



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

D'Angelo Carlo Magliano

Curta administração de GW501516 melhora o estado inflamatório do tecido adiposo branco, o dano hepático e a inflamação renal de camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Rio de Janeiro

2015

D'Angelo Carlo Magliano

Curta administração de GW501516 melhora o estado inflamatório do tecido adiposo branco, o dano hepático e a inflamação renal de camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Vázquez-Carrera

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M195 Magliano, D'Angelo Carlo.
Curta administração de GW501516 melhora o estado inflamatório do tecido adiposo branco, o dano hepático e a inflamação renal de camundongos alimentados com dieta rica em frutose / D'Angelo Carlo Magliano. – 2015
106 f.

Orientadora: Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda.
Coorientador: Manuel Vázquez-Carrera.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Sistema renina-angiotensina - Teses. 2. PPAR delta. 3. Inflamação - Teses. 4. Frutose - Teses. 5. Dietas - Teses. 6. Doenças induzidas pela nutrição - Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Márcia Barbosa Águila. II. Vázquez-Carrera, Manuel. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.2:613.2

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

D'Angelo Carlo Magliano

Curta administração de GW501516 melhora o estado inflamatório do tecido adiposo branco, o dano hepático e a inflamação renal de camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 5 de agosto de 2015.

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Vázquez-Carrera
Universitat de Barcelona

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Denise Mafra
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Tatiana El-Bacha Porto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À memória dos meus avós Argentina e Alcides

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e também à intercessão de Nossa Senhora das Graças. É preciso ser sempre firme na fé para alcançar as grandes Graças na nossa vida.

Agradeço aos meus orientadores Márcia e Manuel (Manel), que compraram minha ideia e me ajudaram bastante no desenvolvimento deste trabalho. *Gracias por todo, Manel!*

Agradeço a minha eterna orientadora, Vanessa, por torcer pelas minhas conquistas e nunca sair do meu lado. Essa conquista também é sua.

A todos os amigos Hermosa, Sandrinha, André, Fê Ornellas, Iara, Aline, Fran, Tatiane, Tamiris, Helder, Celinda, Paulinha, Verônica, Jorginho, Guilherme, Carol e Fabiane pelos momentos de descontração, de trabalho e de ajuda mútua. Sem vocês e nossa amizade a caminhada seria bem mais complicada.

Às técnicas Leila e Michele pelo carinho, lâminas cortadas, reagentes preparados e puxões de orelha.

A los amigos que hice en España durante mi estancia de estudios en Barcelona, Xevi, Gaia, Laia, Verónica fatalísima, Gemma, Luísa, Miren y Celia, y en especial a Emma que me ha enseñado perfectamente el cultivo de las 3T3-L1. También les doy gracias a Xavi, Greg, Isabella, Luis, Claudinha, Tadeo, Raúl, Sergito y Anna. Sois parte de un increíble y gran momento en mi vida! Merci a tots!

Fim desta parte, agradecendo à minha família e aos amigos de sempre. Eu amo todos vocês!

