.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int J Obes Metab Disord**, v.27, S53-5, 2003.

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

HUANG, T. et al. Effect of vitamin B-12 and n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma homocysteine, ferritin, C-reaction protein, and other cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial. **Asia Pac J Clin Nutr**, v.24, p.403-411, 2015.

HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**. v.10, p.512-516, 1987.

IBRAHIM, S.M. et al. Geraniol, alone and in combination with pioglitazone, ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats via the modulation of both inflammatory and oxidative stress status. **PLoS ONE**. v.10, e0117516, 2015.

INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. 2006.

INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES. Diabetes: facts and figures. IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Poster Update, 2015.

JOHNSON, R. J. et al. Sugar, uric acid and the etiology of diabetes and obesity. **Diabetes**. v.62, p.3307-3315, 2013.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN G. I. Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance. **Cell Metab.** v.15, p.574-584, 2012.

KAJITA, K. et al. Glucocorticoid-induced insulin resistance associates with activation of protein kinase C isoforms. **Cell Signal.** v.13, p.169-175, 2001.

KALUPAHANA, N. S. et al. (n-3) fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv Nutr.** v.2, p.304-316, 2011.

KARIN, M. DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NFkappaB: key elements of proinflammatory signaling. **Seminars in immunology**, v.12, p.85-98, 2000.

KARLSSON, S. et al. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pancreas**, v.22, p.148-156, 2001.

KATAN, M.B. et al. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesterol esters, erythrocyte membranes and adipose tissue: an 18 month controlled study. **J Lipid Res**, v.38, p.2012-2022, 1997.

KARATSOREOS, I. N. et al. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. **Endocrinology**, v.151, p.2117-2127, 2010.

KELANY, M. E.; HAKAMI T. M.; OMAR A. H. Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose-diet-fed rats: role of TNF- α , NF κ B, and oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**, v.17, p.1-11, 2016.

KING, A.; BOWEL, J. Animal model for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochem Pharmacol**, v.99, p.1-10, 2016.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v.41, p.1313-1321, 2005.

KLIEWER, S.A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.18-23, 1997.

KOTELEVTSSEV, Y. et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.23, p.14924-14929, 1997.

KOEK, G.H.; LIEDORP, P.R.; BAST, A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Chimica Acta**, v.412, p.1297-1305, 2011.

KOWALSKI, G.M.; BRUCE C.R. The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.307, p.859-871, 2014.

LANASPA, M.A. et al. Uric acid and metabolic syndrome: what is the relationship? **Curr Rheum Rev.**, v.7, p.162–169, 2011.

LANASPA, M.A. et al. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. **J Biol Chem.**, v.287, p.40732–40744, 2012.

LANGE, A.J. et al. Isolation of a cDNA for the catalytic subunit of rat liver glucose-6-phosphatase: regulation of gene expression in FAO hepatoma cells by insulin, dexamethasone and cAMP. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.201, p.302-309, 1994.

LAI, W. et al. 11 β -HSD1 modulates LPS-induced innate immune responses in adipocytes by altering expression of PTEN. **Mol Endocrinol**, v.29, p.558-570, 2015.

LEE, J.Y. et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor. **The J Biol Chem**, v.276, p.16683-16689, 2001.

LEE, S.II. The impact of fish oil-based lipid emulsion on serum triglyceride, bilirubin, and albumin levels in children with parenteral nutrition-associated liver disease. **Pediatr Res.**, v.66, p.698-703, 2009.

LEIBOWITZ, A. et al. Role of T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of high-fructose diet-induced metabolic syndrome. **Hypertension**, v.61, p.1316-132, 2013.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-78, 1990.

LINNEMANN, A.K.; BAAN, M.; DAVIS, D.B. Pancreatic β -cell proliferation in obesity. **Adv Nutr.**, v.15, p.278-288, 2014.

LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. **J Nutr Biochem**, v.17, p.1-13, 2006.

