

Julia Spanhol da Silva

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM RATOS
TRATADOS CRONICAMENTE COM FRUTOSE E
PREDNISOLONA E O IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
O ÓLEO DE PEIXE E DA INTERRUPÇÃO DOS
TRATAMENTOS**

Dissertação submetido(a) ao Programa
Multicêntrico de Ciências Fisiológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Fisiológicas
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.

Silva, Julia Spanhol
ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM RATOS TRATADOS
CRONICAMENTE COM FRUTOSE E PREDNISOLONA E O IMPACTO
DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE E DA
INTERRUPÇÃO DOS TRATAMENTOS / Julia Spanhol Silva ;
orientador, Alex Rafacho - SC, 2017.
113 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. Prednisolona. 5. Alterações
metabólicas e morfofuncionais. I. Rafacho, Alex. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.
III. Título.

Julia Spanhol da Silva

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM RATOS
TRATADOS CRONICAMENTE COM FRUTOSE E
PREDNISOLONA E O IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
O ÓLEO DE PEIXE E DA INTERRUPÇÃO DOS TRATAMENTOS**

Esta Dissertação/Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo
Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que se fez minha força, me carregou nos braços e foi meu guia nesta jornada.

À minha família, que com todo amor me apoiaram neste sonho. Mãe, Pai, Boadrasta e Mana: vocês são a base da minha vida, meu porto seguro. Se Deus me permitisse escolher, escolheria vocês mil vezes. À minha pequena anjinha Sophia, que mesmo sem saber, me deu força e amor que eu jamais pensei em ter.

Ao meu professor orientador Dr. Alex Rafacho, que me aceitou e me incentivou a seguir esse sonho. Por todas palavras de incentivo e toda responsabilidade em mim depositada, serei eternamente grata.

Aos professores da banca, Prof. Carla Collares, Michelle Biz, Gustavo dos Santos e Fernanda Lima, fica meu sincero agradecimento por fazerem parte desta conquista.

À UFSC, PPGMCF e ao Laboratório de Técnicas Histológicas por terem me concedido esta oportunidade de aprendizado técnico e científico.

À toda equipe LIDoC, que entre colegas e amigos, fizeram parte da concretização de mais uma etapa, e que levarei vocês por toda vida. Katia, Paola, Cristiane, Amanda, Thayz, Henver, Felipe, Flavia, Maciel, Carol e Prof. Everson Nunes, se não lhes agradei pessoalmente por esses dois anos de aprendizado com cada um, aqui vai meu Muito obrigada!

Ao meu amor Well, por fazer da nossa simples casa, um verdadeiro lar. Saiba que jamais vou esquecer do quanto você foi importante nessa conquista, e o quanto teu abraço quando chegava em casa me acalmava. Além é claro, de não esquecer de levar o guarda-chuva toda vez que chover!! Obrigada meu amigo-irmão!

Aos anjos de presente que o mestrado me deu: Amanda, Paola, Katia, Nati e Du vocês fizeram parte do que eu sou hoje nesse tempo com cada um. Levarei vocês aonde eu estiver. Amanda, minha parceira de boa e de ruim, me ensinado desde a pegar uma caixa no biotério à fazer formatação da Dissertação, vou sentir saudade desse sotaque, mas tenho certeza que amizades boas são eternas e te levo num pedacinho do coração, e é claro, não esqueço das promessas feitas no Gus! Paola, minha mãezinha linda, que se preocupava se eu ia passar frio (viemos do Sul né, o medo de passar frio é eterno) toda tua preocupação e teu carinho comigo me mostraram o quanto à vida e as pessoas são lindas e que amizade a gente cultiva. À vocês a minha eterna gratidão e carinho, porque mais que colegas de laboratório, vocês se tornaram amigas, e isso nada nunca vai mudar!

Por fim, agradeço as amizades que fiz durante à vida, e que hoje percebo o quanto são valiosas. Ari, obrigada pelo teu incentivo de sempre e por saber que, mesmo em ligações do Whatts ou mensagens de voz, posso sempre contar contigo. Minhas queridas sagitarianas Thais e Nath, obrigada pelas palavras de incentivo, e as de briga também; não preciso dizer o quanto a amizade de vocês representa pra mim. Um pedaço do meu coração é de cada uma. Muito obrigada!

Se quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá em grupo! Gratidão à todos!

RESUMO

A ingestão regular de bebidas adoçadas e o tratamento baseado em glicocorticoides (GCs), separadamente, podem promover alterações metabólicas como hipertriacilgliceridemia e redução da sensibilidade à insulina, respectivamente. Contudo, não há informações a respeito do efeito combinado de ambos nem se as alterações persistem após a retirada destes fatores diabetogênicos. Assim, buscamos avaliar o impacto da administração combinada de frutose e prednisolona sobre parâmetros metabólicos e morfológicos relacionados à homeostase glicêmica e lipídica, e fizemos uso da suplementação com óleo de peixe e da retirada dos insultos para avaliar uma possível eficácia atenuadora sobre os parâmetros que se mostrarem alterados. Para tal, ratos Wistar machos foram divididos nos seguintes grupos: controle (CTL), tratados com frutose (20% na água de beber) (FRU), tratados com prednisolona (12,5 ug/ml na água de beber) (PRED), tratados com a combinação de frutose + prednisolona (FP) por 90 dias consecutivos. Também houve o grupo suplementado com óleo de peixe apenas (1 g/Kg p.c., i.g) (OP) nos últimos 45 dias experimentais e o grupo tratado nos moldes dos grupos FP e OP gerando o grupo (FPO). Um grupo paralelo de animais FP foi mantido por mais 3 meses após o término do tratamento para o acompanhamento das variáveis analisadas (REV). Os ratos do grupo FP apresentaram redução do peso corpóreo mesmo mantendo um consumo energético similar a dos demais grupos. O grupo FP também desenvolveu hipertriacilgliceridemia sem alterações na glicemia ao longo do tratamento. Hiperinsulinemia, redução da sensibilidade à insulina, aumento da adiposidade visceral e hiperurecemia, aumento do conteúdo de lipídeo hepático, além de maior massa relativa de células beta pancreáticas também foram observados no grupo FP. A suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em atenuar a maioria dos efeitos adversos, exceto pela redução da triacilgliceridemia e urecemia plasmática. Por outro lado, o grupo REV normalizou grande parte das alterações desenvolvidas pela combinação dos tratamentos. Concluímos que a combinação da ingestão de frutose com o tratamento concomitante de corticosteroide compromete o crescimento corpóreo e induz um quadro característico de síndrome metabólica enquanto a suplementação com óleo de peixe parece atenuar principalmente a dislipidemia. Também concluímos que o organismo é capaz de se recompor da maioria dos efeitos adversos com a interrupção dos desafios metabólicos presente na água de beber. 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.

Palavras chaves: síndrome metabólica; frutose; glicocorticoides, óleo de peixe; reversibilidade.

ABSTRACT

Regular intake of sweetened beverages and glucocorticoid-based therapy (GCs), separately, may promote metabolic changes such as hypertriglyceridemia and reduced insulin sensitivity, respectively. However, there is no information regarding the combined effect of the two nor whether the changes persist after the withdrawal of these diabetogenic factors. Thus, we sought to evaluate the impact of the combined administration of fructose and prednisolone on metabolic and morphological parameters related to glycemic and lipid homeostasis, and used fish oil supplementation and insult with drawal to evaluate a possible attenuating efficacy on the parameters that have been altered. For this, male Wistar rats were divided into the following groups: control (CTL), treated with fructose (20% in drinking water) (FRU), treated with prednisolone (12.5 μg / ml in drinking water) (PRED), treated with the combination of fructose + prednisolone (FP) for 90 consecutive days. It also hears the group supplemented with fish oil only (1 g / kg p.c., g) (OP) in the last 45 experimental days and the group treated in the FP and OP groups generating the (FPO) group. A parallel group of FP animals was maintained for a further 3 months after the end of treatment to monitor the variables analyzed (REV). The rats of the FP group presented a reduction in body weight even while maintaining an energy consumption similar to that of the other groups. The FP group also developed hypertriglyceridemia without changes in glycemia throughout the treatment. Hyperinsulinemia, reduced insulin sensitivity, increased visceral adiposity and hyperurecemia, increased hepatic lipid content, and a higher relative mass of pancreatic beta cells were also observed in the FP group. Fish oil supplementation was not effective in alleviating most of the adverse effects, except for reduction of triacylglyceridemia and plasma urecemia. On the other hand, the REV group normalized much of the changes developed by the combination of treatments. We conclude that the combination of fructose intake and concomitant corticosteroid treatment compromises body growth and induces a characteristic metabolic syndrome, whereas supplementation with fish oil seems to attenuate mainly dyslipidemia. We also conclude that the body is able to recover from most adverse effects by disrupting the metabolic challenges present in drinking water. These findings point to the risks of associating a GC-based therapy with regular consumption of sweetened beverages and add encouraging information about the organism's plasticity and the benefits of stopping the causative factors of adverse effects.

Key words: metabolic syndrome; fructose; glucocorticoids; fish oil; reversibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo hepático da frutose.....	34
Figura 2:Ações adversas dos glicocorticóides (GCs) em tecidos periféricos envolvidos no controle da homeostase glicêmica.....	37
Figura 3: Mecanismos atenuadores do EPA e DHA sobre perfil lipídico e glicêmico.....	41
Figura 4: Ingestão hídrica é aumentada nos animais tratados com FP e ingestão alimentar é reduzida, com alteração transitória no consumo calórico.....	56
Figura 5: Tratamento com FP resulta em redução do peso corpóreo ao longo do tratamento.....	57
Figura 6: Tratamento com FP promove alterações transitórias na concentração plasmática de glicose e hipertriacilgliceridemia.....	58
Figura 7: Tratamento com FP promoveu melhora transitória da tolerância à glicose, com redução da sensibilidade à insulina, sem alteração no teste de tolerância ao piruvato.....	60
Figura 8: Tratamento com FP promove hiperinsulinemia e hiperuricemia plasmáticas ao final do tratamento.....	61
Figura 9: Tratamento crônico de FP resulta em maior conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio.....	61
Figura 10: Tratamento com FP não resulta em aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo epididimário e retroperitoneal.....	62
Figura 11: Tratamento com FP não promove alterações nos parâmetros morfométricos do tecido adiposo epididimário.....	66
Figura 12: Tratamento com FP resulta em aumento de concentrações de lipídeos hepáticos.....	68
Figura 13: Tratamento com FP resulta em aumento na massa absoluta de células beta.....	70
Figura 14: Aumento das concentrações de EPA e DHA em hemácias advindo da suplementação com óleo de peixe.....	73
Figura 15: Suplementação com óleo de peixe não promove efeitos sobre consumo alimentar, hídrico e calórico.....	74
Figura 16: Suplementação com óleo de peixe não altera peso corpóreo de animais tratados com FP.....	75
Figura 17: Suplementação com óleo de peixe promove redução do triacilglicerol plasmático, sem alterar glicemia em jejum.....	76
Figura 18: Suplementação com óleo de peixe não resulta em melhora nos testes de tolerância à glicose e piruvato, e no teste de sensibilidade à insulina.....	78

Figura 19: Suplementação com OP não promove redução da hiperinsulinemia advinda do tratamento com FP.....	78
Figura 20: Suplementação com óleo de peixe promove redução da hiperurecemia advinda do tratamento com FP.....	79
Figura 21: Suplementação com óleo de peixe não apresenta redução no conteúdo de triacilglicerol hepático.....	79
Figura 22: Suplementação com OP não apresenta alterações sobre a liberação de glicerol na gordura epididimária e retroperitoneal.....	80
Figura 23: Suplementação com óleo de peixe não altera parâmetros morfométricos.....	82
Figura 24: Suplementação com óleo de peixe não melhora perfil lipídico.....	84
Figura 25: Suplementação com óleo de peixe não altera massa relativa de células beta.....	86
Figura 26: Retirada do insulto de FP resulta em normalização de consumo alimentar, hídrico e calórico.....	89
Figura 27: Retirada do tratamento concomitante promove normalização e aumento do peso corpóreo.....	90
Figura 28: Retirada do tratamento não promove alterações nos parâmetros plasmáticos de triacilglicerol.....	91
Figura 29: Grupo REV apresenta redução do conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio em relação ao grupo FP.....	91
Figura 30: Remoção do tratamento concomitante resulta em diminuição das concentrações de ácido úrico e insulina plasmática.....	92
Figura 31: Retirada do tratamento não altera distribuição de área e perímetro de adipócitos, porém promove redução do diâmetro.....	94
Figura 32: Retirada do tratamento promove melhora no perfil lipídico e presença de células de Kupffer.....	95
Figura 33: Retirada do tratamento não altera área relativa de massa de células β	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para diagnóstico da SM.

Quadro 2: Resumo dos resultados obtidos pelo tratamento concomitante de frutose e prednisolona.

Quadro 3: Resumo dos resultados obtidos através da suplementação com óleo de peixe.

Quadro 4: Resumo dos resultados após a retirada dos tratamentos concomitantes de frutose e prednisolona.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: estudos relacionando a ingestão de frutose e suas alterações metabólicas.....	28
Tabela 2: estudos relacionando tratamento com GC e suas alterações metabólicas.....	30
Tabela 3: estudos contendo suplementação com óleo de peixe e tratamento com frutose ou GC.	39
Tabela 4: percentual de ácidos graxos nas hemácias presente no óleo de peixe.	46
Tabela 5: massa relativa de tecidos e órgãos de ratos tratados com FP.	63
Tabela 6: peso relativo de órgãos e tecidos de ratos tratados e suplementados com óleo de peixe.....	81
Tabela 7: peso relativo de órgãos e tecidos de ratos após retirada dos insultos.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGL - Ácido graxo livre
- AGNE - Ácido graxo não esterificado
- AldoB - Aldolase B
- AMP - Adenosina monofosfato
- APO - Apolipoproteína
- AR - Aldolase redutase
- ASC - Área abaixo da curva
- CEUA - Comissão de Ética no uso de animais
- ChREBP - Fator de transcrição da proteína ligado do elemento responsivo à hidratos de carbono
- CORT - Corticosterona
- CRP - Proteína C reativa
- CTL - Grupo Controle
- DAK - Dihidroxiacetona cinase 2
- DCV - Doença cardiovascular
- DEX - Dexametasona
- DHA - Ácido graxo docosaenoico
- DHAP - Dihidroacetona fosfato
- DM - Diabetes mellitus
- DM2 - Diabetes mellitus tipo 2
- EPA - Ácido graxo eicosapentaenoico
- EPM - Erro padrão da média
- F1P - Frutose 1 fosfato
- F6P - Frutose 6 fosfato
- FP - Grupo Frutose + Prednisolona
- FPO - Grupo Frutose + Prednisolona + Suplementação com óleo de peixe
- FRU - Grupo Frutose
- G3P - Gliceraldeído 3 fosfato
- G6P - Gliceraldeído 6 fosfato
- GC - Glicocorticóides
- GLUT - Transportador de glicose
- GR - Receptor de glicocorticoide
- HDL - Lipoproteína de alta densidade
- HDL-c - Colesterol HDL
- HFD - High fat diet
- HHA - Hipotálamo – hipófise – adrenal
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IL - Interleucina
ipITT - Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
ipPTT - Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal
KHK - Cetohecoxinase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LHS - Lipase hormônio sensível
LP - Lipoproteína lipase
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1
n-3 - Ômega 3
oGTT - Teste de tolerância à glicose oral
OP - Grupo Suplementação óleo de peixe
PAI - Inibidor da atividade do plasminogênio
PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxilase
PPAR's - Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas
PRED - Grupo Prednisolona
PRED - Prednisolona
REV - Grupo Reversibilidade
RI - Resistência à insulina
SM - Síndrome metabólica
TG - Triacilglicerol
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade
XMAF - Xarope de milho de alta frutose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 SÍNDROME METABÓLICA	25
2. MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DA SM	27
2.1 FRUTOSE	33
2.2 GLICOCORTICÓIDES	35
3. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3	37
4. REVERSIBILIDADE	41
5. JUSTIFICATIVA	43
6. OBJETIVOS	44
6.1 GERAL	44
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
7. MATERIAS E MÉTODOS	44
7.1 ANIMAIS:	44
7.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS:	45
7.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS	48
7.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS	48
7.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICO	51
7.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	53
8. RESULTADOS MÓDULO 1	55
8.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	55
8.1.1 Animais tratados com FP apresentaram maior ingestão hídrica e menor consumo alimentar durante o tratamento, com aumento transitório no consumo calórico	55
8.1.2 Tratamento com FP resulta em redução significativa do peso corpóreo ao longo do tratamento	56
8.1.3 Tratamento concomitante promove alterações transitórias na glicemia de jejum e hipertriacilgliceridemia ao longo do tratamento	57
8.1.4 Tratamento concomitante de frutose e prednisolona deixa animais mais sensíveis à glicose, porém promove redução da sensibilidade à insulina, sem alteração no teste de tolerância ao piruvato	58
8.1.5 Tratamento crônico concomitante resulta em hiperinsulinemia e hiperuricemia plasmática	60

8.1.6 Animais tratados com FP apresentam aumento do conteúdo de triacilglicerol e glicogênio hepático.....	61
8.1.7 A combinação de frutose e prednisolona não altera a atividade lipolítica do tecido adiposo epididimário e retroperitoneal.....	62
8.1.8 Tratamento concomitante resulta em alteração da massa relativa de órgãos.....	62
8.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS MÓDULO 1	65
8.2.1 Distribuição de área total, perímetro e diâmetro de adipócitos não apresentam alteração pelo tratamento concomitante.....	65
8.2.2 Tratamento concomitante promove maior acúmulo de lipídeos no fígado, caracterizando esteatose hepática.....	66
9. RESULTADOS MODULO 2	73
9.1 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE ..	73
9.1.1 Suplementação com óleo de peixe resulta em aumento de EPA e DHA.....	73
9.1.2 A suplementação com óleo de peixe não modificou a ingestão alimentar e hídrica alterada pelo tratamento com frutose e prednisolona.....	73
9.1.3 A suplementação com óleo de peixe não promove alterações sobre o peso corpóreo.....	74
9.1.4 Suplementação com óleo de peixe atenua triacilglicerol plasmático, porém não resulta em modificações na glicemia em jejum.....	75
9.1.5 Suplementação com óleo de peixe não altera tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e piruvato.....	76
9.1.6 Suplementação com óleo de peixe não promove redução da hiperinsulinemia.....	78
9.1.7 Suplementação com OP apresenta efeito atenuador sobre a hiperurecemia resultante do tratamento com frutose e prednisolona.....	78
9.1.8 Suplementação com óleo de peixe não apresenta redução no conteúdo de triacilglicerol hepático.....	79
9.1.9 A suplementação com óleo de peixe não altera atividade lipolítica da gordura epididimaria e retroperitoneal.....	79
9.1.10 Peso relativo de órgãos é alterado pelo tratamento concomitante de FP, porém a suplementação com óleo de peixe não é eficaz em reverter tais alterações.....	80
9.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS MÓDULO 2	81
9.2.1 Suplementação com óleo de peixe não altera parâmetros morfológicos de adipócitos.....	81

9.2.2 A suplementação com óleo de peixe não é eficaz em reduzir parâmetros de esteatose hepática advindo do tratamento com FP.	83
10. RESULTADOS MÓDULO 3	89
10.1 EFEITOS DA INTERRUPÇÃO DOS TRATAMENTOS	89
10.1.1 Retirada dos tratamentos resulta em normalização dos parâmetros de consumo alimentar e hídrico.	89
10.1.2 Peso corpóreo de animais é aumentado após a retirada dos tratamentos, mantendo-se até o final do período avaliado.	90
10.1.4 Interrupção do tratamento concomitante resulta em menor conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio.	91
10.1.5 Retirada do tratamento promove redução na insulinemia e uricemia.	92
10.1.6 Após retirada dos tratamentos a massa relativa de órgãos e tecidos é normalizada.	92
10.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS	93
10.2.1 A retirada do tratamento resulta em diminuição do diâmetro de adipócitos	93
10.2.2 Retirada do tratamento concomitante promove melhora no quadro de esteatose hepática.	94
11. DISCUSSÃO	99
12. CONCLUSÃO	103
13. PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME METABÓLICA

A prevalência de indivíduos com sobrepeso ou obesos aumenta anualmente em todo mundo, demonstrando uma provável relação com o estilo de vida sedentário, o excesso no consumo de alimentos processados que contém alta densidade energética e baixo valor nutricional (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006). Essas comorbidades relacionadas ao estilo de vida atual, como obesidade, dislipidemias, aterosclerose, doença hepática não alcoólica, também conhecida como esteatose hepática gordurosa, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e hipertensão predominam nos países industrializados (HERMAN; SAMUEL, 2016; KOJI; TERUYOSHI, 2015). Dados de 2007 mostram que no Brasil 72% dos casos de óbitos incluíram mortes relacionadas com doenças cardiovasculares, neoplasias e diabetes *mellitus* DM (ALVES & NETO, 2015).

A obesidade, especialmente a obesidade visceral [que se caracteriza normalmente pela Síndrome metabólica (SM)] são decorrentes de um estilo de vida inadequado, com maior ingestão calórica, dietas ricas em açúcares e frutose, bem como hábitos sedentários (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005; BRAY; POPKIN, 1998). O aumento na prevalência da SM associa-se à epidemia global da obesidade e diabetes (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005), encontrando na população brasileira uma prevalência que se aproxima aos 65%, sendo portanto, um fator de risco para morbidade e mortalidade presente no Brasil (VIDIGAL et al., 2013; SILVA et al., 2011; NG et al., 2014).

O conjunto de desordens metabólicas que definem a SM incluem: obesidade visceral, hipertriacilgliceridemia, baixos níveis de HDL-c, hipertensão e glicemia de jejum alterada (ELLIOTT et al., 2002; KOJI; TERUYOSHI, 2015), que ainda conta com a predisposição genética. Seu diagnóstico é obtido por meio das seguintes alterações: aumento de circunferência abdominal, além de pelo menos duas alterações conjuntas, podendo ser elas: dislipidemia (hipertriacilgliceridemia e/ou hipercolesterolemia), redução das concentrações de HDL-c, hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina (RI) e glicemia de jejum alterada (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; TENENBAUM et al., 2007), como demonstrado no Quadro 1 (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

Quadro 1: Critérios para diagnóstico da SM

	NCEP: ATP III (atualização 2005)	OMS (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
Requisitos obrigatórios	Nenhum	IR*	Hiperinsulinemia ^f	Obesidade central (PC) ^g : ≥ 94 cm (M), ≥ 80 cm (F)
Critério	Quaisquer 3 dos 5 critérios abaixo	IR ou DM2, mais 2 dos 5 critérios	Hiperinsulinemia, mais 2 dos 4 critérios abaixo	Obesidade central mais 2 dos 4 critérios abaixo
Obesidade (visceral/central)	PC: >102 cm (M), >88 cm (F)	Razão cintura/anca: $>0,90$ cm (M), $>0,85$ cm (F); ou IMC > 30 Kg/m ²	PC: ≥ 94 cm (M), ≥ 80 cm (F)	Requisito obrigatório
Hiperglicemia	Glicose em jejum $\geq 100^g$ mg/dl ou TF	IR é requisito obrigatório	IR é requisito obrigatório	Glicose em jejum ≥ 100 mg/dl
Dislipidemia	TAG ≥ 150 mg/dl ou TF	TAG ≥ 150 mg/dl ou HDL: <35 mg/dl (M), <39 mg/dl (F)	TAG ≥ 177 mg/dl ou HDL <39 mg/dl	TAG ≥ 150 mg/dl ou TF
Dislipidemia (critério separado)	HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); ou TF	X	X	HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); ou TF
Hipertensão	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou TF	$\geq 140/90$ mmHg	$\geq 140/90$ mmHg ou TF	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou TF
Outros critérios	X	Microalbuminúria ^h	X	X

TF: tratamento farmacológico; M: sexo masculino; F: sexo feminino, IR: resistência à insulina, DM2: diabetes mellitus tipo 2. Adaptado de Huang et al, 2009.

A SM se baseia na obesidade visceral, como pré-requisito. O tecido adiposo visceral é sujeito a alterações metabólicas quando em excesso, onde parece não ser capaz de metabolizar a energia resultante de um estilo de vida sedentário aliado com balanço energético positivo. O aumento na massa deste tecido também está associado com dislipidemias e perfil inflamatório (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006).