RESUMO

MAGLIANO, D'Angelo Carlo. *Curta administração de GW501516 melhora o estado inflamatório do tecido adiposo branco, o dano hepático e a inflamação renal de camundongos alimentados com dieta rica em frutose*. 2015. 106f. (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A superativação do eixo ECA/AT1r está intimamente relacionada à síndrome metabólica e no organismo tem grande relação com o quadro de inflamação. A administração de frutose, seja por dieta ou pela água, tem sido usada como um modelo para a indução da superatividade desse eixo e para o estudo das vias inflamatórias relacionadas ao AT1r. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a administração de GW501516 poderia diminuir a superativação do eixo ECA/AT1r e consequentemente diminuir os danos causados pela dieta rica em frutose. Para isso foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 que receberam uma dieta contendo 47% de frutose durante oito semanas ou uma dieta controle. Após oito semanas, os grupos foram redivididos aleatoriamente para o início da administração do GW501516 durante três semanas, totalizando quatro grupos experimentais. Os animais tratados apresentaram uma melhora da pressão arterial sistólica e também dos parâmetros urinários como proteinúria e ácido úrico. Houve ainda uma melhora dos triglicerídeos e ácido úrico plasmáticos. No tecido adiposo branco, o GW501516 foi capaz de diminuir a expressão dos componentes do eixo ECA/AT1r e também amenizou a inflamação causada pela dieta rica em frutose. No fígado, não houve alterações significativa do eixo, porém a fosforilação de JAK2 dependente de AT1r foi diminuída e consequentemente houve uma menor ativação das células estreladas no grupo que recebeu o GW501516. Além disso, as proteínas e genes relacionados à β -oxidação foram aumentados com o tratamento e aqueles relacionados à lipogênese *de novo*, diminuídos o que resultou em menor esteatose no parênquima hepático. Os rins apresentaram uma melhora da inflamação induzida pelo eixo, apesar de o eixo também não ter apresentado diferenças significativas com o tratamento. Também não foram encontradas diferenças significativas na expressão proteica e gênica das proteínas antioxidantes. Com esses resultados podemos concluir que a curta administração do GW501516 pôde aliviar os efeitos inflamatórios e a esteatose hepática causada pela dieta rica em frutose, podendo ser pensado como uma nova ferramenta terapêutica no tratamento da superativação do eixo ECA/AT1r.

Palavras-chave: Eixo ECA/AT1r. GW501516. Inflamação. Dieta rica em frutose. Histologia.

ABSTRACT

MAGLIANO, D'Angelo Carlo. *Short administration of GW501516 improves inflammatory state of white adipose tissue, liver damage and renal inflammation in mice fed a high-fructose diet*. 2015. 106f. (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

High-activation of ACE/AT1r axis is closely linked to metabolix syndrome and low-grade inflammation state. Fructose administration in water or in diet has been proposed as a model to study the high-activity of this axis and AT1r-related inflammatory pathways. In this view, we aimed to evaluate if GW501516 administration could decrease the high-activation of ACE/AT1r axis and consequently fructose damage. To this males mice C57Bl/6 were fed a high-fructose diet (47%) during eight weeks or standard-chow diet. After eight weeks, the groups were randomly divided to start treatment with GW501516, totaling four experimental groups. Animals treated with GW501516 presented an improvement of systolic blood pressure and in urinary parameters, as proteinuria and uric acid. Also was verified an improvement in plasmatic triglycerides and uric acid. In white adipose tissue, GW501516 was able to decrease the components of this axis and improved inflammation as well. In liver, it was not found differences in axis, but JAK2 phosphorylation AT1r-dependent was decreased and consequently it was found a diminished activations of hepatic stellate cells. In addition, proteins and genes related to β -oxidation were increased with GW501516 and those related to lipogenesis *de novo*, were diminished, improving hepatic parenchyma. Kidneys presented an improvement of inflammation state, although it was not found differences in axis with treatment. Also, it was not found differences in gene and protein expression in relation to anti-oxidants proteins. These results show that short-administration of GW501516 could alleviate inflammatory effects and hepatic steatosis caused by high fructose diet, suggesting that GW501516 could be a new therapeutic option to treat the high activation of ACE/AT1r axis.