LO, S.; RUSSEL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol**, v.28, p.234-236, 1970.

LOW, S.C. et al. Liver-type 11- β hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells. **J MOL Endocrinol**, v.13, p.167-174, 1994.

LU, M. et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. **Nat Med**, v.18, p.388-395, 2012.

LUO, J. et al. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistance rats: relation to membrane fatty acids. **J Nutr**, v. 126, p.1951-1958, 1996.

MACAULAY, K. et al. Glycogen synthase kinase 3 α -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. **Cell Metab**, v.6, p.329-337, 2007.

MAHMOUD; ELSHAZLY. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. **PLoS ONE**, v.9: e106993, 2014.

MAIZTEGUI, B. et al. Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. **Clin. Sci.**, v.120, p.73–80, 2011.

MAMIKUTTY, N. et al The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. **Biomed Res Int**, v.263897, 2014.

MANGELSDORF, D.J. et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. **Cell**, v.83, p.835-839, 1985.

MANNING, B.B.; CANTLEY, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**. v.129, p.1261-1274, 2007.

MANOLAGAS, S.C.; WEINSTEIN, R.S. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.14, p.1061-1066, 1999.

MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, p. 412-419, 1985.

MARSHALL; KOOI. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. **Science**, v.125, p.648-649, 1957.

MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem**, v.47, p.469-474, 1974.

MARTÍNEZ, B.B. et al. Experimental model of glucocorticoid-induced insulin resistance. **Acta Cir Bras**, v.10, p.645-649. 2016.

MASMIQUEL, L. et al. LEADER 5: prevalence and cardiometabolic impact of obesity in cardiovascular high-risk patients with type 2 diabetes mellitus: baseline global data from the LEADER trial. **Cardiovasc Diabetol**, v.10, p.15-29, 2016.

MASUZAKI, H. et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v.294, p.2166-2170, 2001.

- MAYES, P.A. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr.**, v. 58, p. 754s-765s, 1993.
- MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. **Proc Nutr Soc.**, v.57, p.277-282, 1998.
- MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**, v.29, p.359–370, 2009.
- MOTTA, K, et al. JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.145, p.1-12, 2015.
- NISHIYAMA-NARUKE, A. et al. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v.31, p.2565-2576, 1998.
- NOVAK, A. et al. Fructose-induced metabolic syndrome decreases protein expression and activity of intestinal P-glycoprotein. **Nutrition**. v.31, p.871-876, 2015.
- NOVELLI, M. et al. Free fatty acids as mediators of adaptive compensatory responses to insulin resistance in dexamethasone-treated rats. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, p.155-164, 2008.
- NOURROOZ-ZADEH, J; TAJADDINI-SARMADI, J; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal Biochem**, v.220, p.403-409, 1994.
- NUNES, E.A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.38, p.1-10, 2013.
- OAKLEY, R.H. et al. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor α isoform. Specificity and mechanisms of actions. **J Biol Chem**. v.274, p.27857-27866, 1999.

OGAWA, A. et al. Roles of insulin resistance and b-cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. **J Clin Invest.** v.90, p.497–504, 1992.

OLEFSKY, J.M. et al. The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. **Metabolism.** v.24, p.527, 1975.

OZCAN, U. et al. Endoplasmatic reticulum stress links obesity, insulin action and type 2 diabetes. **Science**, v.306, p.457-461, 2004.

OZES, O.N. et al. A phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.4640-4650, 2001.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. **Bioch et Bioph Acta**, v.1777, p.1249-1262, 2008.

PARKS, E.J. et al. Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspectives and review of biological mechanisms. A, **J Clin Nutr**, v.71, p.412-433, 2000.

PAVICEVIC, I. et al. Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.42-50, 2014.

PETERSONS, C.J. et al. Effects of low-dose prednisolone on hepatic and peripheral insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal adiposity in patients with inflammatory rheumatologic disease. **Diabetes Care**, v.36, p.2822–2829.