Quando em excesso, de gordura visceral está constituída de adipócitos hipertrofiados, e este perfil é associado com anormalidades aterogênicas e diabetogênicas, caracterizando a obesidade visceral como um fator de risco para o desenvolvimento de RI e DM2 (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006). O aumento na adiposidade abdominal é resultante de um balanço energético positivo ou da redução do gasto energético, e também pelo tecido adiposo apresentar incapacidade de dissipar energia. Ainda, a capacidade do tecido adiposo em armazenar lipídeos pode encontrar-se saturada, podendo acumular-se em locais não especializados para tal função, como fígado, músculo e pâncreas, definindo o conceito de gordura ectópica (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

O aumento na adiposidade visceral está associado a maior secreção de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) direcionada ao fígado pela circulação portal, podendo contribuir para o quadro de RI (BERGMAN

et al., 2006; DESPRÉS; LEMIEUX, 2006). Os ácidos graxos livres (AGL) são derivados principalmente de gotículas contendo triglicerídeos, sendo liberados do tecido adiposo pela ação da enzima lipase hormônio sensível (HSL), ou ainda podendo ser derivados da lipólise sobre as lipoproteínas ricas em triacilglicerol (VLDL) pela ação da lipoproteína lipase (LPL) (STERN et al., 2004). Portanto, o aumento da massa de gordura visceral pode resultar em maiores concentrações de AGL na circulação, favorecendo maior acúmulo destes lipídeos no fígado (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; TENENBAUM; KLEMPFNER; FISMAN, 2014).

Nesse contexto de adipócitos hipertrofiados, caracterizados especialmente pelo estado hiperlipolítico decorrente de um quadro com resistência à insulina, é comum ter aumento da produção de apolipoproteína B, que contém lipoproteínas ricas em triacilglicerol (VLDL) (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; WEISBERG et al., 2003), bem como alteração do perfil inflamatório, com redução nas concentrações de adiponectina, e maiores concentrações de proteína C reativa (CRP), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) plasmáticas (WEISBERG et al., 2003).

Alterações no metabolismo da glicose também podem estar presentes no diagnóstico da SM, incluindo redução da supressão da gliconeogênese, bem como redução da captação de glicose pelos tecidos periféricos e RI (menor ação da insulina), resultando em hiperinsulinemia de jejum (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005). Além destas anormalidades, outras alterações que não são incluídas nos critérios para diagnóstico da SM, porém são relacionadas com RI, tais como: aumento na apoB e apoC-III, hiperuricemia, presença de esteatose hepática não alcoólica e inflamação subclínica (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; TRAYHURN; WOOD, 2004).

2. MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DA SM

O aumento no consumo de açúcares, bem como o uso indiscriminado de fármacos, como os glicocorticoides (GC), pode alterar o metabolismo glicêmico e lipídico, levando a um padrão metabólico similar ao da síndrome metabólica. Assim, modelos experimentais utilizando estes desafios metabólicos podem mimetizar os efeitos e mecanismos pelos quais a SM se desenvolve.

Sabe-se que a ingestão de frutose em animais pode mimetizar alguns aspectos da SM como observada em humanos, ex., aumento na adiposidade visceral, RI, hiperinsulinemia, hipertriacilgliceridemia,

intolerância à glicose e aumento nos valores de pressão arterial. Com isso, estes modelos podem ser utilizados com o intuito de elucidar mecanismos bem como para a aplicação de intervenções (MAHMOUD; ELSHAZLY, 2014).

Modelos experimentais utilizando a frutose na água de beber por diferentes tempos e concentrações demonstram as seguintes alterações: aumento de gordura visceral bem como de peso corpóreo, aumento nos valores glicêmicos e insulinêmicos, RI, intolerância à glicose, dislipidemia, aumento de AGL, hiperuricemia, aumento da massa do fígado acompanhado de esteatose hepática com aumento de macrogotículas, além de hipertrofia de adipócitos e menor massa de células beta pancreáticas (Tabela 1) (BURSAĆ et al., 2014; DE CASTRO et al., 2015; MAHMOUD; ELSHAZLY, 2014; MAMIKUTTY; THENT; HAJI SUHAIMI, 2015; NOVAK et al., 2015). Contudo, estas alterações não são encontradas em todos os trabalhos utilizando frutose isoladamente, demonstrando que a eficiência do modelo é, por vezes, questionável (DELLA VEDOVA et al., 2016; HUANG et al., 2016).

Tabela 1: Estudos relacionando a ingestão de frutose e suas alterações metabólicas.

Autor	Modelo	Resultados
Maiztegui et al, 2011	Ratos machos Wistar, recebendo frutose na água de beber à 10% por 3 semanas.	Intolerância à glicose, hiperinsulinemia e hipertriacilgliceridemia, além de maior índice HOMA-IR e HOMA-β e menor massa de células β
Alzamendi et al, 2012	Ratos Wistar tratados com frutose à 10% na água de beber, por 3 semanas.	Aumento nas concentrações plasmáticas de TBARS, leptina e glicose, além de hipertrofia de adipócito, hiperinsulinemia bem como RI e hipertriacilgliceridemia.
Buscá et al, 2014	Ratos Wistar recebendo 60% de frutose na água de beber, por 9 semanas	Aumento de adiposidade visceral, hipertriacilgliceridemia, resistência hipotalâmica à leptina, hiperleptinemia plasmática, além de hipertrofia de adipócitos

Mahmoud and Elshazly, 2014	Ratos machos Wistar, recebendo 10% frutose na água de beber por 12 semanas	Aumento de peso corpóreo, glicemia e insulinemia, bem como hipertriacilgliceridemia, hipercolesterolemia, AGL, ácido úrico, HOMA-IR e HAS
Mamikutty et al 2015	Ratos Wistar recebendo frutose à 20 e 25% na água de beber por 8 semanas	Grupo recebendo 20% apresentou aumento de obesidade visceral comparado ao grupo 25%; Além de ambos apresentarem hipertriacilgliceridemia, hiperglicemia, hipertrofia de adipócito, e aumento de pressão arterial sistólica
Mamikutty et al, 2015	Ratos Wistar, tratados com frutose à 20% na água de beber, por 8 semanas	Aumento peso corporal, gordura visceral, hipertriacilgliceridemia, hiperglicemia, além de esteatose hepática com aumento de macrogotículas
Novak et al, 2015	Ratos machos Sprague-Dawley, tratados com 15% frutose na água de beber, por 8 semanas	Aumento de consumo hídrico, gordura epididimária, hipertriacilgliceridemia e hiperglicemia, e intolerância à glicose

Bursác et al (2013) sugeriram que as alterações causadas pelo excesso de frutose poderiam ser mediadas pelo metabolismo dos glicocorticoides (GC), como pelo seu pré-receptor no tecido adiposo. Este trabalho demonstrou que a exposição de ratos Wistar à frutose 10% por 9 semanas resultou nos mesmos efeitos nocivos demonstrados nos estudos citados previamente, além de apresentar aumento na expressão da enzima 11 β HSD-1 e corticosterona no tecido adiposo.

Sabendo que os GC em excesso podem alterar o metabolismo da glicose, induzindo RI em modelos animais, diversos estudos foram realizados com o intuito de elucidar por quais mecanismos esta classe de fármacos atua sobre a homeostase metabólica (DUBOIS; JUSKO, 2012).

As principais alterações encontradas em modelos experimentais utilizando GC com dose/tempo dependentes são: aumento de gordura visceral, hiperglicemia e hiperinsulinemia, intolerância à glicose e RI, dislipidemia, esteatose hepática e deposição de gordura ectópica no músculo esquelético, aumento na secreção de insulina (função de células beta), bem como hipertrofia e hiperplasia, além de aumento da massa de células alfa (Tabela 2) (FRANSSON et al., 2013; PINHEIRO et al., 2009; PROTZEK et al., 2014; RAFACHO et al., 2008). Entretanto, nem todos modelos experimentais que utilizam GC apresentam todas as alterações acima citadas, demonstrando a variabilidade do modelo (WU et al., 2016).

Tabela 2: Estudos relacionando tratamento com GC e suas alterações metabólicas.

Autor	Modelo	Resultados
Karlsson et al, 2001	Ratos Sprague-Dawley recebendo DEX 2mg/kg ip por 12 dias	Apresentaram hiperinsulinemia e hiperglicemia, bem como perda de função das células β
Rafacho et al, 2008	Ratos Wistar tratados com DEX (0,1; 0,5 e 1,0 mg/kg) por 5 dias consecutivos	Aumento dose-dependente de RI, além de maior dose resultar em intolerância à glicose, hipertriacilgliceridemia, aumento concentrações plasmáticas de AGNE, e aumento da secreção de insulina
De Paula et al, 2011	Ratos Wistar machos recebendo DEX 1mg/kg por 5 dias consecutivos	RI, hiperinsulinemia e hiperplasia de células β
Laskewitz et al, 2012	Camundongos C57BL/6J tratados com HFD por 6 semanas e suplementados com PRED (10mg/kg via gavagem) por 1 semana	Demonstraram hiperglicemia e hiperinsulinemia e leptinemia, maior índice HOMA-IR e menor sensibilidade à insulina, além de hipertriacilgliceridemia, dislipidemia e maiores concentrações de AGL, bem como aumento de corticosterona plasmático

Fang et al, 2013	Ratos Wistar recebendo infusão osmótica intravenosa de metilprednisolona com dose baixa (0,03 e 0,1), média (0,2) e alta (0,3 e 0,4) por 21, 10 e 7 dias, respectivamente	Aumento AGL plasmáticos dose dependente, além de hiperfagia, redução do peso corporal, hiperglicemia e hiperinsulinemia
Fransson et al, 2013	Camundongos machos C57BL/6J tratados com corticosterona na água de beber (100 ou 25µg/mL) por 5 semanas	Aumento consumo alimentar, ganho de peso corpóreo, aumento de gordura visceral, dislipidemia, deposição de gordura ectópica no fígado e músculo esquelético, além de menor sensibilidade à insulina e intolerância à glicose. Ainda, apresentaram aumento da massa e da capacidade secretória das células β
Protzek et al, 2014	Ratos Wistar machos recebendo DEX 1mg/kg por 5 dias consecutivos	Hiperinsulinemia, glicemia e glucogonemia, RI, aumento da massa e de grânulos secretores de células α , bem como maior secreção de células β

Como demonstrado anteriormente, os tratamentos isolados com dietas hipercalóricas (frutose) e GC apresentam alterações semelhantes à SM observada em humanos. Com isso, dois estudos semelhantes utilizando um modelo experimental com ratos machos Sprague-Dawley recebendo CORT 100 mg exógena implantados subcutâneamente e alimentados concomitante com uma dieta com alto teor de gordura (60%) durante 16 dias, apresentaram aumento da massa de gordura epididimária relativa, além de esteatose e fibrose hepática e deposição de gordura ectópica no músculo esquelético. Ainda, foi observada hiperglicemia de jejum e RI, hiperinsulinemia, hipertriacilgliceridemia e falha da capacidade secretória das células β em resposta ao oGTT, quando comparados com os animais controle (SHPILBERG et al., 2012, 2012).

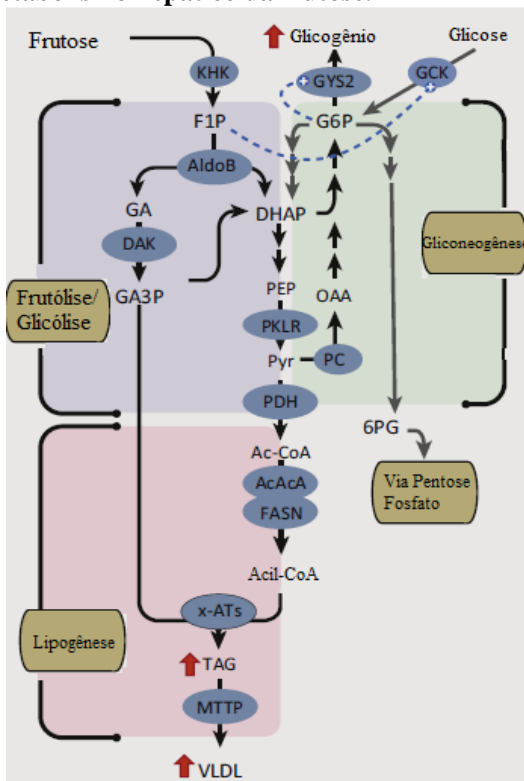
2.1 FRUTOSE

Dados atuais mostram associação temporal entre o aumento no consumo de açúcares [xarope de milho de alta frutose (XMAF)] e o aumento da obesidade e SM (FEINMAN; FINE, 2013; HERMAN; SAMUEL, 2016). Eles representam em média cerca de 318Kcal da ingestão alimentar ou entre 16 a 20% de toda ingestão calórica diária (NIELSEN et al., 2002; HEATHER et al., 2005) e podem ser encontrados em refrigerantes, sucos, energéticos ou em alimentos industrializados (SHELUDIAKOVA et al., 2011, HEATHER et al., 2005).

A frutose é considerada um açúcar lipogênico e caracteriza um fator de risco para doenças como DM2, e DCV (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2010; GREEN et al., 2014; LI et al., 2015; SHELUDIAKOVA; ROONEY; BOAKES, 2012a; WANG et al., 2015). Sabe-se que a metabolização da frutose e glicose são diferentes, onde a glicose é utilizada como fonte energética pelo cérebro, e captada diretamente por tecidos periféricos como músculo e tecido adiposo, e seu excesso é armazenado no fígado e músculo, como glicogênio hepático e muscular, respectivamente (TEFF et al., 2009). A conversão de glicose em piruvato ocorre pela regulação da insulina, através do estímulo sobre a expressão gênica da glicocinase e ativação de enzimas glicolíticas (LE, 2010).

A frutose é transportada para o enterócito via GLUT5, um transportador de membrana específico e altamente expresso nas microvilosidades das células do intestino delgado, bem como pelo GLUT2, sendo um transportador da glicose e frutose expresso no fígado, intestino delgado (ao longo da membrana basolateral) e pâncreas. A frutose ingerida chega ao fígado pela circulação portal, onde é rapidamente metabolizada (HERMAN; SAMUEL, 2016). Sua metabolização hepática inicia com a fosforilação pela enzima ceto-hexocinase (KHK – do inglês, *ketohexokinase*), também conhecida como frutocinase, formando frutose-1-fosfato (F1P) (Figura 1). F1P é subsequentemente metabolizada em gliceraldeído e dihidroxiacetona fosfato (DHAP) pela aldolase B (AldoB). O gliceraldeído sofre então, fosforilação adicional por uma enzima tirosina cinase, a dihidroxiacetona cinase 2 (DAK) formando gliceraldeído-3-fosfato (G3P). Os resultantes da metabolização da frutose (frutólise/glicólise) formam substratos para gliconeogênese, lipogênese ou respiração celular (CIANFANELLI, 2013; HERMAN; SAMUEL, 2016; KOLDERUP; SVIHUS, 2015).

Figura 1 - Metabolismo hepático da frutose.



Fonte: adaptado de Herman&Samuel, 2016.

O consumo exacerbado de frutose, pode acarretar em maior utilização da mesma como substrato para a lipogênese, tanto na síntese ou esterificação de ácidos graxos em TG, podendo explicar as elevadas concentrações plasmáticas após exposição a curto prazo e à elevadas ingestões de frutose (HERMAN; SAMUEL, 2016).

A ingestão aguda de frutose contribui para síntese lipídica através do aumento no fluxo de carbonos de frutose em precursores lipogênicos, promovendo o aumento na capacidade metabólica da frutose em lipídeo. Essa adaptação pode ocorrer no enterócito, onde a exposição crônica de frutose pode aumentar a capacidade deste em absorver frutose pela suprarregulação do transportador de glicose - GLUT5, ou melhora na síntese lipídica pelo enterócito (HAIDARI et al., 2002).

O consumo exacerbado de frutose pode promover maior atividade da enzima KHK, além de ser um importante indutor de hiperuricemia. Este mecanismo, ocorre por retroalimentação positiva via ChREBP, resultando rapidamente em F-1-P e depleção hepática de ATP. Com a redução de fosfato intracelular, a AMP deaminase é estimulada e catalisa a degradação de AMP em monofosfato de inosina, onde este é metabolizado à inosina e degradada à xantina e hipoxantina pela xantina oxidase, finalmente gerando ácido úrico (JOHNSON et al., 2013; LIMA; MARTINS-SANTOS; CHAVES, 2015).

2.2 GLICOCORTICÓIDES

O metabolismo da glicose está sujeito a ação dos GC. A regulação primária da secreção de hormônios GC é feita pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (revisado por ORTSÅTER et al., 2012). O cortisol em humanos e a corticosterona em roedores são considerados os GC endógenos, e suas concentrações elevadas podem resultar em alterações metabólicas como: hipoglicemia, trauma, infecções, situações estressoras, etc (PASIEKA; RAFACHO, 2016).

Os GC sintéticos, sendo a prednisolona (PRED) e a dexametasona (DEX) os mais utilizados na prática clínica, atuam no tratamento de doenças como: asma, artrite reumatoide, Lúpus, pós-transplantes, entre outras. Suas ações são célula- e tecido-específicas e variam de acordo com a dosagem, duração do tratamento, e fatores individuais (MELLOUK et al., 2011; QUAX et al., 2013). Entretanto, quando utilizadas em excesso promovem diversas alterações metabólicas, como: diminuição dos efeitos supressores da insulina sobre a gliconeogênese, redução da captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, dislipidemia e alteração no *disposition index* (*do inglês* - índice de disposição), que mensura a secreção de insulina pela sensibilidade periférica à insulina (MELLOUK et al., 2011; PASIEKA; RAFACHO, 2016; PROTZEK et al., 2014; QUAX et al., 2013; VAN RAALTE et al., 2011).

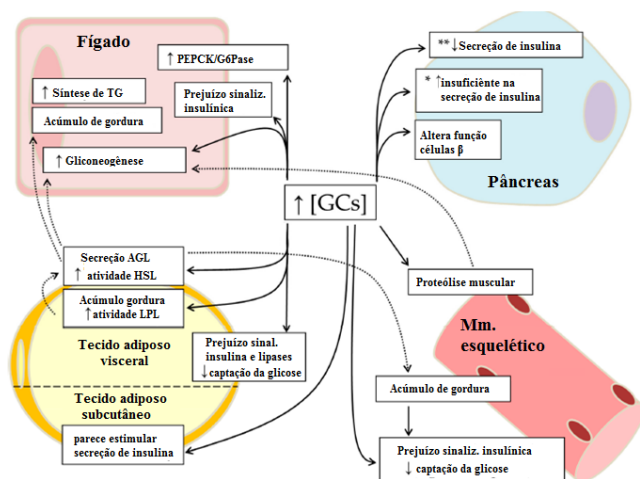
A ação tecido-específica do GC é mediada pelo hormônio esteroide que têm sua ligação com o receptor para GC (GR). Este receptor é um fator de transcrição regulado por ligante, e pertence à uma grande família de receptores nucleares, regulando a transcrição gênica por transativação ou transrepressão (MANGELSDORF et al., 1995). O GR é principalmente expresso em células adiposas, localizadas na gordura abdominal, sendo capaz de regular a maturação de células adiposas (pré-adipócitos) em células adiposas diferenciadas (revisado por RAFACHO et al., 2014).

Os GC promovem aumento na expressão de enzimas lipolíticas, como a HSL induzindo a hidrólise de TG e liberando ácidos graxos livres (AGL) e glicerol para circulação sistêmica. Além disso, o GC normalmente atenua a sinalização da insulina e diminui a captação de glicose pelos tecidos periféricos, como tecido adiposo, fígado e músculo (SLAVIN; ONG; KERN, 1994). Portanto, a exposição em excesso aos GC atenua a sinalização insulínica, além de aumentar concentrações de AGLs e TGs na circulação, aumenta a adiposidade visceral (revisado por RAFACHO et al., 2014).

O fígado é um órgão central na regulação da homeostase glicêmica e lipídica, onde a insulina modula a síntese de glicogênio hepático e supressão da gliconeogênese. O excesso de GC, pode promover atenuar a sinalização de insulina no fígado levando ao estímulo da gliconeogênese por estimular enzimas como fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK) e G6P. Outro efeito da administração aguda de GC é sobre a concentração plasmática de glicose avaliada pelo teste de tolerância à glicose oral (oGTT). Após tratamento com cortisol ou DEX se observa estimulação da gliconeogênese, onde a elevada concentração de glicose no plasma pode ser decorrente da diminuição da captação periférica e/ou *clearance* de glicose (DJURHUUS et al., 2004; NOVAK et al., 2015; P.; L., 1998; WAJNGOT et al., 1990). Os GC também podem ser responsáveis pelo aumento nas concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e desenvolvimento de esteatose hepática, onde este evento *per se*, promove atenuação da sensibilidade à insulina (revisado por CASSUTO et al., 2005; RAFACHO et al., 2014).

O impacto negativo do excesso de GC no músculo esquelético envolve redução na captação de glicose e são comumente envolvidos na RI, onde a insulina não é capaz de estimular a adequada captação de glicose muscular (revisado por PASIEKA; RAFACHO, 2016; RAFACHO et al., 2014). Portanto, o excesso de GC altera a homeostase hepática e muscular, por ações diretas, bem como por ações indiretas como deposição de gordura ectópica resultante da lipólise do tecido adiposo, ou ainda pelo aumento na expressão de adipocitocinas e citocinas pró-inflamatórias, prejudicando a sinalização à insulina nos tecidos periféricos (revisado por PASIEKA; RAFACHO, 2016) (Figura 2).

Figura 2: Ações adversas dos glicocorticóides (GCs) em tecidos periféricos envolvidos no controle da homeostase glicêmica.



Fonte: modificado a partir de Rafacho et al., 2014 e adaptado de Pasiëka and Rafacho, 2016.

3. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3

A inflamação subclínica encontra-se presente no cerne de diversas doenças metabólicas crônicas como obesidade e DM2, causadas especialmente pelo consumo exacerbado de frutose e/ou GC, onde a suplementação com óleo de peixe poderia ser um importante fator atenuador, uma vez que possui propriedades modulatórias sobre parâmetros cardiometabólicos (perfil lipídico plasmático, pressão arterial e sensibilidade à insulina) (RIBEIRO, et al., 2006; SAITO, 2012).

Sabe-se que ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são compostos por duas grandes subfamílias, denominadas ômega-6 e ômega-3 (n-6/n-3 PUFA) e estão presentes na dieta como fonte suplementar, através do óleo de peixe e óleo de linhaça (revisado por CALDER, 2012). O ômega-3 é composto por ácido graxo α -linolênico, sendo este um precursor para o ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) e ácido graxo docosahexaenoico (DHA), possuindo propriedades anti-inflamatórias, regulando a função imune, além de atenuar metabolismo lipídico, com redução das concentrações de TG plasmático, bem como redução da síntese e armazenamento de triacilglicerol (CALDER, 2012;

KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011; MURRU; BANNI; CARTA, 2013).

Por serem precursores de mediadores lipídicos, como os eico/docosanóides, ou ainda ligantes para fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs), os ácidos graxos ômega-3 possuem propriedades que modulam a fisiologia celular, como incorporação de fosfolipídios na membrana, estimulando a produção de eicosanóides, bem como promovendo maior síntese de resolvinas, que possuem propriedades anti-inflamatórias e ações regulatórias na transcrição gênica inflamatória (revisado por CALDER, 2012). Deste modo, os ácidos graxos ômega-3, bem como suplementação de óleo de peixe enriquecido com EPA/DHA podem ser recomendados no tratamento adjuvante da saúde cardiovascular, parâmetros como hipertriacilgliceridemia, aterosclerose, além de possuírem propriedades anti-inflamatórias, entre outras (BURRI et al., 2012; JUMP et al., 2005).