Keywords: ACE/AT1r axis. GW501516. Inflammation. High-fructose diet. Histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da metabolização da frutose.....	20
Figura 2 –	Esquema ilustrativo dos três eixos dentro do SRA e de como a frutose poderia atuar na ativação do eixo ECA/AT1r.....	23
Figura 3 –	A superativação do eixo ECA/AT1r nos adipócitos.....	25
Figura 4 –	Metabolismo hepático da frutose.....	29
Figura 5 –	Esquema demonstrando os malefícios da frutose sobre o rim.....	34
Figura 6 –	Figura ilustrativa dos PPARs e dos seus mecanismos de ação.....	37
Figura 7 –	Evolução da massa corporal e dispersão de adipócitos.....	51
Figura 8 –	Pressão arterial sistólica.....	53
Figura 9 –	Níveis de RNAm do <i>Ppar-β/δ</i> , <i>Pdk4</i> e <i>Plin2</i> no tecido adiposo branco epididimário.....	54
Figura 10 –	Expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r no tecido adiposo branco epididimário.....	56
Figura 11 –	Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias no tecido adiposo branco epididimário.....	57
Figura 12 –	Níveis de RNAm do <i>Ppar-β/δ</i> , <i>Pdk4</i> e <i>Plin2</i> no fígado.....	59
Figura 13 –	Expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r no fígado.....	60
Figura 14 –	Expressão proteica de JAK2, JAK2 fosforilada e α-SMA no fígado.....	62
Figura 15 -	Análise histológica do fígado.....	63
Figura 16 -	Fotomicrografias do fígado.....	65
Figura 17 -	Expressão gênica e proteica de PPAR-α e seus genes-alvo.....	66
Figura 18 -	Expressão gênica e proteica de SREBP-1c, ChREBP e expressão proteica de SCD.....	67
Figura 19 -	Níveis de fosforilação de AKT, gliconeogênese e ativação da AMPK....	69
Figura 20 -	Níveis de RNAm do <i>Ppar-β/δ</i> , <i>Pdk4</i> e <i>Cpt1</i> nos rins.....	71
Figura 21 -	Expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r nos rins.....	72
Figura 22 -	Expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios nos rins.....	73
Figura 24 -	Mecanismo de ação do GW501516 no fígado.....	82

Figura 25 - Mecanismo de ação do GW501516 nos rins..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais.....	43
Tabela 2 -	<i>Primers</i> utilizados no RT-q-PCR.....	49
Tabela 3 -	Variáveis morfológicas, PAS, determinações plasmáticas e urinárias...	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-Coa carboxilase
ADP	Adenosina difosfato, <i>adenosine diphosphate</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato, <i>adenosine monophosphate</i>
AMPK	Proteína quinase ativada pelo AMP, <i>AMP-activated protein kinase</i>
Ang-II	Angiotensina-II
AT1r	Receptor tipo 1 da angiotensina II, <i>angiotensin-II type 1 receptor</i>
ATP	Adenosina trifosfato, <i>adenosine triphosphate</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMC	Carboximetilcelulose
ChREBP	Proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato, <i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1, <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F1F	Frutose-1-fosfato
GLUT	Transportador de glicose, <i>glucose transporter</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade, <i>high density lipoprotein</i>
HFru	<i>High fructose</i>
IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor de insulina, <i>insulin receptor substrate</i>
I κ B- α	Inibidor do NF- κ B- α
JAK2	Janus quinase 2, <i>janus kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos-1, <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica, <i>nonalcoholic fatty liver</i>

	<i>disease</i>
NASH	Esteatohepatite não alcoólica, <i>nonalcoholic steatohepatitis</i>
NF-κB	Fator nuclear-κB, <i>nuclear factor-κB</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase, <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PGC	Co-ativador do ativador de proliferação peroxissomal gama, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
PPAR	Receptor ativador de proliferação peroxissomal, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR, <i>PPAR responsive elemento</i>
RXR	Receptor X retinóide
SC	<i>Sstandard-chow</i>
SIRT1	Sirtuína 1
SRA	Sistema renina angiotensina
SREBP-1c	Proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c, <i>sterol regulatory elemento-binding protein-1c</i>
TAB	Tecido adiposo branco
TG	Triglicerídeos
TNF-α	fator de necrose tumoral-α, <i>tumor necrosis factor-α</i>
α-SMA	α-actina de músculo liso, <i>α-smooth muscle actin</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Síndrome metabólica e frutose	18
1.2	Frutose, SRA e eixo ECA/AT1	21
1.3	Eixo ECA/AT1r, TAB e inflamação	24
1.4	Fígado e NAFLD	26
1.4.1	<u>NAFLD e ingestão de frutose</u>	28
1.4.2	<u>Eixo ECA/AT1r e células estreladas hepáticas</u>	29
1.4.3	<u>Fígado e AMPK</u>	31
1.5	Frutose e danos renais	33
1.6	PPARs	36
2	OBJETIVOS	41
2.1	Gerais	41
2.2	Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Animais, dieta e tratamento com GW501516	42
3.2	Pressão Arterial Sistólica (PAS)	44
3.3	Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose	44
3.4	Coleta de urina	44
3.5	Eutanásia e extração de órgãos e tecidos de estudo	45
3.6	Análise plasmática	46
3.7	Análise urinária	46
3.8	Análise microscópica TAB Epididimário	46
3.9	Bioquímica e análise microscópica do fígado	47
3.10	Imunohistoquímica de α-SMA	47
3.11	Imunofluorescência de α-SMA	48
3.12	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real	48
3.13	<i>Imunoblotting</i>	50
3.14	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Efeitos do GW501516 em variáveis morfológicas, ingestão hídrica, urina,	