PEYRON-CASO, E. et al. Regulation of glucose transport and transporter 4 (Glut-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of n-3 poly- and monounsaturated fatty acids. **Horm Metab Res**, v.34, p.362– 366, 2002.

PRELOVSEK, O. et al. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the

precursors of human muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.291, p.1651-1656, 2006.

PROTZEK, A.O. et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 155, p.1-8, 2016.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36, p.284-293, 2008.

RAFACHO, A. et al. The adaptative compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiol**, v.200, p.223-255, 2010.

RAFACHO, A. et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. **Hormone and Metabolic Research**. v.43, p.275–281, 2011

RAFACHO, A.; NUNES, A.; BORDIN, S. How much we know about the attenuation of insulin signaling in the adipose tissue caused by glucocorticoid treatment?. **Inflammation & Cell Signaling**, v.2, e879, 2015.

ROCKALL, A. et al. Computed tomography assessment of fat distribution in male and female patients with Cushing's syndrome. **Eur J Endocrinol**, v.149, p.561-567, 2003.

ROJAS, F.A. et al. Regulation of insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation in animal models of insulin resistance. **Endocrine**, v.21, p.115-122, 2003.

ROSSMEISL, M. et al. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. **Inter J of Obesity**, v.28, p.38-44, 2004.

RUTLEDGE, A.C.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutr Rev**, 2007; v.65, p.13–23, 2007.

SAAD, M.J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clin Invest.**, v.92, p.2065 – 2071, 1993.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SARBASSOV, D.D. et al. Phosphorylation and regulation of AKT/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v.307, p.1098-1101, 2005.

SCHMIDT, E.B. et al. The effects of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.103, p.107-121, 1996.

SCHOONJANS, K. et al. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v.1302, p.93-109, 1996.

SCHACKE, J.P. et al. Mechanisms involve in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther.**, v.96, p.23-43, 2002.

SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. **American Journal of Physiology**, v.275, p.E806–E813, 1998.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.283, p.e367-373, 2002.

SERHAN, C.N. et al. Novel functional sets of lipids-derived mediators with anti-inflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. **J Exp Med**, v.192, p.1197-1204, 2000.

SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, p.1023-1033, 2007.

SMITH, B.K. et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.311, p.730-740, 2016.

SHAHRAKI, M.R. et al. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of Tamarindus indica seed. **Acta Med. Iran.**, v.49, p.277–283, 2011.

SHELUDIAKOVA, A.; ROONEY, K.; BOAKES, R.A. Metabolic and behavioral effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. **Eur J Nutr**, v.51, p.445-454, 2012.

SIMMONS, P.S. et al. Increased proteolysis. An effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range. **J Clin Invest.**, v.73, p.412-420, 1984.

SOFTIC, S.; COHEN D.E.; KAHN, C.R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. **Dig Dis Sci.**, v.61, p.1282-1293, 2016.

STAHN, C; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomis effects of glucocorticoids. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v.10, p.525-533, 2008.

STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. **Curr Opin Lipidol**, v.19, p.16-24, 2008.

STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J Clin Invest.** v.119, p.1322–1334, 2009.

STOJANOVSKA, L. et al. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. **Am J Physiol.** v.258, p.748-756, 1990.

STORLIEN, L.H. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. **Diabetes**, v.40, p.280-289, 1991.

STORLIEN, L.H. et al. Fish oil prevents insulin resistance induced by high fat feeding in rats. **Science**, v.237, p.885-888, 1987.

SUZUKI, H. et al. Does multifrequency bioelectrical impedance relate to body composition: **J Surg Reser**, v.65, p.63-69, 1996.

SWARBRICK, M.M. et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. **Br J Nutr**. v.100, p.947-952, 2008.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Int J Mol Sci**, v.14, p.20704-20728, 2013.