Reduções em concentrações de LDL-c, colesterol total e TG plasmáticos, bem como aumento de HDL-c, decorrentes da inibição da síntese de VLDL e TG hepático, são alguns dos efeitos relacionados ao EPA/DHA apresentando melhora do perfil lipídico (HARRIS et al., 1990). Ainda, há diversos estudos acerca dos mecanismos pelos quais o EPA e DHA atuam sobre a sensibilidade à insulina, visto que os ácidos graxos poli-insaturados atenuam o desenvolvimento de RI, quando associados à dietas com alto teor de gordura, sacarose ou frutose, entre outros. Assim, algumas evidências baseiam-se nos resultados positivos acerca da melhora de parâmetros relacionados à SM, podendo retardar o desenvolvimento de DM2 (HWANG, 1989).

Em estudo com camundongos C57BL/6J, a suplementação de EPA promoveu melhora na RI induzida pela dieta com alto teor de gordura, também atenuando parâmetros de esteatose hepática e aumento de expressão de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) no tecido adiposo (MURRU; BANNI; CARTA, 2013). Outro estudo, em ratos Wistar, recebendo dieta contendo 64% de frutose por 60 dias e após suplementados concomitantemente com 2, 5 e 7% de óleo de peixe na ração por mais 30 dias apresentaram alterações como redução da massa do fígado e TG plasmático e hepático com dosagens de 5 e 7% apenas, não sendo observado atenuação destes parâmetros com a suplementação de 2% de óleo de peixe (DE CASTRO et al., 2015). Em outro estudo, ratos tratados com DEX (0,5mg/kg ip) e suplementados concomitantemente com óleo de peixe (1g/kg via gavagem) por 15 dias apresentaram atenuação no perfil lipídico (TG, colesterol total e VLDL plasmáticos), no entanto sem

promover alterações no peso corpóreo (BARBOSA et al., 2016). Estes e outros estudos podem ser observados detalhadamente na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Estudos contendo suplementação com óleo de peixe e tratamento com frutose ou GC.

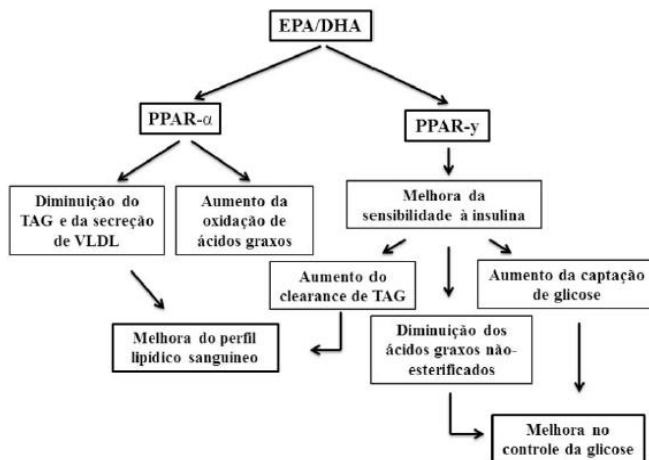
Autor	Método	Resultados
Soria et al, 2002	Ratos Wistar receberam dieta contendo sacarose 62,5% por 90 dias, e após recebeu 7% de óleo de bacalhau e 1% de óleo de milho por mais 30 dias, incluído na dieta.	Redução da massa gordura epididimária, além de redução de diâmetro de adipócito (isolado), supressão da lipólise basal e da lipoproteína lipase, e redução de TG plasmático. Sem alterações no peso corpóreo, ingesta alimentar.
Mellouk et al, 2011	Ratas Wistar alimentadas com frutose (640 g/kg) e após trocada ração por uma contendo óleo de salmão (1,6%) por 8 semanas	Redução da hiperinsulinemia plasmática, concomitante à melhor sensibilidade à insulina e redução da massa de células beta.
de Castro et al, 2015	Ratos Wistar recebendo 63% frutose na ração por 60 dias; após receberam frutose e suplementação com óleo de peixe concomitante (2, 5 e 7%) na dieta por 30 dias.	Redução do peso do fígado, TG plasmático e hepático, além de redução do índice HOMA-IR pela suplementação com 5 e 7% de óleo de peixe. Além de apresentar maior beta oxidação e menor lipogênese hepática, sendo dose-dependente. A suplementação com 2% de óleo de peixe na dieta não foi eficaz em atenuar os parâmetros causados pela frutose.
Barbosa, et al 2016	Ratos Wistar recebendo DEX (0,5 mg/kg ip) e suplementados com óleo de peixe (1g/kg	Apresentaram aumento de EPA e DHA hepático, além de atenuarem TG plasmático, colesterol total e VLDL-c, sem

	via gavagem) por 15 dias, de forma concomitante	demonstrar alteração no peso corpóreo.
--	---	--

É reconhecido que os ômega-3 promovem a oxidação de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo, em roedores e humanos com redução do coeficiente respiratório. São reconhecidos também por inibir a lipogênese hepática, permitindo que ambos os processos alterem o equilíbrio de ácidos graxos direcionando o metabolismo para oxidação, em vez do armazenamento. O EPA e DHA também ativam proteínas cinases por ativação da adenosina monofostato (AMP) como a AMPK no tecido adiposo podendo também ter um efeito da sua ação oxidativa (MAKI et al., 2009; MURRU; BANNI; CARTA, 2013). Ainda, modulam a secreção de adipocinas, promovendo aumento nas concentrações plasmáticas de adiponectina em humanos obesos e roedores, podendo ser um potencial mecanismo pelo qual o ômega-3 melhora a sensibilidade à insulina (CHAKRAVARTHY et al., 2009).

A obesidade/SM também está associada com a supressão do PPAR α , resultando em menor oxidação de ácidos graxos, desenvolvimento de esteatose hepática, e consequente RI hepática (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011). Os mecanismos acerca dos efeitos atenuadores do óleo de peixe estão resumidos na Figura 3.

Figura 3: Mecanismos atenuadores do EPA e DHA sobre perfil lipídico e glicêmico.



Fote: Adaptado de Calder, 2012.

Portanto, os ácidos graxos ômega 3 (EPA e DHA) podem melhorar a sensibilidade à insulina e promover redução da RI em roedores, sendo relacionado à maior taxa oxidativa destes ácidos graxos à nível hepático, músculo esquelético e tecido adiposo, reduzindo assim a lipogênese. Além destas, também possuem importantes propriedades anti-inflamatórias modulatórias sobre o tecido adiposo, bem como inibem secreção de citocinas pró-inflamatórias, e estimulam a secreção de adipocinas (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011).

4. REVERSIBILIDADE

Como descrito anteriormente, o uso de modelos experimentais que se aproximem de um quadro clínico de síndrome metabólica, através da utilização de frutose e/ ou GC, é reconhecido, porém ainda há poucos estudos acerca da reversibilidade destas alterações deletérias sobre o organismo, podendo proporcionar novos conhecimentos e desenvolvimento de possíveis intervenções clínicas (GOMEZ-SMITH et al., 2016).

Após desenvolver o modelo experimental, com características semelhantes às encontrada na SM em humanos, estudos propõem identificar se o organismo é capaz de promover melhorias após a retirada

dos tratamentos causadores, proporcionando uma translação à prática clínica, e à uma constante conscientização acerca dos efeitos nocivos advindos da SM (GOMEZ-SMITH et al., 2016; ROBERTS et al., 2001).

Estudos contendo uma dieta líquida com Fresubin, composto por 15% de proteína, 30% lipídeos e 55% de carboidratos em ratos machos Wistar com tratamento por 5 meses, resultou em aumento do diâmetro de adipócitos, intolerância à glicose, aumento das concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, insulina e peptídeo C, bem como aumento da expressão de genes para leptina, adiponectina, CD68 e fator nuclear kappa B. A interrupção deste tratamento por 3 meses foi capaz de reverter parâmetros alterados advindos da dieta líquida (MIKUSKA et al., 2016).

Em estudo de Gomez et al (2016), utilizando ratos machos Sprague-Dawley expostos à dieta de cafeteria e sacarose à 12% na água de beber por 3 meses, observaram aumento de adiposidade visceral, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, hipertriacilgliceridemia, e menores concentrações de HDL-c. Após mantidos por período de um mês, com dieta padrão e água filtrada as alterações causadas pelo tratamento foram revertidas nestes animais (GOMEZ-SMITH et al., 2016). Ratos machos Wistar expostos à ingestão de frutose à 20% na água de beber por 65 dias apresentaram alterações semelhantes aos estudos acima, incluindo menor consumo alimentar sem alteração do peso corpóreo, e RI. Após retirada do tratamento por apenas 15 dias estes parâmetros foram revertidos (CANCELAS et al., 2008).

Estudo utilizando dosagens de 100 mg ou 25 µg/mL de corticosterona na água de beber de camundongos C57BL/6J por 5 semanas, foram demonstradas as seguintes alterações: aumento da ingestão alimentar, ganho de peso, especialmente com acúmulo de gordura visceral, dislipidemia, deposição de gordura ectópica no músculo esquelético e fígado, bem como intolerância à glicose, menor sensibilidade periférica à insulina e hipertensão arterial. Com interrupção do tratamento por 3 semanas, todas as alterações descritas acima foram revertidas (FRANSSON et al., 2013). Rafacho et al (2010), utilizando ratos Wistar, com injeção intraperitoneal de DEX (1 mg/kg de peso) por 5 dias consecutivos mostraram as mesmas alterações demonstradas no estudo acima citados. No entanto, após 10 dias da interrupção do tratamento, estes animais apresentaram redução em todos parâmetros alterados pela administração de dexametasona (RAFACHO et al., 2010).

Através destes estudos, pode-se salientar a importância em desvendar os mecanismos exatos pelos quais os diversos tratamentos propostos levam às alterações metabólicas e principalmente se estas

podem ser revertidas ou atenuadas espontaneamente pelo organismo, podendo tornar-se uma ferramenta útil na prática clínica.

5. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a combinação de uma dieta hipercalórica e sedentarismo, além de fatores genéticos e epigenéticos, resultam em um quadro de sobrepeso e obesidade, que pode resultar em desenvolvimento de SM ou DM2 (TENENBAUM et al., 2007). Dentre as mudanças nutricionais apresentadas atualmente, destaca-se o aumento no consumo de alimentos industrializados e com alto teor de frutose, encontrado facilmente em refrigerantes ou bebidas adoçadas.

A porcentagem de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesos aumentou em quase 50% nas últimas duas décadas, onde aproximadamente cerca de 40% das crianças com sobrepeso atualmente continuarão a aumentar de peso durante a adolescência e cerca de 75-80% dos adolescentes obesos se tornaram adultos com elevado grau de obesidade (LIFSHITZ, F., 2008). Ainda, pesquisas mostram que aproximadamente 60% da população brasileira em geral apresenta alterações deletérias decorrentes da SM (VIDIGAL et al., 2013; SILVA et al., 2011; NG et al., 2014). Paralelo ao consumo precoce de alimentos com alta densidade energética, o uso de fármacos GCs pode ser um fator que requer atenção, uma vez que sua prescrição pode iniciar precocemente na população. Os GCs apresentam ação terapêutica para o tratamento de doenças com base inflamatória e estimou-se que cerca de 10 milhões de prescrições novas de GC foram feitas nos EUA no ano de 2002 (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002). Em um estudo realizado na Inglaterra, com indivíduos acima de 18 anos, foi demonstrado que cerca de 1,6 milhões de prescrições foram emitidas, para cerca de 244 mil usuários de tratamentos orais com GC, representando cerca de 0,9% da população adulta (VAN STAA et al., 2000).

Considerando a alta prevalência das bebidas adoçadas nas dietas ocidentais e a interação de padrão alimentar com terapias baseadas em GCs, buscamos propor um novo modelo experimental, avaliando os efeitos combinados de ambos tratamentos já reconhecidos por induzirem à SM quando administrados separadamente (ALZAMENDI et al., 2012a; ANDRE et al., 2009; SHELUDIAKOVA; ROONEY; BOAKES, 2012b), com o intuito de obter um modelo experimental de DM2, baseado na presença de hiperglicemia persistente. Ainda buscamos avaliar o impacto que teria a suplementação com o óleo de peixe ou da retirada destas substâncias (frutose e GC) da água.

Nossa hipótese inicial é que a administração conjunta dos tratamentos 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.

6. OBJETIVOS

6.1 GERAL

Avaliar os efeitos da administração combinada de frutose e prednisolona na água de beber no período de 90 dias, em ratos machos Wistar, sobre parâmetros metabólicos do animal e morfofuncionais de órgãos relacionadas à homeostase glicêmica e lipídica, bem como o impacto atenuador da suplementação com óleo de peixe. Ainda, avaliar a capacidade de reversão ou manutenção das eventuais alterações causadas pela frutose e prednisolona após 90 dias da interrupção dos tratamentos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliação de parâmetros murinométricos para caracterização do modelo experimental, como peso corpóreo e ingesta alimentar e hídrica;
- avaliação de parâmetros plasmáticos relacionados à homeostase glicêmica e lipídica, como glicemia e insulinemia em jejum, perfil lipídico, uricemia, entre outros;
- avaliação da responsividade lipolítica do tecido adiposo epididimário e retroperitoneal ao estímulo beta-adrenérgico;
- avaliação do conteúdo de gordura e glicogênio hepático;
- avaliação de parâmetros morfológicos e estruturais como massa absoluta e relativa de órgãos metabólicos
- avaliação e quantificação de parâmetros morfométricos no tecido pancreático (massa de células β), adiposo (área, perímetro e diâmetro de adipócitos) e hepático (distribuição de gordura intracelular);

7. MATERIAS E MÉTODOS

7.1 ANIMAIS:

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, alocados em 5 animais

por gaiola, ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas (6:00 – 18:00 luz acesa), alimentados com ração comercial padrão (Nuvilab®, Nuvital) e água filtrada *ad libitum* acrescida de tratamento específico para cada grupo. As metodologias empregadas in vivo neste projeto foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC com protocolo de nº PP00782.

7.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os ratos foram alojados e aclimatados no biotério setorial até atingirem 40 dias de vida, com n amostral de 10-15 por grupo, quando então foi iniciado os tratamentos como segue:

1) grupo controle (CTL, n=10) – os animais receberam água potável (filtrada) *ad libitum*;

2) grupo frutose (FRU, n=10) – os animais receberam água potável (filtrada) acrescida de 20% frutose (w/v) (Synth, Diadema, SP, Brasil) *ad libitum* a partir do 40º dia de vida e seguido pelos próximos 90 dias (130º dia de vida). A escolha da concentração de frutose foi baseada na densidade calórica da frutose e descrito previamente (MAMIKUTTY et al., 2014a; NOVAK et al., 2015). A introdução da frutose foi realizada de forma escalonada, evitando a sobrecarga hepática aguda, iniciando com 4% (1º, 2º e 3º dias) e seguir com 8% (4º, 5º e 6º dias), 12% (7º e 8º dias), 16% (9º e 10º dias) e a partir daí seguimos com 20% de solução de frutose.

3) grupo prednisolona (PRED, n=10) – os animais receberam água potável (filtrada) acrescida de 12µg/mL prednisolona (Prelone® Aché, Campinas, SP, Brasil; 0,4Kcal/mL) *ad libitum* a partir do 40º dia de vida e seguirá pelos próximos 90 dias (130º dia de vida). A escolha da concentração de prednisolona foi baseada em trabalhos prévios (Karatsoreos et al. 2012; Fransson et al. 2013) e em estudos pilotos (não apresentados) realizados pelo nosso laboratório. A introdução da prednisolona foi realizada de forma escalonada para evitar sobrecarga hepática aguda. Iniciado com 2 µg/mL (1º, 2º e 3º dias) e seguir com 4 µg/mL (4º, 5º e 6º dias), 6 µg/mL (7º e 8º dias), 8 µg/mL (9º e 10º dias) e a partir daí seguindo com 12 µg/mL de solução de prednisolona;

4) grupo frutose + prednisolona (FP, n=15) – os animais receberam, concomitantemente, os mesmos tratamentos dos grupos FRU e PRED;

5) grupo FP + óleo de peixe (FPO, n=15) – os animais foram tratados como no grupo FP. A suplementação com o óleo de peixe (1 g/kg peso corpóreo) (Yamazaki et al. 2011) foi realizada por via intragástrica

(gavagem), e se deu após 45 dias do início do tratamento com FP, sendo portanto, a partir do 85º dia de vida e seguida por 45 dias. A suplementação ocorreu uma vez ao dia, entre 8:00 e 9:00, ao longo dos 7 dias da semana.

6) Grupo óleo de peixe (OP, n=10) – os animais receberam água potável filtrada normalmente como no grupo C ao longo de todo período experimental. Foram suplementados com óleo de peixe nos mesmos moldes do grupo FPO.

7) grupo FP + reversibilidade (REV, n=10) – após os 90 dias de tratamento com solução de frutose e prednisolona um grupo de animais FP foi mantido com água potável (sem frutose e prednisolona) e ração padrão, pelos próximos 90 dias. Após estes animais foram eutanasiados e o sangue e tecidos coletados para análises.

Os grupos CTL, FRU, PRED, FP e REV receberam suplementação de óleo mineral (1g/kg peso, via gavagem) ao longo dos 7 dias da semana, a partir do 45º dia de vida até o 90º dia e nenhum sinal de diarreia ou fezes amolecidas foram notadas.

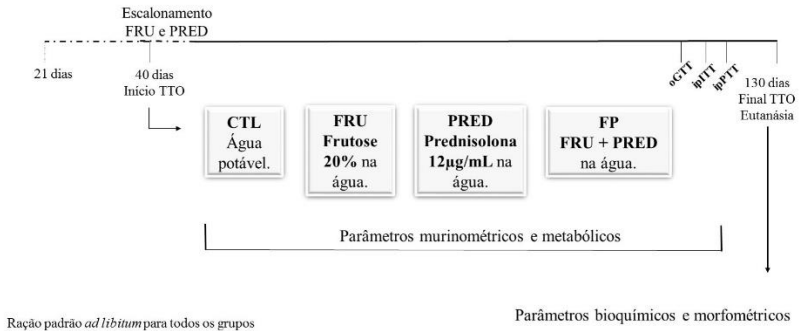
Na Tabela 4 a seguir pode ser observado a composição de ácidos graxos presentes no óleo de peixe comercial (NatueBounty®), determinada por meio de HPLC (cromatografia líquida de alta performance).

Tabela 4: percentual de ácidos graxos nas hemácias presente no óleo de peixe.

Ácidos Graxos	%
EPA	25,15
DHA	18,26
Mirístico	10,54
Palmitoléico	11,87
Linoléico	2,79
Palmítico	16,75
Óleico	10,56
Estearico	3,88

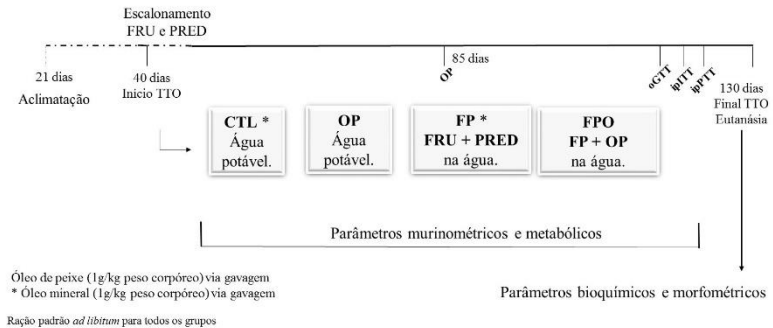
Na presente dissertação, os resultados estão apresentados em 3 módulos distintos, onde no módulo 1 temos os resultados de caracterização do modelo experimental, composto pelos grupos: controle (CTL), grupo frutose (FRU), prednisolona (PRED), e frutose+prednisolona (FP), como demonstrado no esquema abaixo (1).

1) Esquema resultados Módulo 1



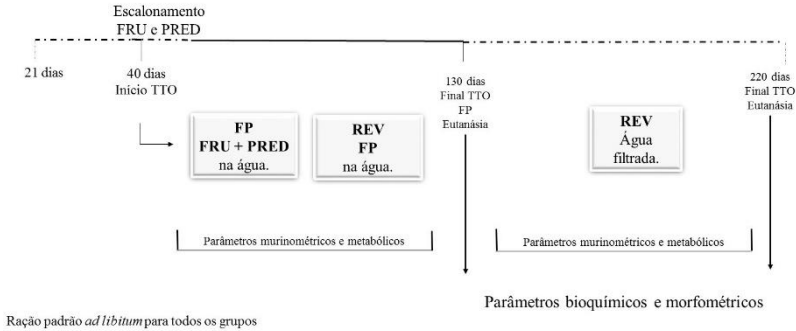
A avaliação da suplementação com óleo de peixe, esta apresentada no módulo 2, representada pelos grupos: óleo de peixe (OP), e grupo FP + suplementação com óleo de peixe (FPO), além de incluir os grupos CTL e FP, como demonstrado no esquema 2 abaixo:

2) Esquema de resultados Módulo 2



Os dados do grupo reversibilidade (REV), caracterizando o efeito da retirada do insulto ao longo dos 90 dias, encontram-se no módulo 3, como demonstrado pelo esquema 3 abaixo:

3) Esquema de resultados Módulo 3



Ração padrão *ad libitum* para todos os grupos

Parâmetros bioquímicos e morfométricos

7.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS

Peso corpóreo: foi realizada determinação do peso corpóreo semanalmente a partir do 40º dia de vida até o momento da eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL, Campinas, SP, Brazil).

Ingestão alimentar e hídrica: foi verificada uma vez por semana até o momento da eutanásia. Foi mensurada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) e/ou água remanescente, descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representou a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração/água ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração/água ingerida por gaiola pelo número de animais por caixa. Os resultados foram expressos em gramas/mL ingeridos por quilo de peso corpóreo para se obter a normalização deste parâmetro.

Ingestão calórica: foi determinada pela quantidade de ração ou água ingeridos somado às kcal atribuídas à frutose, prednisolona e óleo de peixe, para os respectivos grupos que tiverem tratamentos com os mesmos.

7.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

Glicose sanguínea, insulina, triacilglicerol plasmáticos e ácido úrico: A glicemia e TG foram quantificadas de 10 em 10 dias após 12h de jejum e imediatamente antes da eutanásia, através do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir de gota de sangue obtida da ponta da cauda. Para determinação do TG foi coletado 80 µl de sangue, obtidos da ponta da cauda previamente anestesiada por uso tópico de lidocaína 5%, e conduzidos à centrifuga

refrigerada para centrifugação 600 x g por 10 min e o plasma armazenado a -80°C para posterior quantificação por espectrofotometria, de acordo com instruções dos fabricantes e com detalhes previamente publicados (Rafacho et al. 2008; 2009). A insulinemia e ácido úrico foram determinadas apenas no dia da eutanásia, sendo obtida do plasma oriundo do sangue coletado a partir do tronco (pós-decaptação) pelo sistema AlphaLisa® - microesferas – Enspire® Perkin Elmer de acordo com instruções dos fabricantes.

Glicogênio e Gordura Hepáticos: Para quantificação do glicogênio hepático aproximadamente 300 a 500 mg do tecido foi digerido em solução de KOH 30% em tubos de ensaio em banho maria fervente por 1 h. Em seguida, acrescido Na₂SO₄ e etanol. O material foi homogeneizado e conduzido ao banho-maria novamente por 15s. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo lípides saponificados, aminoácidos, etc foi descartado e o “pellet” ressuscitado em água destilada quente. Com adição de etanol em seguida, e após um novo aquecimento rápido em banho maria o material foi então centrifugado. Após diluição do precipitado em H₂O destilada, o conteúdo de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol (Lo et al., 1970). Para quantificação da gordura hepática aproximadamente 100 mg de fígado foi homogeneizado (UltraTurrax, IKA®) em 700 µl de NaCl 1M seguido pela adição de 7,5 ml de solução metanol/clorofórmio (1:2, v/v). Após centrifugação, foi feita coleta da fase metanólica (contém os lípides) e seguida pela secagem por meio de N₂ gasoso. Após, foi realizada suspensão em 500 µl de solução Triton X100/metanol (2:1) e dosagem do triacilglicerol por espectrofotometria, de acordo com instruções dos fabricantes e com detalhes previamente publicados (Rafacho et al. 2007; 2008a; 2009).

Teste de tolerância à glicose oral (oGTT): Foi realizado a 2 semanas antes da eutanásia em animais jejuados (12h) e conscientes. Os animais tiveram a extremidade 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 após foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo, o.g.) e coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito no processo de quantificação para glicose sanguínea (Rafacho et al. 2007; 2008a; 2009).

Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT): Foi realizado a 1 semana antes da eutanásia em metade do ‘n’ experimental em animais alimentados, onde os animais tiveram a extremidade 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. Em seguida, receberam injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a 1 unidade/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem da concentração de glicose sanguínea nos tempos 10, 20, 30 e 40 min. A constante de decaimento de glicose (K_{ITT}) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 45min (Rafacho et al. 2007; 2008a).

Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT): foi realizado 5 dias antes da eutanásia em metade do ‘n’ experimental em animais jejuados (12h). A determinação da glicemia no tempo 0 foi realizada como descrito no oGTT. Em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal com solução de piruvato de sódio pH 7.4 (Sigma) (250 mg/mL) equivalente a 1,25g /kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram então coletadas para dosagem das concentrações de glicose sanguínea nos tempos 30, 60, 120 e 150 min (Ferreira et al. 2012).

Lipólise do tecido adiposo: No dia da eutanásia, fragmentos da gordura epididimária e retroperitoneal de cada grupo experimental foram coletados para determinação da lipólise estimulada por isoproterenol (Sigma). Para tal, fragmentos do tecido adiposo (100 mg) foram incubados em solução de Krebs (pH 7.4), gaseado com mistura carbogênica contendo 5% CO₂, 95% O₂ e suplementado com 1% de albumina sérica bovina pelo período de 60 minutos a 37°C na presença ou ausência de 20 µmol/l isoproterenol sob agitação constante. Ao final da incubação, amostras do meio foram coletadas e mantidas em gelo. A determinação do glicerol foi realizada pelo ensaio colorimétrico enzimático de acordo com Bucolo & David (1973).

Composição de ácidos graxos em hemácias: para avaliar a incorporação dos ácidos graxos nas hemácias, o perfil de ácidos graxos plasmáticos foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (do inglês - High Performance/Pressure Liquide Chromatography - HPLC), segundo Nishiyama-Naruke et al., (1998). Para extração lipídica de hemácias, foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Folch et al (1957). Para saponificação dos extratos lipídicos os extratos lipídicos, obtidos foram ressuspensos em 100 µl de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria sob agitação (NISHIYAMA-NARUKE et al, 1998). 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, sendo posteriormente o solvente evaporado em nitrogênio gasoso e seguido a derivatização com BMCC (Bromo metil metoxi coumirin). A derivatização dos ácidos graxos ocorreu pela reação baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). Após derivatização, pequenas alíquotas desta solução foram injetadas em um sistema HPLC, separados em coluna analítica de fase reversa: Sigma®- MV-C8 4,6 mm i.d.x 25 cm com partículas de 5 µm (Supelco®), A análise cromatográfica foi efetuada com um módulo de separação Waters Alliance e2695 composto por uma bomba quaternária, degaseificador, detector amperométrico eletroquímica (Waters, Milford, MA, EUA). Foram injetados 1,6 µL dos derivados diluídos, que foram eluídos isocriticamente através do gradiente binário de acetonitrila e água (70-30%) em 80 minutos de corrida em temperatura de 15°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente pelo detector de fluorescência (2475 multi fluorescence detector - waters), com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm e os dados registrados e integrados pelo software Empower Pro Version 2.0. Os dados foram expressos em porcentagem, e utilizados para a curva padrão um pool de ácidos graxos na concentração de 40 µg/ml (ecosapentaenóico, docosahexaenóico, mirístico, araquidônico, palmitoléico, linoléico, palmítico, oléico e esteárico).

Massa absoluta e relativa de tecidos/órgãos: após coleta de sangue os órgãos de interesse (gordura epididimária, gordura retroperitoneal, gordura omental, gordura marrom, fígado, rins, baço, adrenal e pâncreas foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL).

7.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

2Para análise de parâmetros morfométricos foi utilizado n amostral completo dos grupos, como já mencionado acima, com uma amostra de secção por animal para cada tecido.

Massa de células β: Para o estudo de aspectos morfológicos e a mensuração da massa das células β, foi coletado pâncreas de cada grupo experimental, sendo os linfonodos e o tecido adiposo removidos para posterior pesagem do órgão. A porção esplênica do pâncreas foi selecionada e em seguida o fragmento foi fixado por imersão em formalina 10% tamponada pelo período de 24h em temperatura ambiente, após sendo desidratados e embebidos em parafina. Duas secções no maior plano do fragmento (4µm) foram obtidas em micrótomo rotativo e aderidas em lâminas sinalizadas individuais. Uma secção foi armazenada

e outra imunocorada com insulina para realização de análise morfológica e estereológica (Rafacho et al. 2008b; 2009). A distribuição celular da insulina foi detectada utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta. Após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina de Harris e montadas para observação microscópica e obtenção de imagens (Rafacho et al. 2009; 2010b; 2011). As imagens obtidas pelo equipamento digitalizador de lâminas automático AxioScan (ZEISS, Oberkochen, Alemanha), e a determinação da área total do pâncreas, bem como área total para imunomarcção de insulina nas ilhotas relativo à porção esplênica analisada, foi realizado pelo software ZenLite (Blue edition, ZEISS, Oberkochen, Alemanha)

Para determinação da massa relativa de células beta foi utilizado percentual de células beta por área analisada multiplicando-se pela massa total do pâncreas, sendo em seguida normalizada pelo peso de cada animal, resultando na massa de células β em mg/100g de peso corpóreo. As fotos representativas foram obtidas em microscópio invertido Olympus IX-83.

Determinação da distribuição intracelular de lipídeos hepáticos: fragmentos de fígado (lobo caudado) foram coletados no dia da eutanásia e alocados em cassetes histológicos, sendo fixados em paraformaldeído 4%, por 48 h a 4°C para posterior processamento. Cortes histológicos de 5 μ m do fígado de cada grupo experimental foram obtidas em micrótopo rotativo e aderidas em lâminas de vidro. Em seguida, foram coradas com Hematoxilina e Eosina para posterior quantificação do score de esteatose hepática como descrito a seguir. Foram definidos 2 padrões de gotículas lipídicas (macro gotículas e micro gotículas). A contagem foi realizada pelo método de estereologia convencional aplicando-se uma ocular com retículo de 100 pontos (intersecção de 10 linhas horizontais por 10 linhas verticais) e cada campo (em aumento de 200x) contemplando toda a área de uma secção (média de 200 campos por grupo) foi analisado. Os pontos incididos sobre macro e micro gotículas foram divididos pelo número total de pontos incididos sobre a secção e multiplicado por 100 para se obter o dado em % por área de secção. As análises foram realizadas pelo microscópio Olympus BX-43 e as fotos representativas foram obtidas em microscópio invertido Olympus IX-83 (BRUNT et al., 1999; KLEINER et al., 2005).

Morfometria de tecido adiposo: fragmentos de tecido adiposo epididimário (lado direito) foram coletados no dia da eutanásia e fixados em paraformaldeído 4% por 48h, a 4°C, para posterior processamento. Os cortes histológicos foram realizados em micrótopo rotativo (5 μ m) e aderidos em lâminas de vidro, para posterior coloração com Hematoxilina

e eosina. As imagens foram obtidas pelo digitalizador de lâminas automático AxioScan (ZEISS, Oberkochen, Alemanha), e quantificados os valores de área, perímetro e diâmetro de adipócitos de cerca de 300-500 células por animal com o uso do software ZenLite (Blue edition, ZEISS, Oberkochen, Alemanha). As fotos representativas foram obtidas em microscópio invertido Olympus IX-83.

7.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram compilados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa estatístico Grapgpdp Prism v.5.01 (Graphpah Inc.; La Jolla, USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para dados contínuos que apresentaram distribuição normal, foi aplicada análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguido de post test Tukey, ou utilizado ANOVA para medidas repetidas para análises do grupo REV quando necessário. Para dados contínuos que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado Kruskal-Wallis ANOVA seguido do post test Dunn sendo apresentados como mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado teste t de Student quando necessário, sendo dependente (pareado) ou independente (não pareado). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS MÓDULO 1

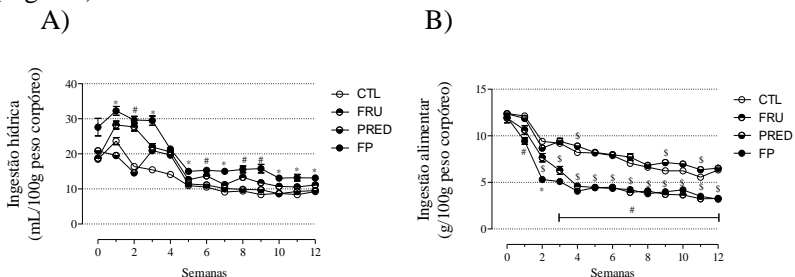
8.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Para caracterização do modelo experimental, como um potencial modelo para desenvolvimento de SM, foram utilizados 4 grupos experimentais, sendo eles: CTL, FRU, PRED e FP, onde estes resultados serão apresentados separadamente neste primeiro módulo, observando principalmente o efeito dos tratamentos combinados de frutose e prednisolona.

8.1.1 Animais tratados com FP apresentaram maior ingestão hídrica e menor consumo alimentar durante o tratamento, com aumento transitório no consumo calórico.

Os animais que receberam FP na água de beber apresentaram maior consumo hídrico quando comparados aos grupos CTL e PRED nas semanas 2, 6, 8 e 9, enquanto nas semanas 1,3,5,7,10,11 e 12 comparados com os demais grupos (CTL, FRU e PRED) (Fig. 4A). Para este parâmetros observamos que os valores iniciais (semana 0) encontram-se aumentados mesmo sem a adição do tratamento, podendo ser considerado fatores como microbiota individual do animal, número de animais por gaiola, ou outros fatores individuais decorrentes à este aumento.

Ainda, estes animais apresentaram uma redução no consumo alimentar quando comparado com os grupos CTL, FRU e PRED na 2ª semana, mantendo seus valores reduzidos da 3ª semana até o final do tratamento quando comparados com o grupo CTL e PRED apenas (Fig. 4B). Com relação ao consumo calórico, podemos observar que os animais tratados com FP apresentaram aumento dos seus valores na 2ª semana quando comparado com os grupos CTL e PRED, e na 3ª semana com relação ao grupo FRU apenas, sendo normalizada ao longo do tratamento (Fig. 4C).



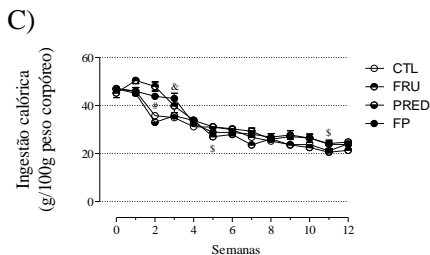


Figura 4: Ingestão hídrica é aumentada nos animais tratados com FP e ingestão alimentar é reduzida, com alteração transitória no consumo calórico. Dados são média \pm EPM ou mediana e intervalo interquartil. (\$) indica diferença significativa com relação ao grupo CTL; (&) indica diferença com relação do grupo FP vs F (#) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL e PRED; (*) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL, FRU e PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (semanas 1,2,3,5,6,7,10,11 e 12 para ingestão hídrica; todos os pontos para ingestão alimentar; semanas 0,2,4,5,6,7,9,10,11 e 12 para ingestão calórica) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (semanas 0, 4, 8 e 9 para ingestão hídrica; semanas 1,3 e 8 para ingestão calórica), $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.2 Tratamento com FP resulta em redução significativa do peso corpóreo ao longo do tratamento.

Observamos uma redução do peso corpóreo dos animais que receberam tratamento concomitante quando comparados ao grupo FRU na 1ª semana de tratamento (FP=201,3 \pm 5,6 g vs. FRU=224,4 \pm 8,5 g, $p=0,04$), mantendo esta redução de peso significativa da 3ª semana com relação ao grupo CTL e FRU (FP= 236,7 \pm 7,2 g vs CTL=279,2 \pm 5,7 g e FRU= 287,4 \pm 9,1 g, $p < 0,0001$) sendo observada até o final do tratamento (FP= 330,4 \pm 10 g; CTL= 414,6 \pm 11,4 g; FRU= 440 \pm 14,4 g, $p < 0,0001$). Além disso, os animais que receberam apenas PRED apresentaram redução de peso significativa quando comparado com o grupo CTL, sendo observado da 4ª (PRED= 267,6 \pm 6,2 g vs CTL= 305,8 \pm 6,2 g, $p < 0,0001$) à 12ª semana de tratamento (PRED= 350,8 \pm 12 g vs CTL= 414,6 \pm 11,4 g, $p < 0,0001$) demonstrando que a redução do peso corpóreo dos animais que receberam frutose e prednisolona pode ser predominantemente pelo efeito da prednisolona (Fig. 5).

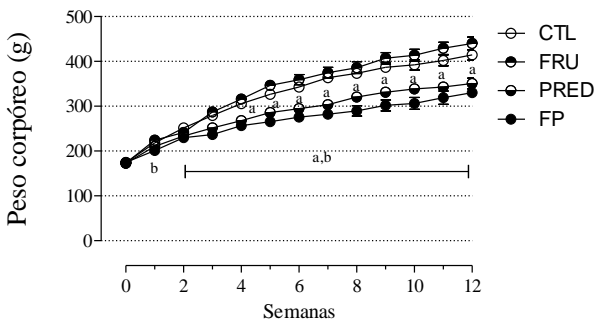


Figura 5: Tratamento com FP resulta em redução do peso corpóreo ao longo do tratamento. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.3 Tratamento concomitante promove alterações transitórias na glicemia de jejum e hipertriacilgliceridemia ao longo do tratamento.

Os animais que receberam tratamento concomitante de FP não apresentaram alterações das concentrações de glicose plasmáticas, quando comparado com o grupo CTL ao longo do tratamento, no entanto, apresentaram redução significativa quando comparadas com o grupo FRU observadas na 2ª quinzena (FP= $93 \pm 1,9$ mg/dL vs FRU= $103,8 \pm 2,5$ mg/dL, $p=0,0017$), 3ª (FP= $93,6 \pm 2,2$ mg/dL vs FRU= $106,4 \pm 3,2$ mg/dL, $p=0,0214$) e 4ª quinzena (FP= $88,2 \pm 1,2$ mg/dL vs FRU= $99,2 \pm 2,9$ mg/dL, $p=0,0003$), sendo normalizada ao final do tratamento (FP= $91,8 \pm 1,4$ mg/dL vs FRU= $91,2 \pm 1,8$ mg/dL, $p=0,2788$) (Fig. 6A). Podemos observar no cálculo da área abaixo da curva que o tratamento, predominantemente pelo efeito da prednisolona, impede o aumento induzido pela frutose, uma vez que o grupo FP apresenta redução da área abaixo da curva quando comparado com o grupo FRU (FP= $87,4 \pm 6,2$ mg/dL/dia; FRU= $148,1 \pm 7,5$ mg/dL/dia, $p < 0,0001$) (Fig. 6B).

Ainda, o tratamento concomitante resultou em aumento nas concentrações de triacilglicerol plasmático quando comparados com os grupos CTL e PRED na 2ª, 3ª, 4ª e 6ª quinzena, apresentando uma razão de aumento de 45% e 41%; 56%; 28% e 27%; 65 e 90% respectivamente. No entanto, na 5ª quinzena os animais apresentaram aumento significativo apenas com relação ao grupo PRED (39%), e na 7ª quinzena

apenas quanto ao grupo CTL (29%) (Fig. 6C), podendo ser observado o efeito predominantemente da frutose neste parâmetro, uma vez que os animais do grupo PRED não apresentaram hipertriacilgliceridemia ao longo do tratamento. O grupo FP apresentou maior área no cálculo de área abaixo da curva para triacilglicerol quando comparado com o grupo CTL (Fig. 6D).

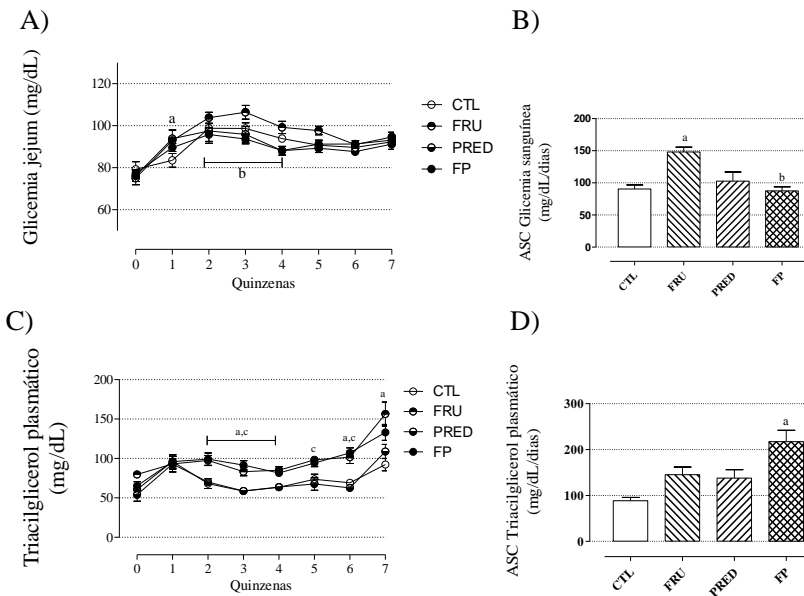


Figura 6: Tratamento com FP promove alterações transitórias na concentração plasmática de glicose e hipertriacilgliceridemia. Dados são média \pm EPM ou mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (Fig. 6A, B e C) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (Fig. 6D), $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

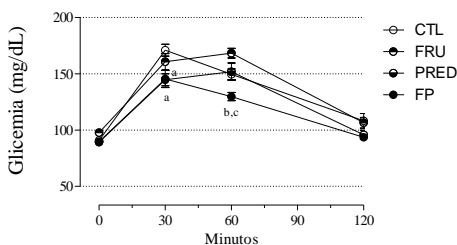
8.1.4 Tratamento concomitante de frutose e prednisolona deixa animais mais sensíveis à glicose, porém promove redução da sensibilidade à insulina, sem alteração no teste de tolerância ao piruvato.

Afim de verificar se o tratamento concomitante altera a tolerância a glicose e sensibilidade periférica à insulina, foram realizados testes de

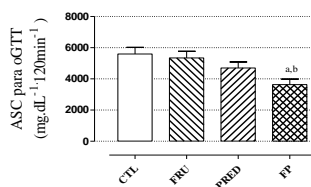
tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato. Na figura 7A e 7B, podemos observar que o grupo FP apresentou redução da glicemia no teste tolerância à glicose após a sobrecarga com glicose, sendo observado uma diferença significativa no tempo 30 min com relação ao grupo CTL (FP= $145,3 \pm 7,5$ mg/dL e CTL= $170,9 \pm 5,3$ mg/dL), e no tempo 60 min com relação aos grupos FRU e PRED (FP= $129,7 \pm 3,7$ mg/dL; FRU= $168,3 \pm 4,2$ mg/dL; PRED= $151,8 \pm 7,7$ mg/dL). Porém, no cálculo da área abaixo da curva da glicose, o grupo FP apresentou redução da área apenas quando comparado com os grupos CTL e FRU (FP= $3,634 \pm 352,1$ mg/dL⁻¹.120min⁻¹; CTL= $5,596 \pm 430,2$ mg/dL⁻¹.120min⁻¹; FRU= $5,346 \pm 431,8$ mg/dL⁻¹.120min⁻¹) (Fig. 7A e 7B).

Além disso, os animais tratados com frutose e prednisolona apresentam maiores concentrações de glicose plasmática no teste de sensibilidade à insulina, quando comparados com o grupo CTL e FRU no tempo 40 min (FP= $72,5 \pm 2,8$ mg/dL; CTL= $58,7 \pm 3$ mg/dL; FRU= $58,6$ mg/dL ± 3 mg/dL), também sendo observado redução no cálculo da constante de decaimento da glicose, indicando redução da sensibilidade à insulina (FP = $0,88 \pm 0,09$ % min⁻¹; CTL= $1,37 \pm 0,12$ % min⁻¹; FRU= $1,32 \pm 0,08$ % min⁻¹), sendo este efeito induzido predominantemente pelo tratamento com prednisolona, uma vez que o grupo PRED isoladamente também apresentou esta redução quando comparado com o grupo CTL (Fig. 7C e 7D). Quando observado o teste de tolerância ao piruvato, o tratamento concomitante não resulta em alterações nesse parâmetro, e nem modificações no cálculo de área sobre a curva (Fig. 7E e 7F).

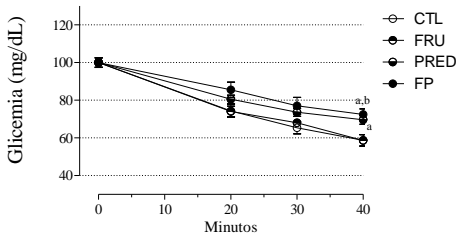
A)



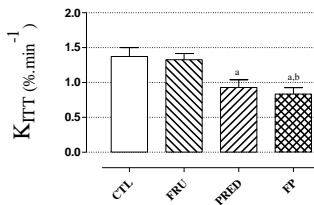
B)



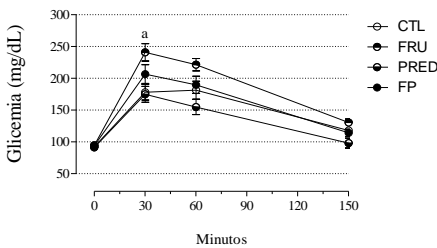
C)



D)



E)



F)

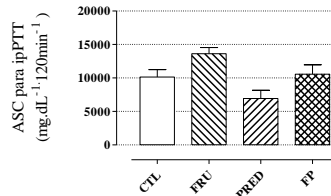


Figura 7: Tratamento com FP promoveu melhora transitória da tolerância à glicose, com redução da sensibilidade à insulina, sem alteração no teste de tolerância ao piruvato. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.5 Tratamento crônico concomitante resulta em hiperinsulinemia e hiperuricemia plasmática.

Foram analisadas, apenas no dia da eutanásia, as concentrações de insulina plasmática de jejum, sendo observado hiperinsulinemia nos grupos PRED e FP quando comparado ao grupo CTL, sendo CTL= 62,9 (49,4;84 pg/mL); PRED= 260,7 (132,8;326,8 pg/mL) e FP= 284,7 (218,8;381,6 pg/mL), demonstrando o efeito predominantemente da prednisolona neste parâmetro (Fig. 8A), Ainda, o tratamento com FP resultou em hiperuricemia, quantificadas apenas no dia da eutanásia, quando comparadas com os demais grupos, sendo FP= 1,21 \pm 0,07 mg/dL; CTL= 0,54 \pm 0,07 mg/dL; FRU= 0,80 \pm 0,12 mg/dL e PRED= 0,64 \pm 0,09 mg/dL, demonstrando o efeito deletério do tratamento combinado (Fig. 8B).

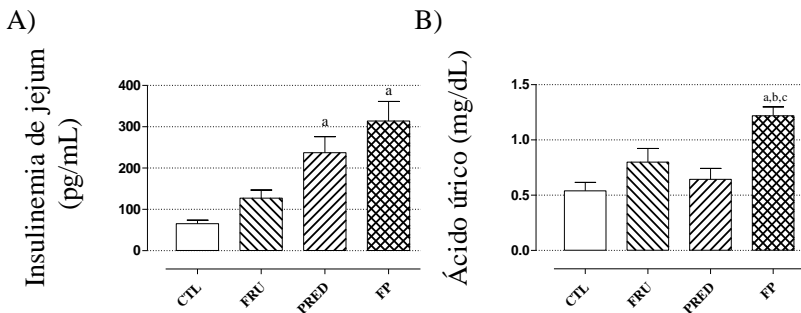


Figura 8: Tratamento com FP promove hiperinsulinemia e hiperuricemia plasmáticas ao final do tratamento. Dados são média \pm EPM ou mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (Fig. 8B) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (Fig. 8A), $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.6 Animais tratados com FP apresentam aumento do conteúdo de triacilglicerol e glicogênio hepático.

O grupo FP apresentou maior conteúdo de triacilglicerol hepático quando comparado com os grupos CTL e PRED, sendo esta elevação de aproximadamente 49% e 31,4%, respectivamente (Fig. 9A), além de ser observado maior conteúdo de glicogênio hepático, quando comparadas com os mesmos grupos, apresentando uma elevação de aproximadamente 27% e 20%, respectivamente (Fig. 9B).