	PAS e determinações plasmáticas	52
4.2	Dados do TAB Epididimário	56
4.2.1	<u>Efeitos do GW501516 sobre o <i>Ppar-β/δ</i> e seus genes-alvo no TAB epididimário</u>	56
4.2.2	<u>GW501516 reduz a ativação do eixo ECA/AT1r induzido pela dieta rica em frutose e melhora o quadro inflamatório do TAB epididimário</u>	58
4.3	Dados do fígado	61
4.3.1	<u>Efeitos do GW501516 sobre o <i>Ppar-β/δ</i> e seus genes-alvo no fígado</u>	61
4.3.2	<u>GW501516 previne a fosforilação de JAK-2 induzida pela dieta rica em frutose e reduz a ativação de células estreladas no fígado independentemente da expressão de AT1r</u>	61
4.3.3	<u>GW501516 estimula genes e proteínas envolvidas na β-oxidação e diminui a lipogênese hepática induzida pela dieta rica em frutose</u>	67
4.3.4	<u>GW501516 alivia a gliconeogênese possivelmente por uma maneira dependente de AMPK</u>	71
4.4	Dados dos rins	73
4.4.1	<u>Efeitos do GW501516 sobre o <i>Ppar-β/δ</i> e seus genes-alvo nos Rins</u>	73
4.4.2	<u>Efeitos anti-inflamatórios do GW501516 nos rins são independentes da <i>downregulation</i> de AT1r</u>	73
4.4.3	<u>GW501516 não reduz o estresse oxidativo induzido pela dieta rica em frutose no rim</u>	73
5	DISCUSSÃO	79
	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa	101
	ANEXO B – Premiação no II Encontro Discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental	102
	ANEXO C – Premiação no XVI Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica	103
	ANEXO D – Entrevista para a revista “Evidências em Obesidade” da Associação Brasileira de Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica	104
	ANEXO E – Artigo publicado na revista Endocrine, Abril de 2015	105
	ANEXO F – Submissão de artigo à Biochimica et Biophysica Acta	106

INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica é caracterizada pela associação de vários fatores de risco, incluindo hipertensão, resistência à insulina (RI) e a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*), além de um baixo grau de inflamação crônica (Anderson e Borlak, 2008; Weiss e Kaufman, 2008). Mudanças nos hábitos alimentares estão entre os principais fatores que contribuem para a crescente prevalência da síndrome metabólica no mundo. Tais mudanças são caracterizadas pelo aumento da ingestão alimentar de gordura e açúcares refinados, particularmente a frutose (Laville e Nazare, 2009).

A frutose é um monossacarídeo presente em pequenas quantidades em frutas e no mel, contudo desde a introdução da frutose como um adoçante de comidas e bebidas em 1967, seu consumo cresceu rapidamente e tem contribuído para o aumento da incidência da síndrome metabólica (Tappy e Le, 2010).