TAKAMI, Y. et al. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfenylchloride isotope labeling method. **Hepatol Res**, v.40, p.438-450, 2010.

TAPPY, L.; LE, K. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. **Physiol Rev.**, v.90, p.23-46, 2010.

TIMSIT, J. et al. Searching for Maternity-Onset Diabetes of the Young (MODY): When and What for?. **Can J Diabetes**, v.40, p.455-461, 2016.

THOMAS, M.A. et al. Effects of aging on food intake and body composition in rats. **Physiology & Behavior**, v.76, p.487-500, 2002.

TOPPING, D.L.; MAYES, P.A. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, and lipogenesis and carbohydrate metabolism. **Biochem J.**, v.126, p.295-311, 1972.

TOOP, C. R.; GENTILI, S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v.8, p.577, 2016.

TOPETE; CIDLOWSKI. One hormone, two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v.22, p.20-32, 2015.

TORNHEIM, K; LOWENSTEIN, J. M. Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP and citrate. **J Biol Chem.**, v.251, p.7322-7328, 1976.

TURBAN, S.; HAJDUCH, E. et al. Potein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. **FEBS Lett.**, v.585, p.269-274, 2011.

VALENZUELA, R. et al. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid asupplementation significant reduced liver oxidative stress in high fat induced steatosis. **PLoS One**, v.7, e46400, 2012.

VANDEN-BERGHE, W. et al. A paradigm for gene regulation: inflammation, NFkappaB and PPAR. **Adv Exp Med Biol.**, v.544, p.181-196, 2003.

VAN GREEVENBROEK, M.M. et al. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances. **F1000Res**, v.13, 2016.

VAN RAALTE, D.H. et al. Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of beta-cell function in healthy men. **Eur J Endocrinol**, v.162, p.729-735, 2010.

VELLOSO, L.A.; FOLLI, F.; SAAD, M.J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation. **Endocr Rev.**, v.36, p.245-271, 2015.

VELLOSO, L.A. SCHWARTZ, M.W. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **Int J Obesity**, v.35, p.1455-1465, 2011.

VIGERUST, A.F. et al. Fish oil and 3-thia fatty acid have additive effects on lipid metabolism but antagonistic effects on oxidative damage when fed to rats for 50 weeks. **J of Nutr Biochem.**, v.23, p.1384-1393, 2012.

YAMAZAKI, R.K. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistance MSG-obese rats. **Lipids in health and Disease**, v.10, p.66, 2011.

YUAN, M. et al. Reversal of obesity-and-diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v.293, p.1673-1677, 2001.

WANG, Y. et al. 11 β - Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 shRNA ameliorates glucocorticoid-induced insulin resistance and lipolysis in mouse abdominal adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.308, p.E84-95, 2015.

WAJCHENBERG, B.L. et al. Glucocorticoids, glucose metabolism and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Adv Exp Med Biol.**, v.171, p.25-44, 1984

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, p.1796-1808, 2003.

WHITE, J. S. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. **Am J Clin Nutr.**, v.88, p.1716S-1721S, 2008.

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, 1999.

XI, S. et al. Fish oil suppressed cytokines and nuclear factor κ B induced by murine AIDS virus infection. **Nutr Res**, v.21, p.865-878, 2001.

XU, C.F. et al. Hypouricemic therapy: a novel potential therapeutic option for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v.52, p.1865-1866, 2010.

ZANG, X. et al. Ginsenosides Rg3 attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating BMP-2/BMPRII/Runx2 signaling pathway. **Chem Biol Interact**, v.25, p.188-197, 2016.

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, v.135, p.61-71, 2008.

ZUBIRIA, M.G. et al. Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals. **FEBS J.**, v.280, p.5864-5974, 2014.

ZUBIRIA, M.G. et al. Long-term fructose intake increases adipogenic potential: Evidence of direct effects of fructose on adipocyte precursor cells. **Nutrients**, v.8, p.198, 2016.