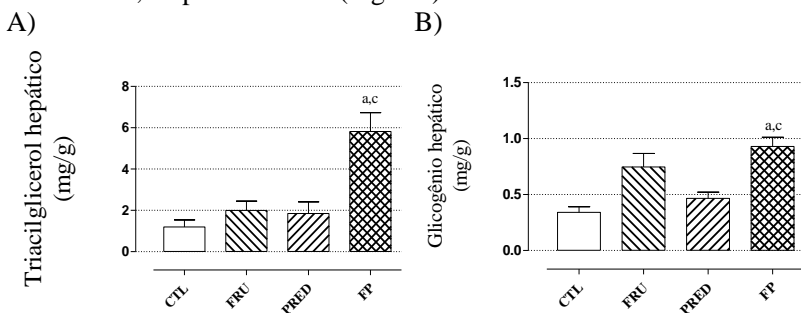


Figura 9: Tratamento crônico de FP resulta em maior conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.7 A combinação de frutose e prednisolona não altera a atividade lipolítica do tecido adiposo epididimário e retroperitoneal.

Os animais que receberam tratamento concomitante apresentaram aumento significativo na liberação de glicerol quando estimulados com isoproterenol (estimulado) em relação ao seu estado basal (não estimulado), porém sem diferença significativa em comparação os outros grupos experimentais após o estímulo, não demonstrando, portanto, nenhuma alteração lipolítica com o tratamento (Fig. 10A e B). Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado também não apresentaram alterações entre os grupos (Fig. 10C e D).

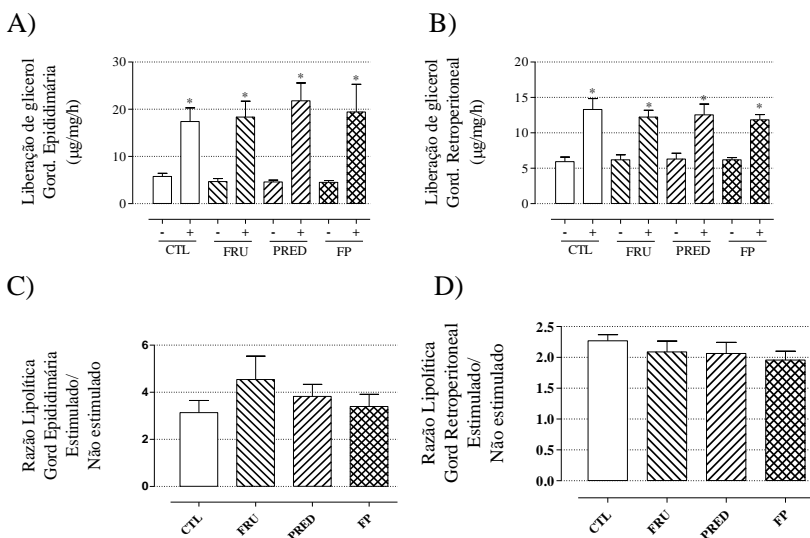


Figura 10: Tratamento com FP não resulta em aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo epididimário e retroperitoneal. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo FP vs FRU; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post-test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

8.1.8 Tratamento concomitante resulta em alteração da massa relativa de órgãos.

O tratamento concomitante de frutose e prednisolona resultou em alterações em diversos órgãos como: aumento do peso relativo do pâncreas quando comparado com FRU, e aumento do peso relativo das

gorduras epididimária (CTL e PRED), retroperitoneal (FRU) e omental (PRED) e gordura marrom quando comparado com o grupo CTL. Também foi observado um aumento significativo no peso do fígado no grupo FP quando comparado com os grupos CTL, FRU e PRED.

Tabela 5: Massa relativa de tecidos e órgãos de ratos tratados com FP.

	CTL	FRU	PRED	FP
PÂNCREAS (g/100g)	0,28±0,012	0,27 ±0,007	0,3±0,008	0,32 ±0,010 ^b
GORD. EPI (g/100g)	1,18 ± 0,07	1,84 ± 0,11 ^a	1,53±0,07	2,04 ± 0,12 ^{a,c}
GORD. RETRO (g/100g)	1,67 ± 0,14	2,81 ± 0,18 ^a	1,51±0,13	1,68 ± 0,14 ^b
GORD. OMENTAL (mg/100 g)	135 (90;160)	208 (170;270)	127 (95;140)	259 (129;362) ^c
GORD. MARROM (mg/100 g)	80 (70;110)	100 (80;110)	110 (90;120)	126 (110;180) ^a
SOMA GORD. (g/100g)	3,08 ± 0,21	4,95 ± 0,27 ^a	3,29±0,20	4,12 ± 0,28 ^a
ADRENAIS (mg/100g)	16(15;17)	16(12;19)	16(15;18)	16(15;18)
FÍGADO (g/100g)	2,95 ± 0,10	3,06 ± 0,06	3,0 ± 0,05	3,4 ± 0,09 ^{a,b,c}
BAÇO (mg/100g)	210 ± 7	190 ± 8	190 ± 4	190 ± 3

Dados são média ± EPM ou mediana e intervalo interquartil (a) indica diferença significativa com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa com relação ao grupo FRU; (c) indica diferença significativa com relação ao grupo PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 10; PRED: n 10 e FP: n 13.

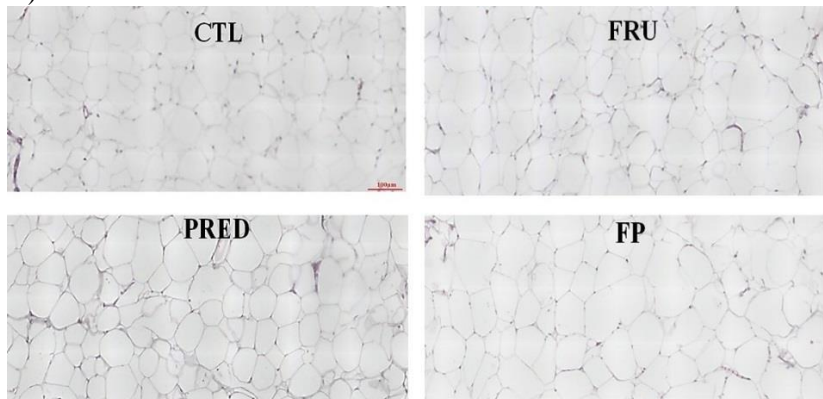
8.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS MÓDULO 1

8.2.1 Distribuição de área total, perímetro e diâmetro de adipócitos não apresentam alteração pelo tratamento concomitante.

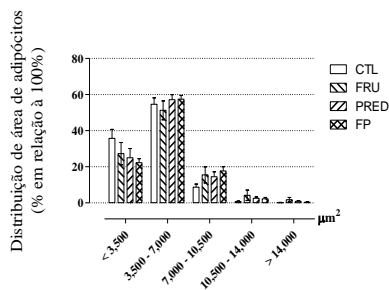
Os adipócitos foram quantificados e estratificados em diferentes tamanhos, para medidas de área total, perímetro e diâmetro afim de verificar uma possível hipertrofia ou hiperplasia dos adipócitos.

Na Figura 11A, é possível ter uma dimensão da morfologia dos adipócitos de todos os grupos experimentais. Não foi observada nenhuma alteração aparente no aspecto dos adipócitos nem nas variáveis quantificadas como descrito na sequência. O tratamento com frutose e prednisolona não resultou em alterações significativas da área (Fig. 11B), perímetro (Fig. 11C) e diâmetro dos adipócitos (Fig. 11D), o que não diferiu em relação aos outros grupos experimentais.

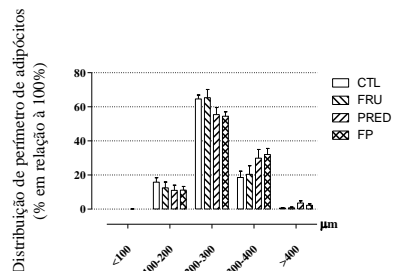
A)



B)



C)



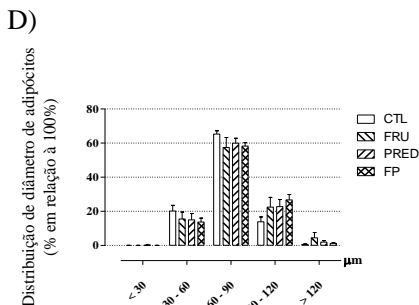


Figura 11: Tratamento com FP não promove alterações nos parâmetros morfométricos do tecido adiposo epididimário. Coloração utilizada H&E. Escala em 100µm. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa ao grupo FRU; (c) indica diferença significativa com relação ao grupo PRED. Teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 9; PRED: n 8 e FP: n 8.

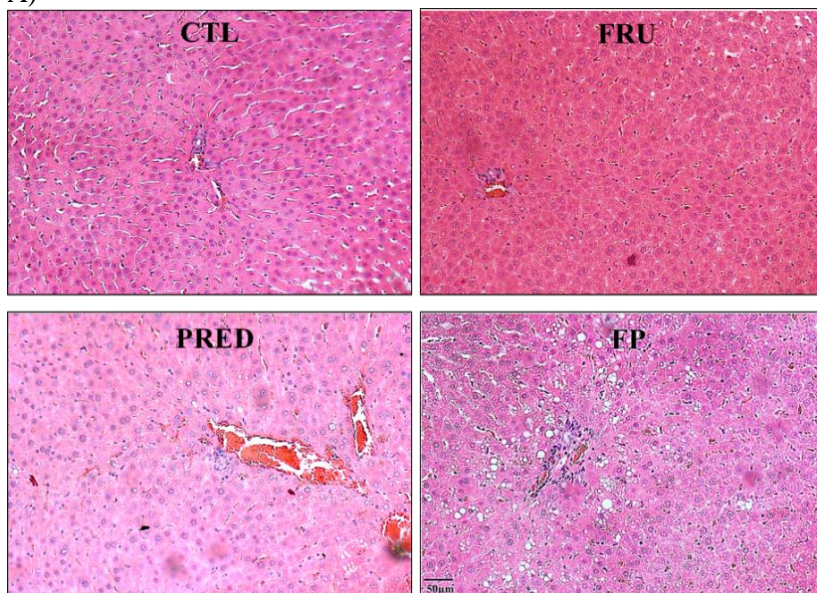
8.2.2 Tratamento concomitante promove maior acúmulo de lipídeos no fígado, caracterizando esteatose hepática.

Para determinação semiquantitativa de esteatose hepática, foi verificado a distribuição de lipídeos hepático baseado no padrão de macro e micro gotículas. Na figura 12A, é possível observar o perfil morfológico do fígado de todos os grupos experimentais, observando alterações no conteúdo lipídico, caracterizado pela presença de macro e micro gotículas.

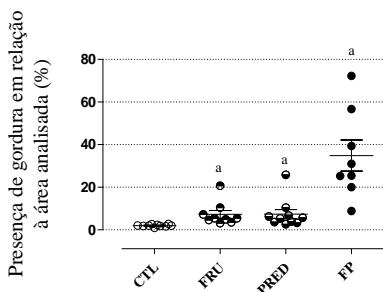
Quando observado o grupo FRU ou PRED, bem como grupo FP, observamos que os três grupos apresentaram aumento significativo no percentual de lipídeos hepáticos quando comparados com o grupo CTL = 1,95% (1,77;2,4 %), sendo de FRU = 5,18% (3,8;6,7 %) e PRED= 5,4% (3,4;6,5 %), onde o grupo FP apresentou aumento de 28,23% (21,3;52,4 %) quando comparado com o grupo CTL (Fig. 12B). Quando estratificados por macro ou micro gotículas, foi observado que o tratamento com FP apresentou maiores proporções de macro gotícula resultando em aumento de 12,73% (3,61;41,3 %) quando comparado aos grupos CTL e PRED (0,93% (0,54;1,41 %) e 0,38% (0,30;0,83 %) respectivamente) (Fig. 12C), bem como maiores proporções quando observados a presença de micro gotícula comparado com o grupo CTL e FRU (FP= 11,3% (6,8;24,4 %); CTL= 1,03% (0,5;1,3 %) e FRU= 2,34% (1,8;3,8 %) (Fig. 12D). Ainda podemos observar que o tratamento com PRED isoladamente resultou em aumento significativo no acúmulo de

micro gotícula de 4,67% (2,8;6,1 %) quando comparado ao grupo CTL com 1,03% (0,5;1,3 %) (Fig. 12C). Com base nesse perfil de macro e micro gotículas, podemos observar que para desenvolvimento de macro gotículas aparentemente o tratamento crônico com frutose parece ser mais deletério, enquanto que para desenvolvimento de micro gotículas a prednisolona parece ter efeito predominante.

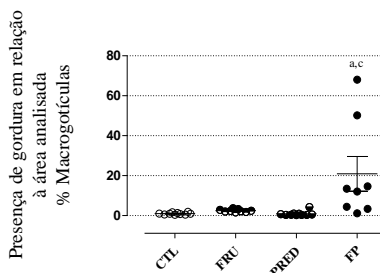
A)



B)



C)



D)

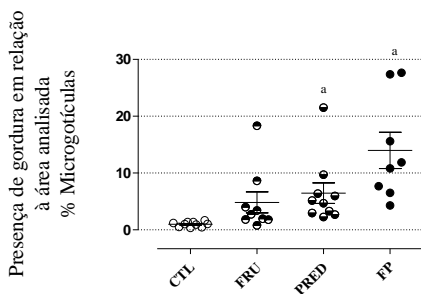
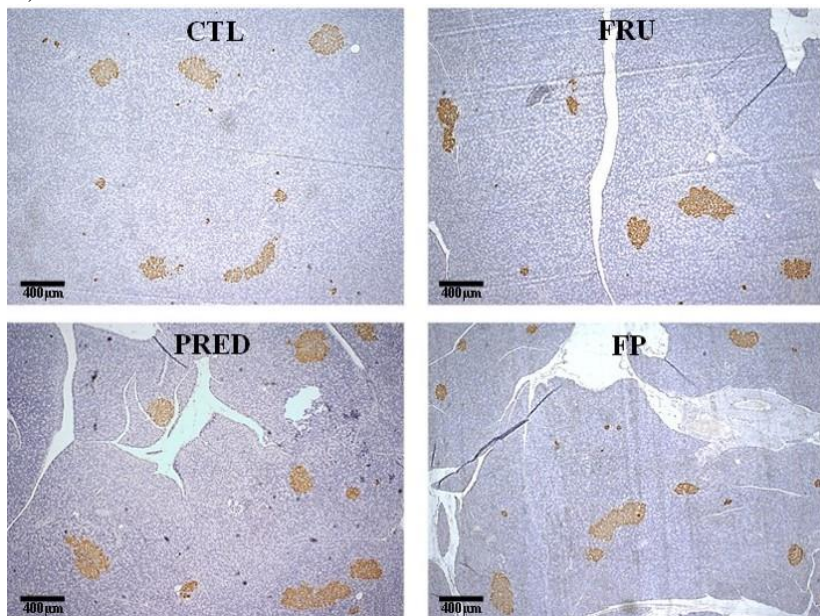


Figura 12: Tratamento com FP resulta em aumento de concentrações de lipídeos hepáticos. Coloração utilizada H&E. Escala em 50 μ m. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa com relação ao grupo FRU; (c) indica diferença significativa com relação ao grupo PRED. Teste Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; FRU: n 9; PRED: n 10 e FP: n 8.

8.2.3 Tratamento com FP promoveu aumento na massa relativa de células beta pancreáticas.

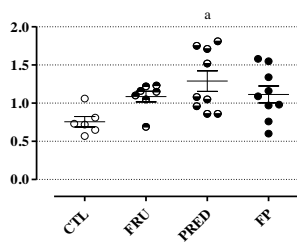
Secções pancreáticas imunocoradas para insulina demonstraram aumento da massa relativa de células beta, podendo ser observado no grupo FP e PRED (Fig. 13A). Além disso, foi observado aumento no percentual da massa de células β por área analisada no grupo PRED (Fig. 13B), bem como aumento da massa de células beta pancreáticas (mg) também no grupo PRED quando comparadas com o grupo CTL (Fig. 13C). Após realizada a normalização pelo peso corpóreo de cada animal, o grupo FP apresentou aumento na massa de células beta pancreáticas quando comparado com o grupo CTL, sendo de $FP = 3,30 \pm 0,28$ mg/100g peso corpóreo vs $CTL = 1,88 \pm 0,20$ mg/100 g peso corpóreo, onde o mesmo pode ser observado no grupo PRED vs CTL ($3,60 \pm 0,28$ mg/100 g peso corpóreo vs $1,88 \pm 0,20$ mg/100 g peso corpóreo, respectivamente, $p = 0,0027$) (Fig. 13D).

A)



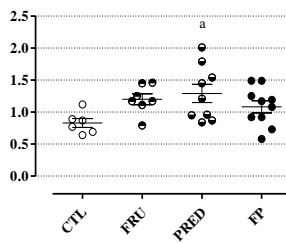
B)

Massa relativa de células β
por área de pâncreas (%)



C)

Massa de células β (mg)



D)

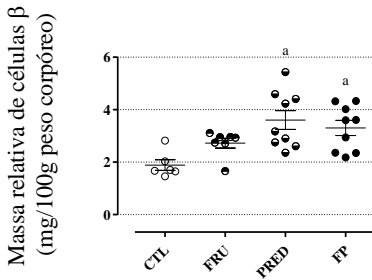


Figura 13: Tratamento com FP resulta em aumento na massa absoluta de células beta. Contra coloração utilizada Hematoxilina. Escala em 400 μ m. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa com relação ao grupo FRU; (c) indica diferença significativa com relação ao grupo PRED. Teste one-way ANOVA seguido de post-test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 7; FRU: n 8; PRED: n 9 e FP: n 10.

Quadro 2 – Resumo dos resultados obtidos pelo tratamento concomitante de frutose e prednisolona.

ANÁLISE	TRATAMENTO FRU + PRED
Consumo hídrico	↑
Consumo alimentar	↓
Consumo calórico	-----
Peso corpóreo	↓
Glicemia plasmática	-----
TG plasmático	↑
Tolerância à glicose	↑
Sensibilidade à insulina	↓
Tolerância ao piruvato	-----
Insulinemia	↑
Uricemia	↑
TG hepático	↑
Glicogênio hepático	↑
Atividade lipolítica	-----
Massa de tecidos e órgãos	↑ Pâncreas, soma gorduras e fígado
Morfometria adipócitos	-----
Perfil lipídico hepático	↑
Massa relativa de céls-β	↑

9. RESULTADOS MODULO 2

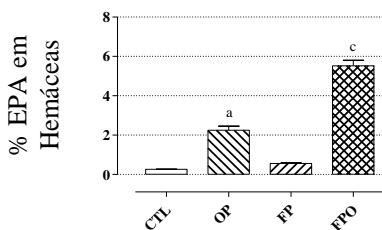
9.1 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

Em paralelo ao acompanhamento do impacto sobre o metabolismo da ingestão combinada de frutose e prednisolona (grupo FP), seguimos com a introdução da suplementação com óleo de peixe com o intuito de verificar sua potencial eficácia na atenuação dos parâmetros alterados pelos tratamentos utilizados.

9.1.1 Suplementação com óleo de peixe resulta em aumento de EPA e DHA

O aumento nas concentrações de EPA e DHA nas hemácias dos grupos OP e FPO corroboraram com a eficácia da suplementação, onde observa-se um aumento do conteúdo de EPA (Fig. 14A) e DHA (Fig. 14B), quando comparado os grupos FP vs FPO (0,530 (0,495; 0,590) vs 5,45 (4,88; 6,20)).

A)



B)

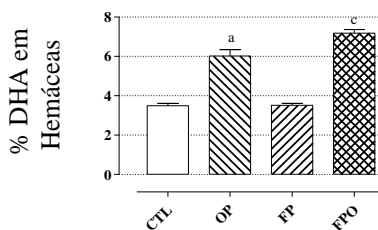


Figura 14: Aumento das concentrações de EPA e DHA em hemácias advindo da suplementação com óleo de peixe. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.2 A suplementação com óleo de peixe não modificou a ingestão alimentar e hídrica alterada pelo tratamento com frutose e prednisolona.

Foi observada ao longo do tratamento (a partir da 2ª semana) uma redução significativa da ingestão alimentar nos grupos FP e FPO quando comparado com seus respectivos controles (CTL e OP), demonstrando esta redução ser carregada pelo tratamento com FP. No entanto, a suplementação com OP não influenciou este parâmetro em nenhum aspecto (Fig. 15A). A ingestão hídrica seguiu os mesmos parâmetros

comparativos (a partir da 1ª semana), apresentando porém, aumento nos seus valores quando comparado FP e FPO com seus controles, onde foi observado uma redução significativa de ingestão hídrica na última semana de tratamento quando comparado o grupo FP e FPO (13,11 mL \pm 1,0 e 11,89mL \pm 1,15, respectivamente), demonstrando uma influência tardia da suplementação com OP (Fig. 15B). A suplementação com óleo de peixe não modificou o padrão de consumo calórico destes animais (Fig. 15C).

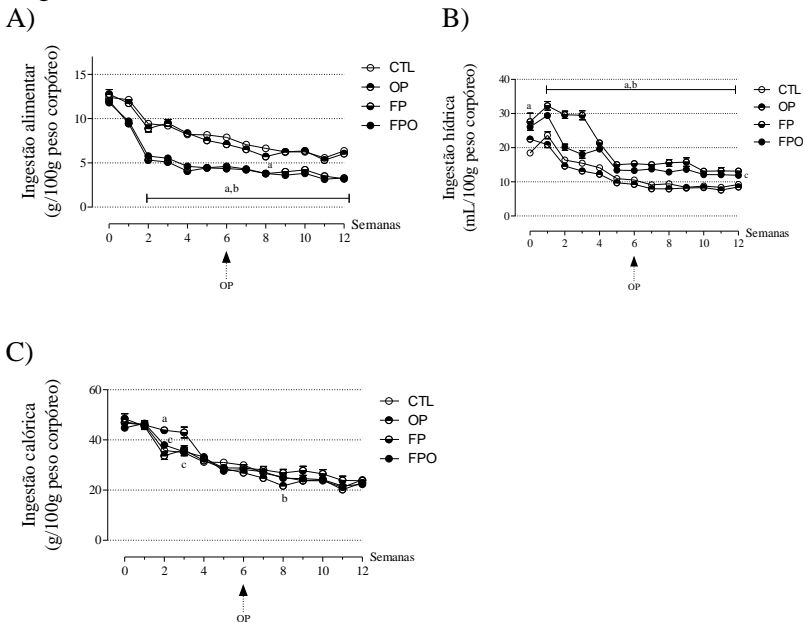


Figura 15: Suplementação com óleo de peixe não promove efeitos sobre consumo alimentar, hídrico e calórico. Dados são média \pm EPM ou intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (Fig 13A semanas: 0,1,3,7,8,10 e 11; 13B semanas: 1,6,7,10,11 e 12; e Fig 13C) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (Fig 13A semana: 2,4,5,6,9 e 12; 13B semanas: 0,2,3,4,5,8 e 9), $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.3 A suplementação com óleo de peixe não promove alterações sobre o peso corpóreo.

A suplementação com óleo de peixe não influenciou o peso corpóreo em nenhum aspecto nos animais que receberam tratamento com

FP, apresentando peso inicial de FP= 174,9g ± 3,7 e FPO= 172,8g ± 4,4, e peso ao final do tratamento (12ª semana) de FP=330,4g ± 10 e FPO= 324,9g ± 7,8 (Fig. 16).

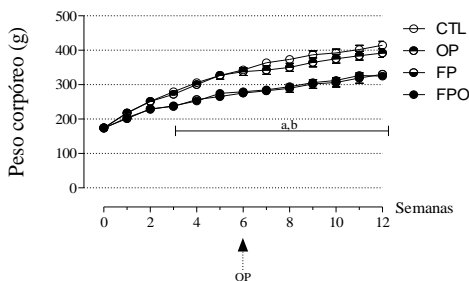


Figura 16: Suplementação com óleo de peixe não altera peso corpóreo de animais tratados com FP. Dados são média ± EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post-test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.4 Suplementação com óleo de peixe atenua triacilglicerol plasmático, porém não resulta em modificações na glicemia em jejum.