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é classicamente descrito como um importante regulador da pressão arterial, mas recentes estudos têm mostrado que o SRA tem papel importante no desenvolvimento da síndrome metabólica. Evidências experimentais sugerem que nessa síndrome, o eixo do SRA composto pela enzima conversora de angiotensina (ECA) / receptor tipo 1 da angiotensina(Ang)-II (AT1r, *angiotensin-II type 1 receptor*) está superativado e dietas ricas em frutose podem ser usadas como um modelo experimental para aumentar a pressão arterial sistólica (PAS) pela ativação desse eixo (Fukui *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). Através do AT1r, a Ang-II pode exercer seus efeitos pró-inflamatórios. No tecido adiposo branco (TAB), a superativação do AT1r está intimamente ligada à inflamação e hipertrofia dos adipócitos (Santos *et al.*, 2008). No fígado, a superativação do AT1r leva a ativação de células estreladas hepáticas através da Janus Quinase-2 (JAK-2, *Janus Kinase-2*) (Granzow *et al.*, 2014). Além da superativação do AT1r, o excesso de frutose no fígado aumenta a lipogênese através da proteína ligante ao elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c, *sterol regulatory elemento-binding protein-1c*) e da proteína ligante ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP, *carbohydrate response element-binding protein*), e diminui a β -oxidação pela inibição do receptor ativador de proliferação peroxissomal (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*)- α (Uyeda e Repa, 2006; Roglans *et al.*, 2007). Nos rins, quando a Ang-II se

liga ao AT1r promove o desenvolvimento de falência renal causando hipertrofia de células renais, aumentando a pressão microvascular do rim, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo a apoptose, a inflamação mediada pela subunidade p-65 do fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) e fosforilação da quinase reguladora de sinal extracelular (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) 1/2 (Karuppagounder *et al.*, 2015).

Os PPARs são uma família de fatores de transcrição intimamente ligados ao metabolismo celular de lipídeos, carboidratos, proteínas e proliferação celular, existentes em três isoformas: PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ (Schiffrin *et al.*, 2003). O PPAR- α é predominantemente expresso no fígado, músculo e coração e sua ativação, de acordo com estudos já realizados, sugere uma participação desse receptor no metabolismo lipídico. O PPAR- γ é expresso principalmente nos tecidos adiposos branco e marrom, sendo responsável, dentre outras funções, pela lipogênese. Por fim, o PPAR- β/δ apresenta uma ampla distribuição corporal com diversas funções como a oxidação de ácidos graxos no músculo e regulação geral de energia (Harrington *et al.*, 2007).

A utilização de agonistas dos PPARs tem sido descrita na literatura com efeitos benéficos sobre a ingestão alimentar, massa corporal, localização da deposição lipídica e sobre a esteatose pancreática e hepática, geradas a partir da administração de diferentes dietas (Nagasawa *et al.*, 2006; Fernandes-Santos *et al.*, 2009). Apesar de muitos estudos mostrarem os efeitos de agonistas PPAR- α e PPAR- γ , somente nos últimos anos as pesquisas com o PPAR- β/δ aumentaram.

Em vista do crescimento da síndrome metabólica e comorbidades relacionadas, como a hipertensão arterial, e devido à necessidade de estudos que esclareçam as formas de atuação dos agonistas PPAR- β/δ , esta tese se torna importante para a complementação literária da atuação do GW501516, um agonista PPAR- β/δ , dentro de um modelo que mimetize desordens metabólicas.