A glicemia de jejum não foi alterada pelo tratamento com FP, não sendo observada nenhuma mudança neste parâmetro com a suplementação do óleo de peixe (Fig. 17A), bem como não sendo observado efeito da suplementação no cálculo da área abaixo da curva para glicemia, quando dividido em antes e após a suplementação (Fig. 17B). As concentrações plasmáticas de triacilglicerol apresentam aumento devido ao tratamento com FP, a partir da 2ª quinzena até a 6ª quinzena, com aumento de 45%, 56%, 28%, 28% e 54% respectivamente, sendo normalizada ao final do mesmo, no entanto, sem apresentar efeito atenuador da suplementação com óleo de peixe (Fig. 17C).

Quando observado o cálculo da área abaixo da curva dividido em antes e após à suplementação com óleo de peixe, podemos observar que o grupo FPO apresentou redução da área ao final do tratamento, quando comparado ao período antecedente à suplementação, onde sua área anterior à suplementação foi de 76,3 ± 8,2 mg/dL/dias e após a suplementação foi de 35,8 ± 4 mg/dL/dias, demonstrando o efeito atenuador do óleo de peixe sobre o triacilglicerol plasmático neste parâmetro (Fig. 17D).

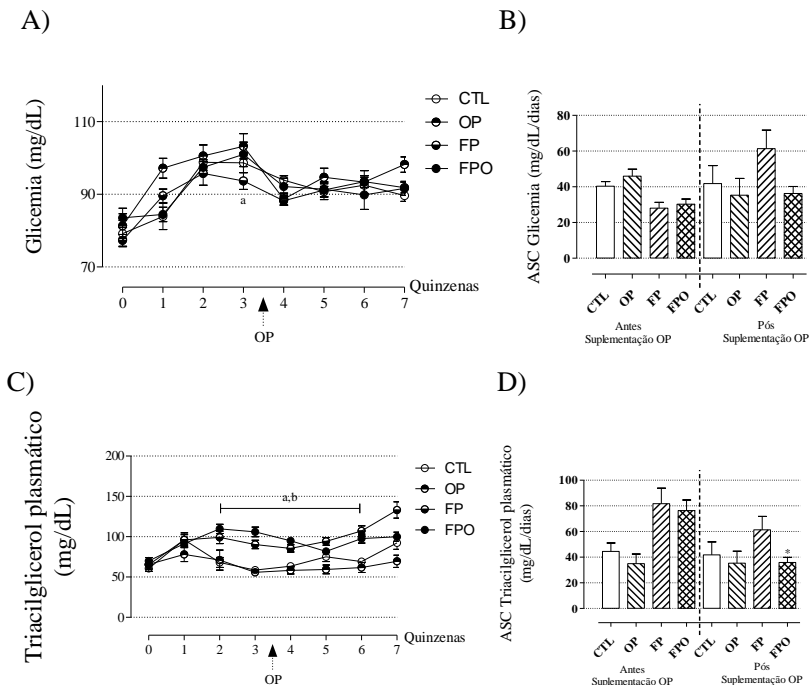


Figura 17: Suplementação com óleo de peixe promove redução do triacilglicérol plasmático, sem alterar glicemia em jejum. Dados são média \pm EPM ou mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP com relação ao grupo CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (Fig. 17A; Fig. 17C quinzenas: 1,2,3,4,5 e 6) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (Fig. 17C quinzena 7). Teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, e test t de Student (Fig. 17B e D), $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.5 Suplementação com óleo de peixe não altera tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e piruvato.

A suplementação com óleo de peixe não apresentou modificações sobre o teste de tolerância à glicose, ao longo dos 120 minutos analisados (Fig. 18A), bem como sem alteração no cálculo da área abaixo da curva, demonstrando apenas uma menor área para o grupo tratado com FP quando comparado com seu controle, porém sem efeito atenuador do OP (FP= $3,634 \text{ mg/dL}^{-1} \cdot 120\text{min}^{-1} \pm 352,1$; CTL= $5,596 \text{ mg/dL}^{-1} \cdot 120\text{min}^{-1} \pm 430,2$ e OP= $4,273 \text{ mg/dL}^{-1} \cdot 120\text{min}^{-1} \pm 404,3$) (Fig. 18B).

Quando analisado a sensibilidade à insulina, foi observado que no tempo 20 min ao final do teste, os animais tratados com FP apresentaram elevadas concentrações de glicose sanguínea quando comparados com grupo CTL, porém sem efeito atenuador do OP (Fig. 18C). Quando realizado o cálculo da constante de decaimento para ipITT, foi observado que o tratamento com FP promoveu redução na constante de decaimento, no entanto, sem efeito atenuador da suplementação com óleo de peixe (FP= 0,83 $\% \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,09$; CTL= 1,37 $\% \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,12$ e OP= 1,24 $\% \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,08$) (Fig. 18D). Também foi realizado o teste de tolerância ao piruvato, bem como cálculo da área abaixo da curva para ipPTT, porém em ambos parâmetros a suplementação com óleo de peixe não resultou em modificações destes parâmetros (Fig. 18 E e F, respectivamente).

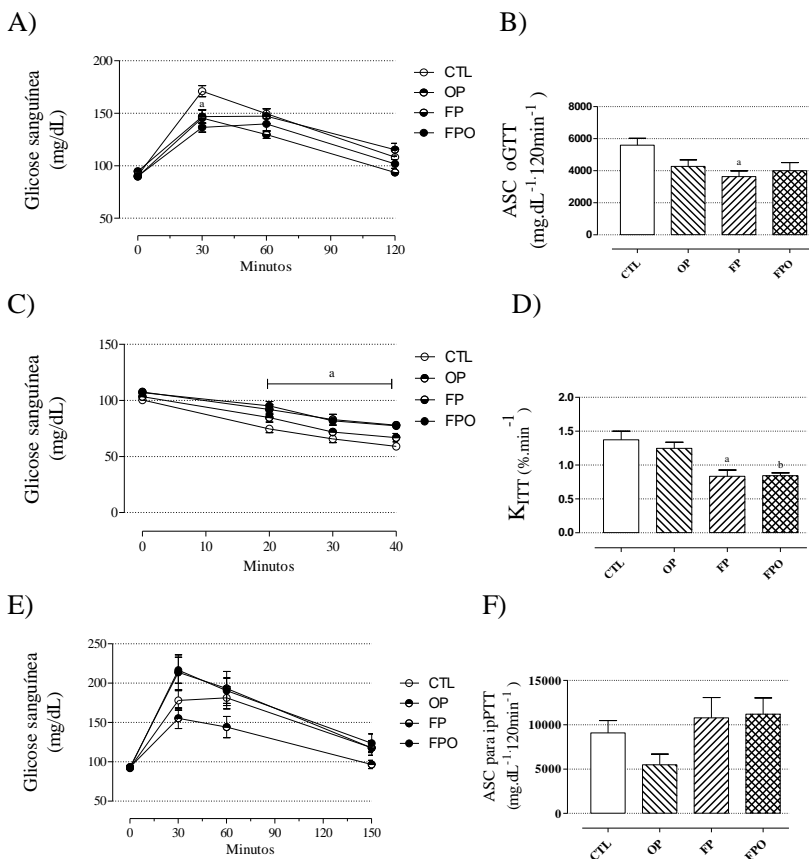


Figura 18: Suplementação com óleo de peixe não resulta em melhora nos testes de tolerância à glicose e piruvato, e no teste de sensibilidade à insulina.

Dados são média \pm EPM ou mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey (Fig 18A, B C, D e F) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns (Fig. 18E), $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.6 Suplementação com óleo de peixe não promove redução da hiperinsulinemia

Quando avaliado a insulina plasmática em jejum, foi observado um aumento das concentrações da mesma no grupo tratado com FP quando comparado com seu controle (284 pg/dL (218,8;381,6) e 62,9 (49,4;84)) respectivamente, porém sem efeito da suplementação do óleo de peixe sobre este parâmetro (Fig. 19).

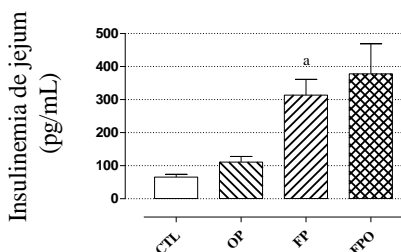


Figura 19: Suplementação com OP não promove redução da hiperinsulinemia advinda do tratamento com FP. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 12 e FPO: n 10.

9.1.7 Suplementação com OP apresenta efeito atenuador sobre a hiperuricemia resultante do tratamento com frutose e prednisolona.

Os animais tratados com FP apresentaram hiperuricemia, comparado com seu controle (CTL= 0,53 mg/dL \pm 0,07 vs FP 1,21 mg/dL \pm 0,07), apresentando efeito atenuador do mesmo pela suplementação com óleo de peixe sobre este parâmetro (FP 1,21 mg/dL \pm 0,07 vs FPO= 0,82 mg/dL \pm 0,06) (Fig. 20).

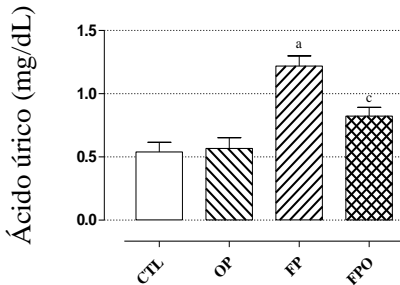


Figura 20: Suplementação com óleo de peixe promove redução da hiperurecemia advinda do tratamento com FP. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.8 Suplementação com óleo de peixe não apresenta redução no conteúdo de triacilglicerol hepático.

A suplementação não foi eficaz em atenuar o parâmetro de TG hepático, elevado pelo tratamento com FP (FPO = $4,5 \pm 0,69$ mg/g vs FP = $5,8 \pm 0,91$ mg/g) (Fig. 21).

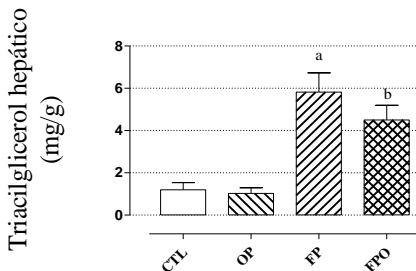


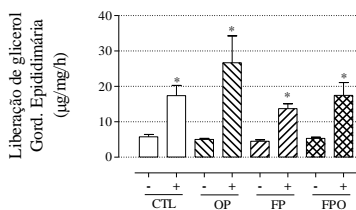
Figura 21: Suplementação com óleo de peixe não apresenta redução no conteúdo de triacilglicerol hepático. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.9 A suplementação com óleo de peixe não altera atividade lipolítica da gordura epididimária e retroperitoneal.

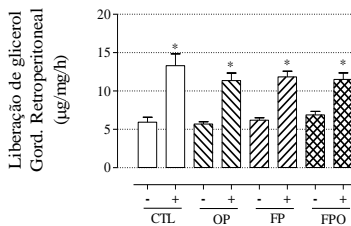
Os grupos apresentaram aumento na liberação de glicerol quando estimulados com isoproterenol (estimulado) em relação ao seu estado

basal (não estimulado), porém sem diferença significativa entre os grupos após o estímulo, bem como sem efeito da suplementação com OP, sendo quantificado nas gorduras epididimária e retroperitoneal, respectivamente (Fig. 22A e B). Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado também não apresentaram alterações entre os grupos, sem efeito da suplementação com OP (Fig. 22C e D).

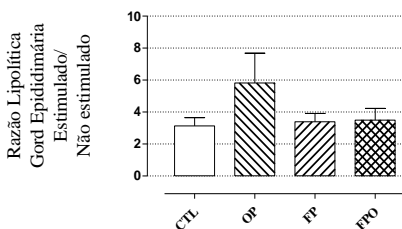
A)



B)



C)



D)

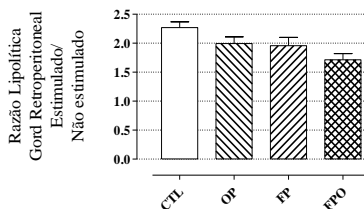


Figura 22: Suplementação com OP não apresenta alterações sobre a liberação de glicerol na gordura epididimária e retroperitoneal. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

9.1.10 Peso relativo de órgãos é alterado pelo tratamento concomitante de FP, porém a suplementação com óleo de peixe não é eficaz em reverter tais alterações.

O peso relativo de gordura retroperitoneal, omental e marrom aumentaram no grupo FP, porém não foi observado nenhum efeito atenuador da suplementação com o óleo de peixe (FPO) sobre estes parâmetros.

Tabela 6: peso relativo de órgãos e tecidos de ratos tratados e suplementados com óleo de peixe

	CTL	OP	FP	FPO
PÂNCREAS (g/100g)	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03
GORD. EPI (g/100g)	1,18 ± 0,07	1,32 ± 0,11	2,04 ± 0,12 ^a	1,71 ± 0,08
GORD. RETRO (g/100g)	1,67 ± 0,14	1,89 ± 0,19	1,68 ± 0,13	1,73 ± 0,14
GORD. OMENT. (mg/100g)	135(90;160)	103(90;190)	259(129;362) ^a	191(150;260)
GORD. MARR. (mg/100g)	80 (70;110)	108 (90;130)	126 (110;180) ^a	143 (100;160)
SOMA GORD. (g/100g)	3,08 ± 0,21	3,44 ± 0,31	4,12 ± 0,28 ^a	3,79 ± 0,18
ADRENAIS (mg/100g)	16 (15;17)	16 (15;19)	16 (15;18)	16 (14;18)
FÍGADO (g/100g)	3,19(2,9;3,4)	3,10(2,9;3,2)	3,44(3,3; 4,0)	3,39(3,2;3,5)
BAÇO (mg/100g)	210 ± 7	210 ± 6	190 ± 3	190 ± 3 ^b

Dados são média ± EPM ou mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste one-way ANOVA seguido de post test de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 13 e FPO: n 15.

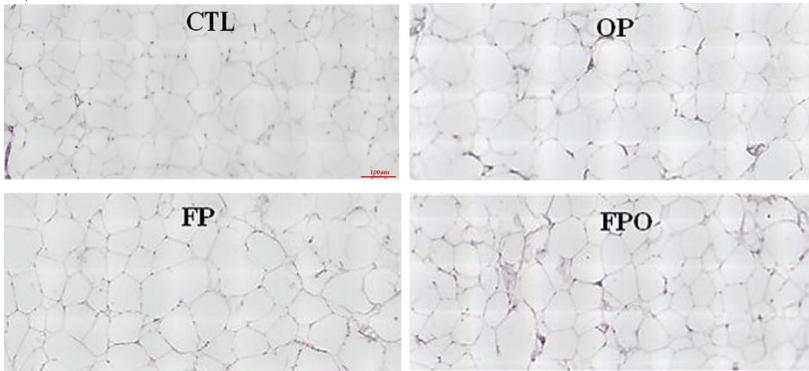
9.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS MÓDULO 2

9.2.1 Suplementação com óleo de peixe não altera parâmetros morfométricos de adipócitos.

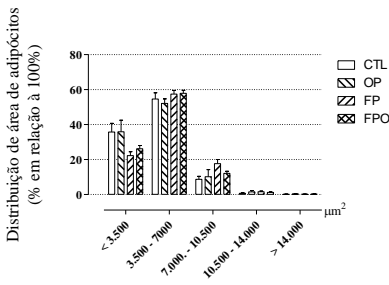
Na Figura 23A, é possível observar a morfologia característica dos adipócitos de todos os grupos experimentais, não sendo observada nenhuma alteração aparente no aspecto dessas células nem nas variáveis quantificadas como descrito na sequência.

A suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em induzir alterações morfométricas dos adipócitos, quando comparado com grupos CTL e FP. Em todos os grupos experimentais, verifica-se uma maior proporção de adipócitos apresentando uma área celular de 3.500 à 7.000 μm^2 (Fig. 22B), um perímetro de 200-300 μm (Fig. 23C) e um diâmetro de 60-90 μm (Fig. 23D).

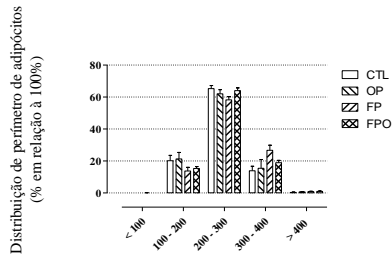
A)



B)



C)



D)

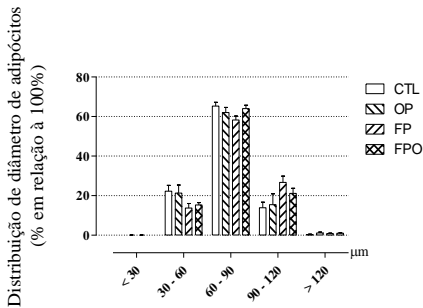


Figura 23: Suplementação com óleo de peixe não altera parâmetros morfométricos. Coloração utilizada H&E. Escala em 100µm. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica

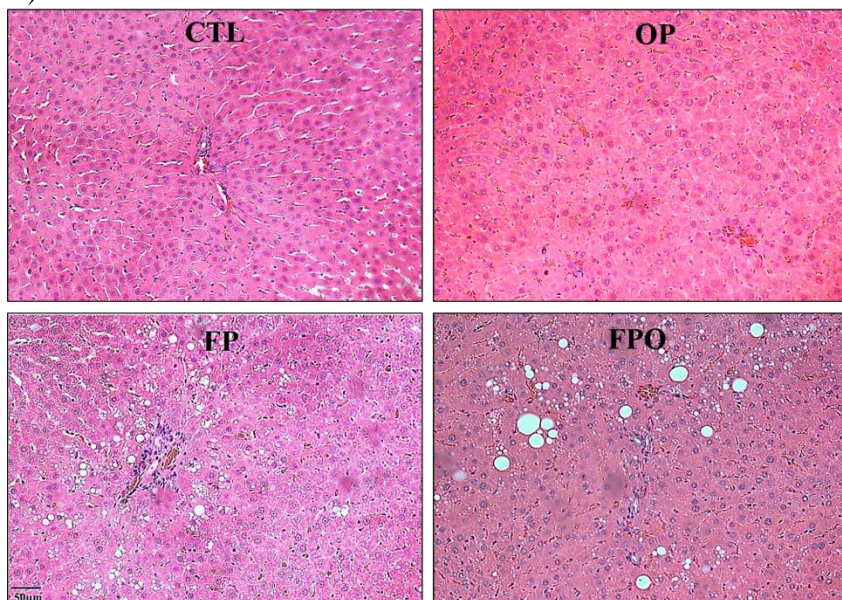
diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste de Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 8; FP: n 8 e FPO: n 13.

9.2.2 A suplementação com óleo de peixe não é eficaz em reduzir parâmetros de esteatose hepática advindo do tratamento com FP.

Para determinação semiquantitativa de esteatose hepática, foi verificada a distribuição de lipídeos hepático baseado no padrão de macro e micro gotículas. Na figura 24A, é possível observar o perfil morfológico do fígado de todos os grupos experimentais, não demonstrando alterações no contexto lipídico, bem como de macro e micro gotículas do grupo suplementado com óleo de peixe.

Podemos observar que o tratamento com FP promove maior acúmulo de lipídeos por área analisada, e que a suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em atenuar este parâmetro (FP= 28,2 (21,3;72,2 %) vs FPO= 22,7 (19,1;58,1 %) (Fig. 24B). O mesmo é observado no perfil de macro gotículas onde o percentual para distribuição de lipídeos são: FP= 12,7 (3,6;41,3%) vs FPO= 11,2 (3;55,8%) (Fig. 24C), bem como perfil de micro gotículas, sendo: FP= 11,3 (6,8;24,4%) vs FPO= 10,7 (7,8;15,1%) (Fig. 24D).

A)



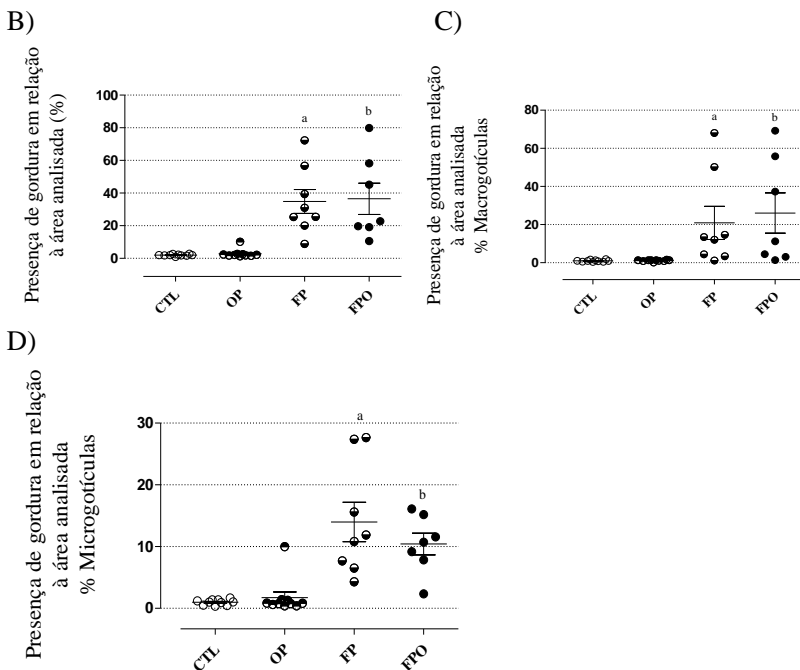


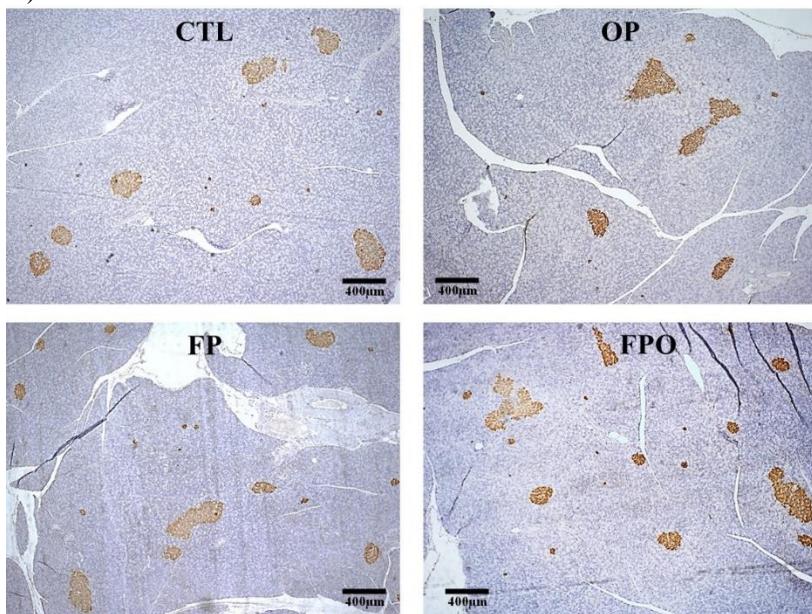
Figura 24: Suplementação com óleo de peixe não melhora perfil lipídico. Coloração utilizada: H&E. Escala em 50 μ m. Dados são mediana e intervalo interquartil. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 10; OP: n 10; FP: n 8 e FPO: n 7.

9.2.3 A suplementação com óleo de peixe não promove alterações sobre a massa de células beta pancreáticas.

Secções pancreáticas imunocoradas para insulina demonstraram aumento da massa relativa de células beta, podendo ser observado o aumento da massa no grupo FP e PRED (Fig. 13A). Além disso, foi observado aumento no percentual da massa de células β por área analisada no grupo PRED (Fig. 13B), bem como aumento da massa de células beta pancreáticas quantificadas em mg também no grupo PRED quando comparadas com o grupo CTL (Fig. 13C). Após realizada a normalização pelo peso corpóreo de cada animal, o grupo FP apresentou aumento na massa de células beta pancreáticas quando comparado com o grupo CTL, sendo de $FP = 3,30 \pm 0,28$ mg/100g peso corpóreo vs $CTL = 1,88 \pm 0,20$

mg/100 g peso corpóreo, onde o mesmo pode ser observado no grupo PRED vs CTL ($3,60 \pm 0,28$ mg/100 g peso corpóreo vs $1,88 \pm 0,20$ mg/100 g peso corpóreo, respectivamente, $p=0,0027$) (Fig. 13D). Secções pancreáticas coradas para insulina demonstram a massa relativa de células beta, não sendo observada alteração advinda da suplementação com óleo de peixe (Fig. 25A), bem como sem alterações na massa relativa de células beta em relação à área analisada (%) (Fig. 25B), e na massa relativa (mg) (Fig. 25C). A suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em promover alterações da massa relativa de células beta pancreática, quando normalizada pelo peso corpóreo, apresentando valores de CTL= $1,88 \pm 0,20$ mg/100 g peso corpóreo, OP= $2,61 \pm 0,27$, FP= $3,30 \pm 0,28$ e FPO= $3,95 \pm 0,22$ mg/10 g peso corpóreo (Fig. 25D).