Esta tese de doutorado deu origem ao artigo intitulado “*Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system*” publicado na revista *Endocrine* em Abril de 2015. Os dados de tecido adiposo gerados nesta tese foram apresentados no II Encontro Discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental realizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro em 2014 e ganhou a premiação de

melhor pôster. Os dados de fígado gerados foram apresentados no XVI Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica realizado na cidade do Rio de Janeiro em 2015 e ganhou a premiação como o melhor trabalho da área básica. Os dados relacionados aos rins deram origem a um segundo artigo intitulado “*GW501516 ameliorates a fructose-induced inflammation independent of AT1r downregulation in the kidney*” que foi submetido à revista *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* e enviados ao XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes a ser realizado em Porto Alegre, em Novembro de 2015.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Síndrome metabólica e frutose

O aumento da prevalência de obesidade e síndrome metabólica por todo o mundo está predispondo os indivíduos a muitas doenças e desordens e, pela primeira vez, as crianças da América podem ter uma vida mais curta que a de seus pais (Rask-Madsen e Kahn, 2012). No Brasil, a obesidade e síndrome metabólica vêm crescendo cada vez mais. Levantamentos apontam que 50% da população brasileira está acima do peso. Entre as crianças, esses números estariam em torno de 15% (ABESO, 2015).

A síndrome metabólica é uma condição que engloba além da obesidade central, um prejuízo na tolerância à glicose, diabetes, dislipidemia com aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG) e diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL, *high density lipoprotein*), NAFLD e hipertensão arterial (Reaven, 2011). Atualmente, esta síndrome é reconhecida como uma entidade nosológica pela Organização Mundial da Saúde e numerosas sociedades profissionais (Soyal *et al.*, 2015). O grande interesse no estudo da síndrome metabólica nas últimas décadas tem melhorado a percepção da sua fisiologia integrativa complexa e as consequências dessa condição (Rask-Madsen e Kahn, 2012) e as mudanças nos hábitos alimentares estão entre os principais fatores que contribuem para a crescente prevalência da síndrome metabólica no mundo. Tais mudanças são caracterizadas pelo aumento da ingestão alimentar de gordura e açúcares refinados, particularmente a frutose (Laville e Nazare, 2009).

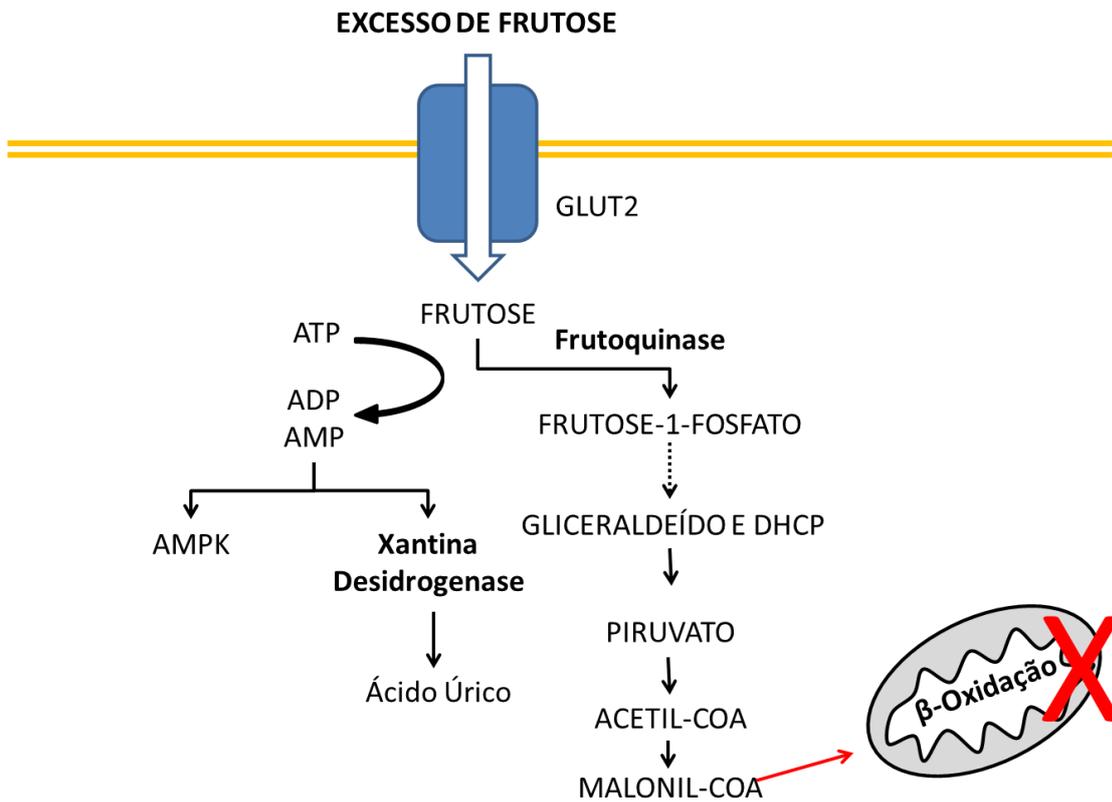
A frutose é uma hexose de fórmula química $C_6H_{12}O_6$, semelhante à glicose. É um monossacarídeo presente em pequenas quantidades em frutas e no mel, contudo, desde a introdução da frutose como um adoçante de comidas e bebidas em 1967, seu consumo aumentou rapidamente e tem contribuído para o aumento da incidência da síndrome metabólica (Tappy e Le, 2010). Estudos experimentais desde 1950 mostram a peculiar habilidade da frutose em induzir a RI em modelos experimentais. Atualmente as pesquisas mostram que a ingestão crônica de frutose pode levar a todas as comorbidades associadas à síndrome metabólica em modelos