A)



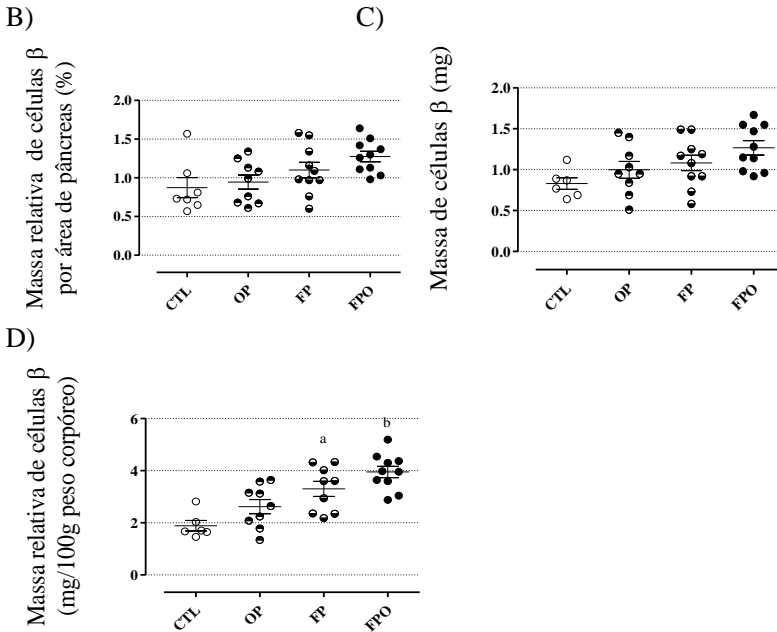


Figura 25: Suplementação com óleo de peixe não altera massa relativa de células beta. Dados são média \pm EPM. (a) indica diferença significativa do grupo OP e FP vs CTL; (b) indica diferença significativa do grupo OP vs FPO; (c) indica diferença significativa do grupo FP vs FPO. Teste Kruskal-Wallis seguido de post test de Dunns, $p < 0,05$. CTL: n 7; OP: n 9; FP: n 10 e FPO: n 10.

Quadro 3 – Resumo dos resultados obtidos através da suplementação com óleo de peixe.

ANÁLISE	SUPLEMENTAÇÃO OP
Consumo hídrico	-----
Consumo alimentar	-----
Consumo calórico	-----
Peso corpóreo	-----
Glicemia plasmática	-----
TG plasmático	↓
Tolerância à glicose	-----
Sensibilidade à insulina	-----
Tolerância ao piruvato	-----
Insulinemia	-----
Uricemia	↓
TG hepático	-----
Glicogênio hepático	-----
Atividade lipolítica	-----
Massa de tecidos e órgãos	-----
Morfometria de adipócitos	-----
Perfil lipídico hepático	-----
Massa relativa de céls-β	-----

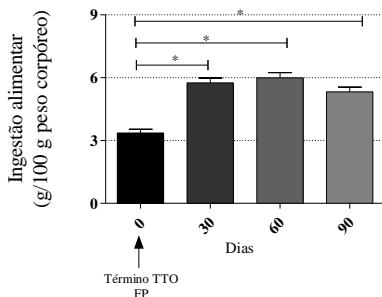
10. RESULTADOS MÓDULO 3

10.1 EFEITOS DA INTERRUPÇÃO DOS TRATAMENTOS

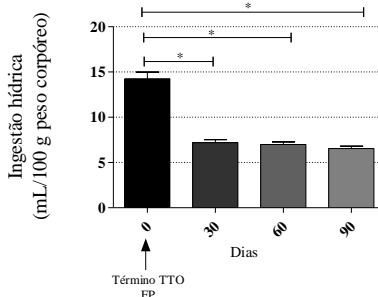
10.1.1 Retirada dos tratamentos resulta em normalização dos parâmetros de consumo alimentar e hídrico.

O grupo REV apresentou aumento significativo na ingesta alimentar, observado nos 30, 60 e 90 dias após o término do tratamento, onde o aumento foi de $3,33 \pm 0,18$ g/100g; $5,76 \pm 0,23$ g/100g; $5,99 \pm 0,24$ g/100g vs $5,31 \pm 0,23$ g/100g, respectivamente (Fig. 26A). Com relação ao consumo hídrico, este parâmetro também foi normalizado, onde seus valores foram apresentando redução decrescente do final do tratamento aos dias 30, 60 e 90, sendo de $14,26 \pm 0,72$ mL/100g para $7,19 \pm 0,33$ mL/100g; $6,99 \pm 0,27$ mL/100g e por fim $6,53 \pm 0,27$ mL/100g (Fig. 26B). Quanto ao consumo calórico, os animais apresentaram aumento nos valores no dia 60 e 90 após a retirada do tratamento, sendo de $3,35 \pm 0,17$ g/100g no dia 0, $22,7 \pm 0,93$ g/100g para dia 60, e $20,2 \pm 0,87$ g/100g no dia 90 (Fig. 26C).

A)



B)



C)

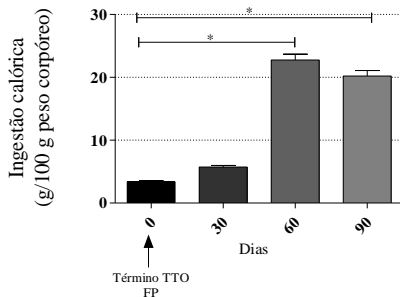


Figura 26: Retirada do insulto de FP resulta em normalização de consumo alimentar, hídrico e calórico. (*) indica diferença significativa entre os dias de

retirada do insulto. Teste ANOVA para medidas repetidas seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

10.1.2 Peso corpóreo de animais é aumentado após a retirada dos tratamentos, mantendo-se até o final do período avaliado.

Os animais do grupo REV apresentaram aumento significativo do peso corpóreo do dia 0 (final do tratamento) quando comparado 30 dias após a retirada do tratamento, sendo observado esse aumento até o final do período (60 e 90 dias) ($301,2\text{g} \pm 16,4$; $367,9\text{g} \pm 16,3$; $392\text{g} \pm 17,4$ e $413,1\text{g} \pm 19,9$, respectivamente) (Fig. 27).

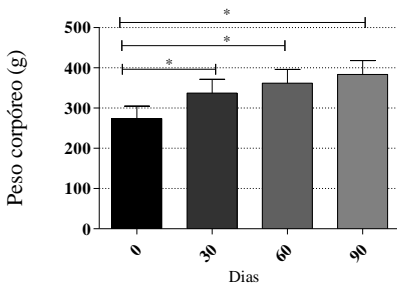


Figura 27: Retirada do tratamento concomitante promove normalização e aumento do peso corpóreo. (*) indica diferença significativa entre os dias de retirada do tratamento. Teste ANOVA para medidas repetidas seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

10.1.3 Triacilglicerol plasmático e glicemia de jejum não apresentam alterações após a retirada dos tratamentos.

O grupo REV apresentou redução na concentração de triacilglicerol em 21, 10 e 11%, nos dias 30, 60 e 90 em relação ao dia 0, respectivamente, porém sem apresentar diferenças estatisticamente significativas (Fig. 28A). Ainda, o grupo REV apresentou redução na concentração de glicose plasmática após 90 dias da retirada dos tratamentos, podendo ser decorrente da idade do animal ou biologia individual, não sendo decorrente da retirada do tratamento, uma vez que o tratamento não apresentou efeito sobre este parâmetro (Fig. 28B).

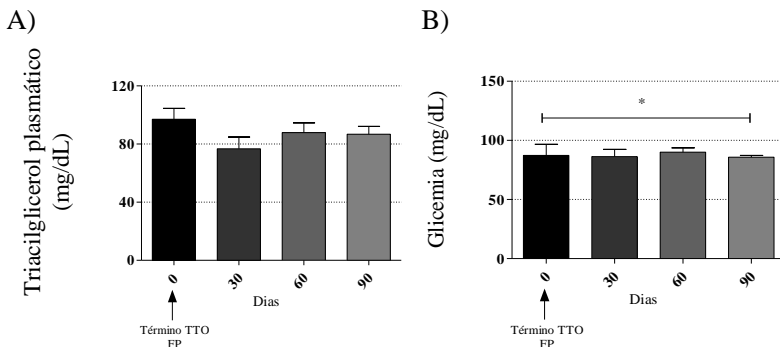


Figura 28: Retirada do tratamento não promove alterações nos parâmetros plasmáticos de triacilglicerol. (*) indica diferença significativa entre os dias de retirada do insulto. Teste ANOVA para medidas repetidas seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

10.1.4 Interrupção do tratamento concomitante resulta em menor conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio.

Após a retirada dos tratamentos, os animais apresentaram menor conteúdo de TG hepático, quando comparado ao grupo FP sendo observado valores de FP= $5,81 \text{ mg/g} \pm 0,91$ e REV= $1,17 \text{ mg/g} \pm 0,30$ (Fig. 29A). O mesmo padrão de redução é observado no conteúdo de glicogênio hepático, apresentando valores de FP= $353,8 \text{ mg/g} \pm 6,7$ e REV= $304,7 \text{ mg/g} \pm 1,5$ (Fig. 29B).

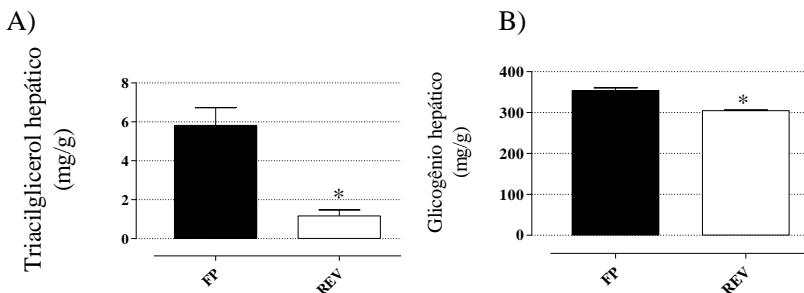


Figura 29: Grupo REV apresenta redução do conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio em relação ao grupo FP. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas (Fig. 26A), ou teste t de Student seguido de post test Mann-Whitney para medidas não pareadas e assimétricas (Fig. 26B), $p < 0,05$, FP: $n = 13$ e REV: $n = 10$.

10.1.5 Retirada do tratamento promove redução na insulinemia e uricemia.

Após retirada do tratamento, os animais apresentam redução significativa de ácido úrico plasmático apresentando valores no grupo FP de 1,21mg/dL \pm 0,07 e grupo REV= 0,86 mg/dL \pm 0,04 (Fig. 30A), bem como redução no quadro de insulinemia com redução de 313,8pg/mL \pm 47,3 para 160,0 pg/mL \pm 21,0, nos grupos FP e REV, respectivamente (Fig. 30B).

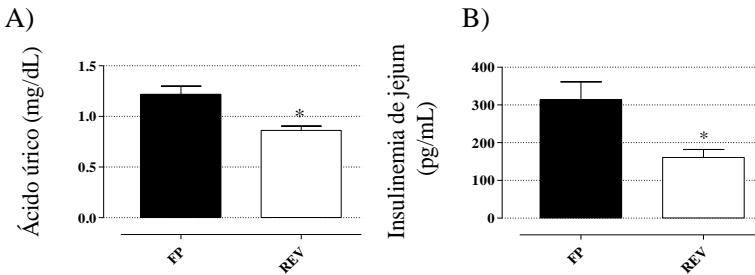


Figura 30: Remoção do tratamento concomitante resulta em diminuição das concentrações de ácido úrico e insulina plasmática. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas, $p < 0,05$. FP: n 13 e REV: n 10.

10.1.6 Após retirada dos tratamentos a massa relativa de órgãos e tecidos é normalizada.

Após retirada do tratamento foi observada redução significativa no peso do pâncreas, gordura marrom e fígado, como mostra a tabela abaixo.

Tabela 7: peso relativo de órgãos e tecidos de ratos após retirada dos insultos.

	FP	REVERSIBILIDADE
PÂNCREAS (g/100g)	0,317 \pm 0,04	0,282 \pm 0,03*
GORD. EPI (g/100g)	2,04 \pm 0,46	1,66 \pm 0,37
GORD. RETRO (g/100g)	1,68 \pm 0,53	2,02 \pm 0,49
GORD.OMENTAL (mg/100g)	259 (129;362)	173 (110;225)
GORD. MARROM (g/100g)	126 (110;180)	95 \pm 0,02*
SOMA GORDURAS (g/100g)	3,976 \pm 1,02	3,860 \pm 0,87
ADRENAL (mg/100g)	16 (15;18)	15 (12,18)
FÍGADO (g/100g)	3,61 \pm 0,59	2,90 \pm 0,30*
BAÇO (mg/100g)	190 \pm 3	189 \pm 7

(*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas, ou teste t de Student seguido de post test Mann-Whitney para medidas não pareadas e assimétricas, $p < 0,05$, $n = 10$.

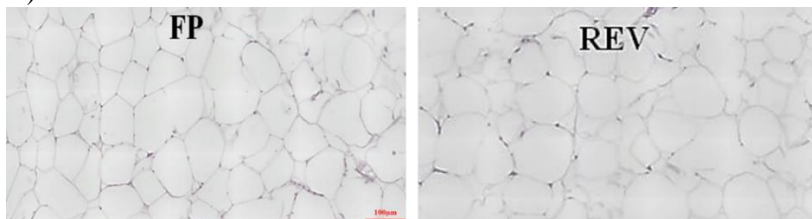
10.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

10.2.1 A retirada do tratamento resulta em diminuição do diâmetro de adipócitos

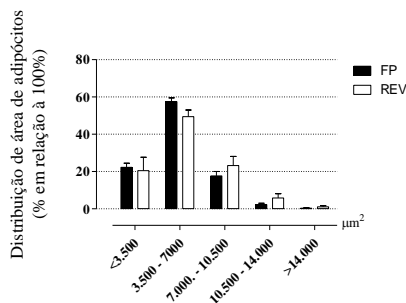
Após 3 meses da retirada do tratamento, os animais foram eutanasiados e coletado o tecido adiposo epididimário para quantificação de adipócitos afim de observar possível hipertrofia ou hiperplasia do mesmo.

Na Figura 31A é possível observar a morfologia característica em todos os grupos experimentais. Em todos os grupos experimentais, verifica-se uma maior proporção de adipócitos apresentando uma área celular de 3.500 à 7.000 μm^2 (Fig. 31B), um perímetro de 200-300 μm (Fig. 31C) e uma redução significativa de diâmetro no quartil compreendido entre 60-90 μm (Fig. 31D) (FP= $58,2 \pm 1,96 \mu\text{m}$ e REV= $48,0 \pm 4,18 \mu\text{m}$) (Fig. 31D).

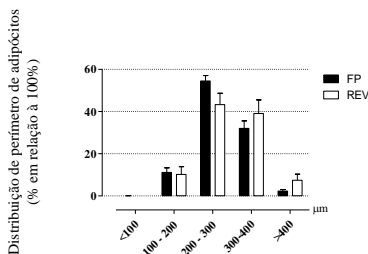
A)



B)



C)



D)

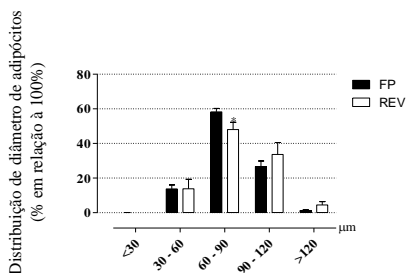


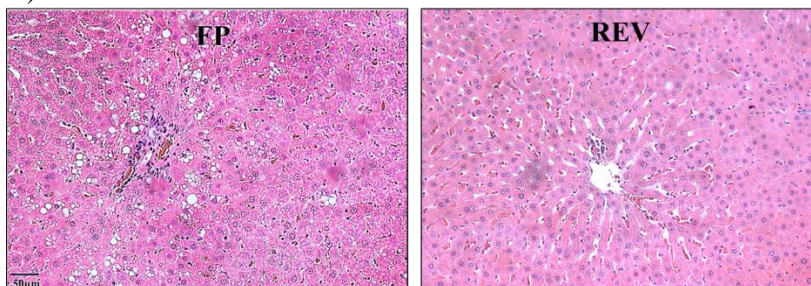
Figura 31: Retirada do tratamento não altera distribuição de área e perímetro de adipócitos, porém promove redução do diâmetro. Coloração utilizada H&E. Escala em $100\mu\text{m}$. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas, ou teste t de Student, $p < 0,05$, $n = 10$.

10.2.2 Retirada do tratamento concomitante promove melhora no quadro de esteatose hepática.

Na figura 32A, é possível observar a morfologia do fígado de todos os grupos experimentais, observando redução no conteúdo lipídico hepático na forma macro e micro gotículas.

Quando analisado conteúdo de lipídeos hepáticos, foi observada uma redução significativa desses lipídeos nos animais que tiveram a retirada do insulto, com percentuais de: FP= $34,88 \pm 7,3\%$ e REV= $2,58 \pm 0,3\%$ (Fig. 32B). Após quantificados, foram estratificados em macro gotículas e observado uma redução significativa de $12,73$ ($3,6; 41,3\%$) para $1,71$ ($0,85; 2,16\%$) quando comparado FP vs REV respectivamente (Fig. 32C), bem como sendo observado mesmo perfil de redução para a estratificação de microgotículas, com valores de FP= $13,98 \pm 3,1\%$ e REV= $0,65 \pm 0,11\%$ (Fig. 32D).

A)



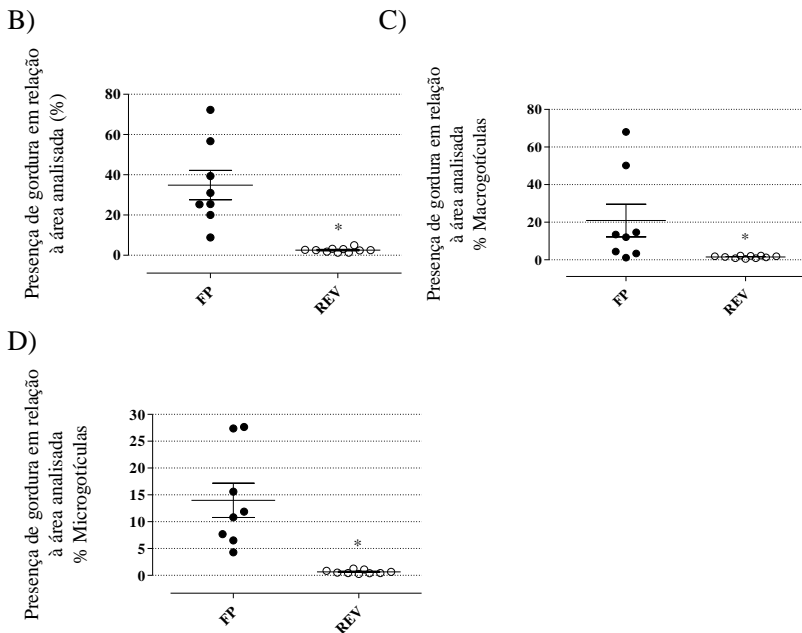


Figura 32: Retirada do tratamento promove melhora no perfil lipídico. Coloração utilizada H&E. Escala em 50 μ m. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas (Fig. 33A e C), ou teste t de Student seguido de post test Mann-Whitney para medidas não pareadas e assimétricas (Fig. 33B e D), $p < 0,05$, FP: n 8, REV: n 10.

10.2.3 Retirada do tratamento não promove alteração na massa de células beta pancreática.

Secções pancreáticas imunocoradas para insulina demonstram a massa relativa de células beta, não sendo observada nenhuma alteração aparente (Fig. 33A), nem nas variáveis quantificadas como: massa relativa de células beta por área analisada (%) (Fig. 33B), massa de células β (mg) (Fig. 33C), além de não apresentar alterações após a retirada do tratamento na massa relativa de células beta, após normalização pelo peso corpóreo de cada animal, com valores de FP= $3,28 \pm 0,28$ mg/100 g peso corpóreo vs REV= $3,33 \pm 0,35$ mg/100 g peso corpóreo, podendo ser um efeito decorrente da idade de animal, não apresentando compensação (Fig. 33D).

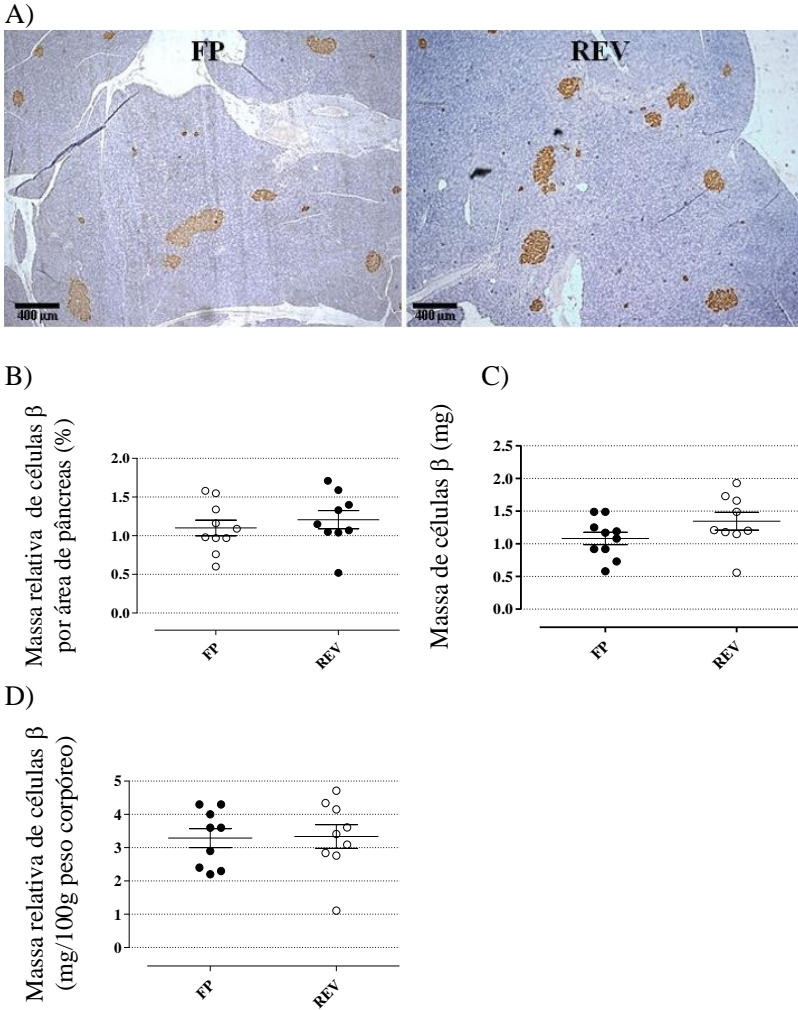


Figura 33: Retirada do tratamento não altera área relativa de massa de células β . Contra coloração utilizada Hematoxilina. Escala em 400 μ m. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste t de Student para medidas não pareadas, ou teste t de Student, $p < 0,05$, FP: n 10 e REV: n 9.

Quadro 4 – Resumo dos resultados após a retirada dos tratamentos concomitantes de frutose e prednisolona.

ANÁLISE	RETIRADA TRATAMENTO
Consumo hídrico	↓
Consumo alimentar	↑
Consumo calórico	↑
Peso corpóreo	↑
Glicemia plasmática	-----
TG plasmático	-----
Insulinemia	↓
Uricemia	↓
TG hepático	↓
Glicogênio hepático	↓
Atividade lipolítica	-----
Massa de tecidos e órgãos	↓ Pâncreas, gord. marrom e fígado
Morfometria de adipócitos	↓ Diâmetro 60-90 μm
Perfil lipídico hepático	↓ Esteatose hepática
Massa relativa de céls-β	-----

11. DISCUSSÃO

Em suma, a ingestão concomitante de frutose e prednisolona por 90 dias consecutivos promoveu um fenótipo com características de SM, a julgar pelo *i*) aumento na adiposidade abdominal, *ii*) hipertriacilgliceridemia, *iii*) redução na sensibilidade à insulina e *iv*) presença de esteatose hepática. Tais alterações, contudo, não resultaram em elevação da glicemia e intolerância à glicose devida as respostas adaptativas compensatórias ocorridas pelo pâncreas endócrino (aumento da massa de células beta e hiperinsulinemia). O aumento da adiposidade visceral, contudo, não se relacionou com hipertrofia nem hiperplasia de adipócitos no compartimento aqui analisado (gordura epididimária). A suplementação tardia com o óleo de peixe foi capaz de atenuar especialmente as alterações observadas no triacilglicerol circulante, mas não foi capaz de reverter ou atenuar a esteatose hepática. Já a interrupção da ingestão do tratamento composto de frutose e prednisolona foi eficiente no reestabelecimento da maioria das alterações metabólicas e morfofuncionais observadas por ação desses agentes.

O presente estudo demonstrou que o tratamento concomitante de frutose e prednisolona pelo período de 90 dias resultou em aumento de ingestão hídrica e redução da ingesta alimentar, além de redução do peso corpóreo. Corroborando o nosso estudo, outros grupos apresentaram resultados similares de padrão hídrico em ratos tratados com frutose (15% e 20% na água de beber por 8 semanas) onde esse aumento se deu principalmente pela maior palatabilidade da frutose (MAMIKUTTY; THENT; HAJI SUHAIMI, 2015; NOVAK et al., 2015), além de promover a redução na ingestão alimentar, podendo ser atribuído pela sua rápida metabolização, proporcionando sensação de saciedade (MADERO et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram que o tratamento com frutose não altera o peso corpóreo, mas aumenta a adiposidade visceral (NOVAK et al., 2015; VASILJEVIĆ et al., 2013). Ainda, tem sido demonstrando que a corticosterona, adicionada na água de beber por 5 semanas (100 ou 25 µg/mL), bem como tratamento com DEX (0,25 mg/kg ip) por 4 semanas promovem redução do peso corpóreo, provavelmente como resultado de um balanço hídrico negativo nos modelos com GC, ou ainda pelo efeito hipofágico da insulina (CHIMIN et al., 2014; FRANSSON et al., 2013; PINHEIRO et al., 2009). Quando se observa os dados de consumo alimentar e hídrico dos animais, especialmente do grupo FP, podemos observar que o balanço energético manteve-se igual. Desta forma, o menor ganho de peso pode ser resultante de provável atenuação do crescimento ósseo através do tratamento com GC (OGUEH; JOHNSON, 2000).

Quando observado parâmetros plasmáticos, o tratamento com FP resultou em hiperinsulinemia, hipertriacilgliceridemia e hiperurecemia estando em acordo com outros estudos que demonstram estas alterações em ratos tratados com frutose à 10% por 2 ou 12 semanas (ALZAMENDI et al., 2012b; MAHMOUD; ELSHAZLY, 2014; MAIZTEGUI et al., 2011), bem como em ratos tratados com DEX em diferentes dosagens (0,5 e 1,0 mg/kg) no período de 5 à 12 dias (DE PAULA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2009; RAFACHO et al., 2008, 2014b).

É sabido que o excesso de frutose pode causar RI, acarretando consequentemente em um quadro hiperinsulinêmico compensatório, e ainda promover um quadro hipertriacilgliceridêmico através da maior síntese lipídica, pelo aumento de fluxo de hidratos de carbono em precursores lipogênicos (HERMAN; SAMUEL, 2016; WANG et al., 2015). O mesmo pode ser observado pelo tratamento com GC, uma vez que seu excesso promove aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, pela menor captação periférica e/ou redução do *clearance*, bem como aumento de enzimas lipolíticas, como a HSL, induzindo maior hidrólise de triacilglicerol, promovendo assim maior liberação de ácidos graxos livres e glicerol para circulação (DJURHUUS et al., 2004; NOVAK et al., 2015; P.; L., 1998; RAFACHO et al., 2014a; WAJNGOT et al., 1990). No entanto, neste estudo alguns parâmetros alterados no grupo FP, como dislipidemia, hiperurecemia e aumento de adiposidade visceral não foram observados nos grupos que tiveram tratamento isolado com frutose ou GC. Tal fato pode ser decorrente de composição de microbiota do animal, espécie, idade, gênero, ou tempo e dose de tratamento diferentes dos encontrados na literatura (REFS), demonstrando assim o impacto negativo do tratamento combinado sobre parâmetros lipídicos e glicêmicos.

Nossos resultados referentes à homeostase glicêmica não confirmam o encontrado na literatura (ALZAMENDI et al., 2012b; MAIZTEGUI et al., 2011; NOVAK et al., 2015), uma vez que nosso estudo não conseguiu demonstrar intolerância à glicose em nenhum grupo experimental. Inclusive, no grupo FP, houve uma discreta melhora na tolerância à glicose, podendo este resultado ser explicado pela melhor capacidade secretória de insulina frente ao estímulo de glicose, já que estes animais encontram-se menos sensíveis à insulina, requerendo assim, ajustes compensatórios, como observado pelo aumento na massa de células beta (FRANSSON et al., 2013; LASKEWITZ et al., 2012; PROTZEK et al., 2014). Além disso, o grupo que recebeu tratamento isolado de prednisolona apresentou alterações semelhantes ao grupo FP como, redução da sensibilidade à insulina e aumento da massa de células

beta, onde contraditoriamente ao encontrado na literatura, o grupo que recebeu apenas frutose, não apresentou alteração na homeostase glicêmica (DELLA VEDOVA et al., 2016; HUANG et al., 2016). Desta forma, podemos observar que as alterações deletérias decorrentes do tratamento concomitante, predominantemente se dá pelo tratamento com GC.

No que se refere a atividade lipolítica, é provável que a hiperinsulinemia seja suficiente para evitar qualquer alteração lipolítica no grupo FP, o que explicaria os nossos resultados, uma vez que não foi observada nenhuma alteração referente à lipólise neste grupo. Nossos dados contrastam com o reportado na literatura quanto aos parâmetros morfométricos do tecido adiposo epididimário, onde diversos estudos demonstram hipertrofia de adipócitos com modelos de ratos tratados com frutose (ALZAMENDI et al., 2012b; MAMIKUTTY; THENT; HAJI SUHAIMI, 2015; VASILJEVIĆ et al., 2013) e/ou GC (CHIMIN et al., 2014). Entretanto, os grupos que receberam frutose apresentaram aumento na massa da gordura retroperitoneal e não podemos excluir que tenha ocorrido alteração no tamanho e número dos adipócitos neste compartimento, não avaliado no presente estudo.

Neste estudo, demonstramos que o tratamento crônico de frutose e prednisolona resulta em aumento do conteúdo hepático de triacilglicerol e glicogênio, propiciando o desenvolvimento de esteatose hepática, com aumento expressivo de macro e micro gotículas, corroborando os estudos de outros grupos que demonstraram esteatose hepática e aumento de macro gotículas em ratos tratados com frutose a 20% por 8 semanas (MAMIKUTTY; THENT; HAJI SUHAIMI, 2015), ou com DEX e corticosterona (FRANSSON et al., 2013; PINHEIRO et al., 2009). Esses dados são característicos do tratamento com frutose e GC, uma vez que seu excesso contribui para maior síntese lipídica e aumento de enzimas lipolíticas, respectivamente (CASSUTO et al., 2005). É importante salientar, que o tratamento concomitante de FP promoveu maior percentual total de lipídeos hepáticos, demonstrando prejuízo acentuado no quadro de esteatose hepática, sendo provável efeito sinérgico com o GC.

O estudo também demonstrou que o tratamento com frutose e prednisolona promoveu aumento do peso relativo de gordura visceral, bem como maior massa do pâncreas e fígado, o que está de acordo com os estudos utilizando tratamento com frutose a 15% ou 20% na água de beber por 8 semanas (MAMIKUTTY et al., 2014b; MAMIKUTTY; THENT; HAJI SUHAIMI, 2015; NOVAK et al., 2015), ou administrando DEX (0,25 mg/kg) ou corticosterona (100 ou 25 µg/mL) por 4 ou 5

semanas (CHIMIN et al., 2014; FRANSSON et al., 2013). Estas alterações podem ser advindas do aumento na disponibilidade de nutrientes pelo tratamento com frutose, bem como pelo possível aumento da atividade da LPL periférica promovida pelo excesso de GC (REFS). Em adição, demonstramos que este modelo experimental possui características semelhantes ao modelo de síndrome metabólica como: hipertriacilgliceridemia, RI, aumento da massa de gordura visceral sem alteração no ganho de peso, além de hiperinsulinemia, hiperuricemia e esteatose hepática.

É sabido que os ácidos graxos ômega-3 possuem propriedades atenuadoras sobre a SM através do aumento da oxidação de ácidos graxos livres, pela redução do coeficiente respiratório (MAKI et al., 2009; MURRU; BANNI; CARTA, 2013), e em nível hepático, através da inibição da síntese de VLDL e TG (HARRIS et al., 1990), proporcionando redução da lipogênese. Porém, nossos resultados demonstram que o óleo de peixe não foi capaz de atenuar grande parte das alterações advindas do tratamento com FP, uma vez que parâmetros relacionados a ingesta alimentar e hídrica, peso corpóreo, glicemia, insulinemia, bem como tolerância à glicose e sensibilidade à insulina não apresentaram atenuação decorrente da suplementação. Semelhante ao observado nestes resultados, outros estudos também demonstram a ineficiência da suplementação com óleo de peixe em alguns parâmetros avaliados, como em modelos utilizando frutose, sem alterações na ingestão alimentar e hídrica, e de parâmetros lipídicos (DE CASTRO et al., 2015; SORIA et al., 2002) e após tratamento com GC, sem alteração no peso corpóreo (BARBOSA et al., 2016).

O tratamento com frutose e prednisolona induziu aumento de ácido úrico plasmático, como sendo um metabólito do excesso de frutose, que promove seu aumento pela maior atividade da enzima KHK, advinda de uma retroalimentação positiva via ChREBP1 (JOHNSON et al., 2013; LIMA; MARTINS-SANTOS; CHAVES, 2015). A suplementação com óleo de peixe foi eficaz em promover atenuação deste parâmetro, podendo atuar sobre esta via, pela redução de parâmetros lipogênicos (MAKI et al., 2009; MURRU; BANNI; CARTA, 2013). Foi observado, ainda, hipertriacilgliceridemia advinda do tratamento combinado de frutose e prednisolona, onde a suplementação com óleo de peixe se mostrou efetiva na atenuação deste parâmetro, o que está de acordo com outros estudos utilizando modelos experimentais semelhantes, com GC e frutose, administrados separadamente (BARBOSA et al., 2016; DE CASTRO et al., 2015; SORIA et al., 2002).

Por fim, avaliamos a capacidade de reversão do quadro metabólico deletério causado pelo tratamento crônico de frutose e prednisolona, e constatamos melhora desse perfil em diversos parâmetros analisados após a interrupção do tratamento. Após 3 meses da retirada do tratamento, os animais apresentaram aumento progressivo no consumo alimentar e redução na ingestão hídrica, advindo da retirada da frutose que provavelmente promoveu maior palatabilidade e preferência ao consumo hídrico como demonstrado em estudo prévio (NOVAK et al., 2015).

Também foi observado crescimento e aumento do peso corpóreo dos animais durante os 3 meses de retirada do tratamento, demonstrando a capacidade do organismo em reverter o quadro de síndrome metabólica advindo do tratamento concomitante. Após a retirada do tratamento, foi observada redução da insulinemia, além de redução da uricemia por provável efeito da frutose, uma vez que é considerado como substrato para geração de ácido úrico, onde estes dados corroboram com estudo utilizando ratos machos Wistar, expostos a ingestão de 20% de frutose na água de beber por 65 dias, e após 15 dias da retirada do tratamento os mesmos parâmetros foram observados (CANCELAS et al., 2008). Ainda, observamos uma melhora no perfil lipídico hepático, corroborando com a melhora no quadro de esteatose hepática, com redução de macro e micro gotículas, podendo ser atribuído pela redução na produção e/ou aumento no *clearance* de VLDL para circulação (ROBERTS et al., 2001), corroborando com o dado de não alteração e redução de TG plasmático após a retirada do tratamento. Além disso, foi observado uma melhora no perfil morfométrico de adipócitos, uma vez que foi observado redução do seu diâmetro quando estratificado na faixa de 60-90 μ m.

12. CONCLUSÃO

Concluimos que a ingestão de frutose combinada à ingestão de prednisolona compromete o crescimento corpóreo e induz um quadro característico de SM enquanto a suplementação com OP parece atenuar somente as alterações relacionadas ao metabolismo lipídico, como hipertriacilgliceridemia e hiperuricemia. Também concluimos que as alterações metabólicas causadas pela combinação do tratamento são reversíveis em sua maioria após a interrupção do mesmo. 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.

13. PERSPECTIVAS

Para melhor explicação de alguns desfechos encontrados neste trabalho, mecanismos acerca dos efeitos do tratamento com FP e a suplementação poderiam ser melhor explorados. Estudos que explorem mecanismos de saciedade, bem como concentrações de hormônios como leptina e adiponectina poderiam promover maior compreensão de fatores relacionados ao consumo alimentar e perfil inflamatório, bem como expressão de enzimas lipogênicas para melhor compreensão dos mecanismos acerca do perfil lipídico. Ainda, a criação de um grupo experimental controle para os animais que tiveram a retirada do insulto após os 3 meses de tratamento, afim de observar quais efeitos são decorrentes da retirada do tratamento e quais seriam efeitos da idade do animal.

REFERÊNCIAS

ALZAMENDI, A. et al. Effect of pioglitazone on the fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. **PPAR Research**, v. 2012, p. 23–25, 2012a.

ALZAMENDI, A. et al. Effect of Pioglitazone on the Fructose-Induced Abdominal Adipose Tissue Dysfunction. **PPAR Research** v. 2012, p. 23–25, 2012b.

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

BARBOSA, A. M. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme**, v. 41, n. 4, p. 382–90, abr. 2016.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutr Metab.** v. 2, n. 1, p. 5, 2005.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Nutrition & Metabolism Fructose , insulin resistance , and metabolic dyslipidemia. **Nutr Metab.** v. 14, p. 1–14, 2010.

BERGMAN, R. N. et al. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. **Obesity.(Silver.Spring)**, v. 14 Suppl 1, n. 1930–7381 (Print), p. 16S–19S, 2006.

BRAY, G. A; POPKIN, B. M. Dietary fat intake does affect obesity! **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1157–1173, 1998.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis : A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 94, n. 9, 1999.

BURRI, L. et al. Marine Omega-3 phospholipids: Metabolism and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 15401–15419, 2012.

BURSÁC, B. N. et al. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, p. 1166–1172, 2013.

BURSÁC, B. N. et al. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats - do glucocorticoids play

a role? **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 446–455, 2014.

CALDER, P. C. P. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 2012.

CANCELAS, J. et al. Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, n. 7, p. 459–466, 2008.

CASSUTO, H. et al. Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33873–33884, 2005.

CHAKRAVARTHY, M. V et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 476–488, 2009.

CHIMIN, P. et al. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 2, p. 409–420, 2014.

CIANFANELLI, V. News & views research. p. 2–3, 2013.

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. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1864–1881, 2015.

DE PAULA, F. M. M. et al. Insulin signaling proteins in pancreatic islets of insulin-resistant rats induced by glucocorticoid. **Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 251–257, 2011.

DELLA VEDOVA, M. C. et al. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. **Nutrition and metabolic insights**, v. 9, p. 93–102, 2016.

DESPRÉS, J.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, p. 881–887, 2006.

DJURHUUS, C. B. et al. Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 286, n. 3, p. E488-94, 2004.

DUBOIS, D. C.; JUSKO, W. J. J Dynamic modeling of methylprednisolone effects on body weight and glucose regulation in rats.

J. Pharmacokinetic Pharmacodynamic. v. 38, n. 3, p. 293–316, 2012.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1415–1428, 2005.

ELLIOTT, S. S. et al. Fructose , weight gain , and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr** 2002;76:911–22.

FEINMAN, R. D.; FINE, E. J. Fructose in perspective. **Nutrition & metabolism**, v. 10, n. 1, p. 45, 2013.

FRANSSON, L. et al. B-Cell Adaptation in a Mouse Model of Glucocorticoid-Induced Metabolic Syndrome. **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 3, p. 231–241, 2013.

GOMEZ-SMITH, M. et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiology and Behavior**, 2016.

GREEN, A. K. et al. Sugar-sweetened beverages and prevalence of the metabolically abnormal phenotype in the Framingham Heart Study. **Obesity**, v. 22, n. 5, p. 157–163, 2014.

H Aidari, M. et al. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance: Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing li. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 31646–31655, 2002.

HARRIS, W. S. et al. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 9, p. 1549–1558, 1990.

HERMAN, M. A.; SAMUEL, V. T. The Sweet Path to Metabolic Demise : Fructose and Lipid Synthesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. xx, p. 1–12, 2016.

HUANG, J.-P. et al. Docosapentaenoic acid and Docosahexaenoic acid positively associate with insulin sensitivity in rats fed high-fat and high-fructose diets. **Journal of Diabetes**, n. 259, 2016.

HWANG, D. Essential fatty acids and immune response. **Faseb J**, v. 3, n. 9, p. 2052–2061, 1989.

JOHNSON, R. J. et al. Sugar , Uric Acid , and the Etiology of Diabetes and Obesity. **Diabetes**, v. 62, n. October, 2013.

JUMP, D. B. et al. Fatty acid regulation of hepatic gene

transcription. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2503–6, 2005.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance : Mechanistic Insights. **Adv Nutr**, v. 2, p. 304–316, 2011.

KINOTE, A. et al. Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3633–3645, 2012.

KLEINER, D. E. et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, p. 1313–1321, 2005.

KOJI, N.; TERUYOSHI, Y. Functional Lipids in Metabolic Syndrome. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, p. 159–161, 2015.

KOLDERUP, A.; SVIHUS, B. Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis , Type 2 Diabetes , and Obesity. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2015, 2015.

LASKEWITZ, A. J. et al. Chronic prednisolone treatment aggravates hyperglycemia in mice fed a high-fat diet but does not worsen dietary fat-induced insulin resistance. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3713–3723, 2012.

LE, K.; INTRODUCTION, I. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. **Physiol Ver**, v. 90, p. 23–46, 2010.

LI, M. et al. ScienceDirect Dietary fish oil inhibits mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in diabetic rats by blocking nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2015.

LIMA, W. G.; MARTINS-SANTOS, M. E. S.; CHAVES, V. E. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. **Biochimie**, v. 116, p. 17–23, 2015.

MADERO, M. et al. Dietary fructose and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 2011.

MAHMOUD, A. A. A.; ELSHAZLY, S. M. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 1–8, 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. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 120, n. 2, p. 73–80, 2011.

MAKI, K. C. et al. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. **Nutrition Research**, v. 29, n. 9, p. 609–615, 2009.

MAMIKUTTY, N. et al. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

MAMIKUTTY, N. et al. The Establishment of Metabolic Syndrome Model by Induction of Fructose Drinking Water in Male Wistar Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014b.

MAMIKUTTY, N.; THENT, Z. C.; HAJI SUHAIMI, F. Fructose-drinking water induced nonalcoholic fatty liver disease and ultrastructural alteration of hepatocyte mitochondria in Male wistar rat. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, p. 835–839, 1995.

MELLOUK, Z. et al. The metabolic syndrome of fructose-fed rats : Effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids: intraperitoneal glucose tolerance test. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, p. 1087–1092, 2011.

MIKUSKA, L. et al. Chronic liquid nutrition intake induces obesity and considerable but reversible metabolic alterations in Wistar rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 225–243, 2016.

MURRU, E.; BANNI, S.; CARTA, G. Nutritional properties of dietary omega-3-enriched phospholipids. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

NG, M.; FLEMING, T. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**. 2014 Aug 30;384 (9945):766-81.

NOVAK, A. et al. Fructose-induced metabolic syndrome decreases protein expression and activity of intestinal P-glycoprotein.

Nutrition, v. 31, n. 6, p. 871–876, 2015.

OGUEH, O.; JOHNSON, M. R. The metabolic effect of antenatal corticosteroid therapy. **Human reproduction update**, v. 6, n. 2, p. 169–76, 2000.

P., S.; L., T. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 275, n. 5 38-5, p. E806–E813, 1998.

PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of Glucocorticoid Excess on Glucose Tolerance: Clinical and Preclinical Evidence. **Metabolites**, v. 6, 2016.

PINHEIRO, C. H. D. J. et al. Exercício físico previne alterações cardiometabólicas induzidas pelo uso crônico de glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 4, p. 400–408, 2009.

PROTZEK, A. O. P. et al. Augmented β -cell function and mass in glucocorticoid-treated rodents are associated with increased islet Ir- β /AKT/mTOR and decreased AMPK/ACC and AS160 signaling. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 6–11, 2014.

QUAX, R. A. et al. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 11, p. 670–686, 2013.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284–293, 2008.

RAFACHO, A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiologica**, v. 200, n. 3, p. 223–235, 2010.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. R49–R62, 2014a.

RAFACHO, A. et al. Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats. v. 9, n. 4, 2014b.

ROBERTS, C. K. et al. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1323–8,

2001.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23–43, 2002.

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

SHELUDIAKOVA, A.; ROONEY, K.; BOAKES, R. A. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 445–454, 2012b.

SHPIILBERG, Y. et al. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 671–680, 2012.

SILVA, K.F.; PRATA, A.; CUNHA, D.F. Frequência de síndrome metabólica e os padrões de consumo alimentar em adultos que vivem em uma área rural do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2011; 44(4): 425-9.

SLAVIN, B. G.; ONG, J. M.; KERN, P. A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **Journal of lipid research**, v. 35, n. 9, p. 1535–1541, 1994.

SORIA, A. et al. Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 4, p. 209–218, 2002.

STERN, M. P. et al. Does the Metabolic Syndrome Improve Identification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes and / or Cardiovascular Disease? **Diabetes Care**, v. 27, n. 11, p. 2676–2681, 2004.

TEFF, K. L. et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: Influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1562–1569, 2009.

TENENBAUM, A.; KLEMPFNER, R.; FISMAN, E. Z. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, p. 159, 2014.

TENENBAUM, H. et al. Long-term effect of bezafibrate on

pancreatic beta-cell function and insulin resistance in patients with diabetes. **Atherosclerosis**, v. 194, n. 1, p. 265–271, 2007.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **The British journal of nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347–355, 2004.

VAN RAALTE, D. H. et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: A randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 54, n. 8, p. 2103–2112, 2011.

VAN STAA, T. P. et al. Use of oral corticosteroids in the United Kingdom. **QJM.**, v. 93, n. 2, p. 105–111, 2000.

VASILJEVIĆ, A. et al. Enhanced prereceptor glucocorticoid metabolism and lipogenesis impair insulin signaling in the liver of fructose-fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1790–1797, 2013.

VIDIGAL, F.C.; BRESSAN, J.; BABIO, N.; SALAS, S.J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health** 2013; 13 (1): 1198.

WAJNGOT, A et al. Dexamethasone increases glucose cycling, but not glucose production, in healthy subjects. **The American journal of physiology**, v. 259, n. 5 Pt 1, p. E626-32, 1990.

WANG, O. et al. Effects of ferulic acid and γ -Oryzanol on high-fat and high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WU, T. et al. Timing of glucocorticoid administration determines severity of lipid metabolism and behavioral effects in rats. **Chronobiol Int**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2016.

Resultado de Solidação de Protocolo

Protocolo

PP0782

Título

METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS – LIDO C / ABORDAGENS ENDÓCRINAS E

METABÓLICAS

Data de Entrada

07/05/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 47/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Alex Rafacho, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: quinhentos camundongos (*Mus musculus*) e quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 05/09/2016

Data 05/06/2012

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**