experimentais, como o estresse oxidativo, disfunção endotelial, NAFLD e doenças renais (Johnson *et al.*, 2013). Sabe-se, no entanto, que esses efeitos não são encontrados quando, em modelos experimentais, se administra dietas ou bebidas com elevada taxa de glicose, o que sugere que as mudanças metabólicas induzidas por frutose não são mediadas apenas pelo excessivo consumo de carboidratos simples em geral, mas que são exclusivas do consumo de frutose (Jameel *et al.*, 2014).

A frutose é absorvida no enterócito por seus receptores de transporte de glicose (GLUT, *glucose transporter*)⁵, localizados no polo apical da célula. Em seguida se dirige para a circulação porta através de seus receptores GLUT2 na superfície basolateral do enterócito, sendo, então, conduzida ao fígado onde sofrerá sua metabolização de maneira diferente que a glicose (Douard e Ferraris, 2008). Ao entrar no hepatócito por seus receptores GLUT2, a frutose é rapidamente fosforilada a frutose-1-fosfato (F1F) por ação da frutoquinase. A frutoquinase não é inibida pela adenosina difosfato (ADP, *adenosine diphosphate*) ou por concentrações de citrato e, portanto, não é regulada pelo estado energético celular. Nesse ponto, a frutose difere da glicose, já que tanto o ADP quanto as concentrações de citrato exercem um *feedback* negativo sobre as enzimas dos passos iniciais da glicólise. Consequentemente, a falta do *feedback* negativo faz com que, virtualmente, toda a frutose ingerida seja rapidamente convertida em F1F (Tappy *et al.*, 2010). A rápida conversão de frutose em F1F conduz a um desequilíbrio entre adenosina monofosfato (AMP, *adenosine monophosphate*) e adenosina trifosfato (ATP, *adenosine triphosphate*), aumentando a razão AMP/ATP. O destino deste AMP é definido por duas enzimas: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) e a xantina desidrogenase. Quando a xantina desidrogenase é mais ativa que a AMPK, o AMP é convertido em ácido úrico, gerando hiperuricemia, uma das condições encontradas na síndrome metabólica (Abdelmalek *et al.*, 2010). Além da formação de ácido úrico, a frutose é incorporada na via glicolítica após sua fosforilação. O excesso de frutose gera um aumento da produção de acetil-Coa que acaba excedendo a habilidade do ciclo tricarboxílico de metabolizá-la. O excesso de acetil-Coa no citoplasma serve como um substrato para a lipogênese *de novo*. Essa molécula é convertida pela Acetil-Coa Carboxilase (ACC) em malonil-Coa que inibe a β -oxidação mitocondrial (Lim *et al.*, 2010). O

excesso de frutose e seus malefícios sobre o fígado serão discutidos na sessão 2.4 Frutose, Fígado e NAFLD.

Figura 1 - Esquema da metabolização da frutose pelo fígado



Legenda: Após sua entrada pela GLUT2 nos hepatócitos, a frutose é rapidamente metabolizada pela frutoquinase em frutose-1-fosfato, que segue a via glicolítica até a formação do piruvato. A grande atividade da frutoquinase diante do excesso de frutose leva a um aumento da razão AMP/ATP que resulta na formação de ácido úrico pela xantina desidrogenase. De maneira semelhante, inicia-se uma intensa formação de acetil-Coa no interior dos hepatócitos. Esse acetil-CoA é convertido em malonil-CoA que inibe diretamente a β -oxidação. Adaptado de (Tappy e Le, 2010). Abreviações: ATP – adenina trifosfato, *adenine triphosphate*; ADP - adenina difosfato, *adenine diphosphate*; AMP - adenina monofosfato, *adenine monophosphate*; AMPK - proteína quinase ativada por AMP, *AMP-activated protein kinase*; DHCP – Dihidroxiacetona fosfato, GLUT2 – transportador de glicose 2; *glucose transporte 2*.

Fonte: O autor, 2015

1.2 Frutose, SRA e o eixo ECA/AT1r

As dietas ricas em frutose também apresentam a peculiaridade de causar hipertensão em modelos experimentais (Farah *et al.*, 2006; Sanchez-Lozada *et al.*, 2008; Dianat *et al.*, 2015) e em humanos (Nguyen *et al.*, 2009; Kell *et al.*, 2014). Existem diversos mecanismos que poderiam explicar o aumento da pressão arterial em animais que receberam essa dieta e serão descritos a seguir.

Dietas ricas em frutose são capazes de aumentar a produção de metilglioxal, um composto formado pela eliminação não enzimática de fosfato do gliceraldeído fosfato e da dihidroxicetona fosfato, dois intermediários da glicólise (Liu *et al.*, 2011a). Este composto é um aldeído altamente tóxico, sendo capaz de gerar EROs e reagir com os grupos sulfídricos das proteínas, alterando suas funções. Ele também pode alterar a função de canais de cálcio, levando a um aumento do cálcio intracelular que gera resistência vascular em células musculares lisas (Vasdev *et al.*, 2004). Além disso, a intensa fosforilação de frutose em F1F diminui os níveis de ATP celulares, prejudicando a síntese de óxido nítrico, corroborando também para o quadro de hipertensão arterial (DiNicolantonio e Lucan, 2014). A frutose ainda é capaz de estimular o núcleo ventromedial do hipotálamo o que gera um aumento da atividade simpática. Essa, por sua vez, causa um aumento da retenção de sódio e da produção de renina pelo aparelho justaglomerular dos rins (DiNicolantonio e Lucan, 2014). Por fim, já foi descrito que o excesso de frutose por si só é capaz de aumentar os níveis de RNAm do AT1r (Giacchetti *et al.*, 2000).

O SRA começou a ser descoberto em 1898 por Tiegerstedt e Bergman e somente trabalhos das décadas 40 e 50 reconheceram e demonstraram sua função. Inicialmente o SRA foi pensado como um sistema endócrino pelo qual o rim influenciaria o balanço hidroeletrolítico e atuaria da regulação cardiovascular (Dzau *et al.*, 1988). Depois da descoberta de inúmeros peptídeos que inibem a formação da Ang-II revelando outras funções fisiológicas do SRA, houve uma mudança do seu conceito inicial e hoje se sabe que o sistema também atua na estruturação e função de alguns órgãos, assumindo mecanismos parácrinos e autócrinos, e interferindo na sinalização de outras vias. Atualmente se sabe ainda que muitos tecidos e células contêm todos os componentes necessários celulares para a formação da Ang-II *in*

situ (Zhuo *et al.*, 2013), compondo o “SRA local” ou “SRA tecidual”, que será discutido mais adiante.

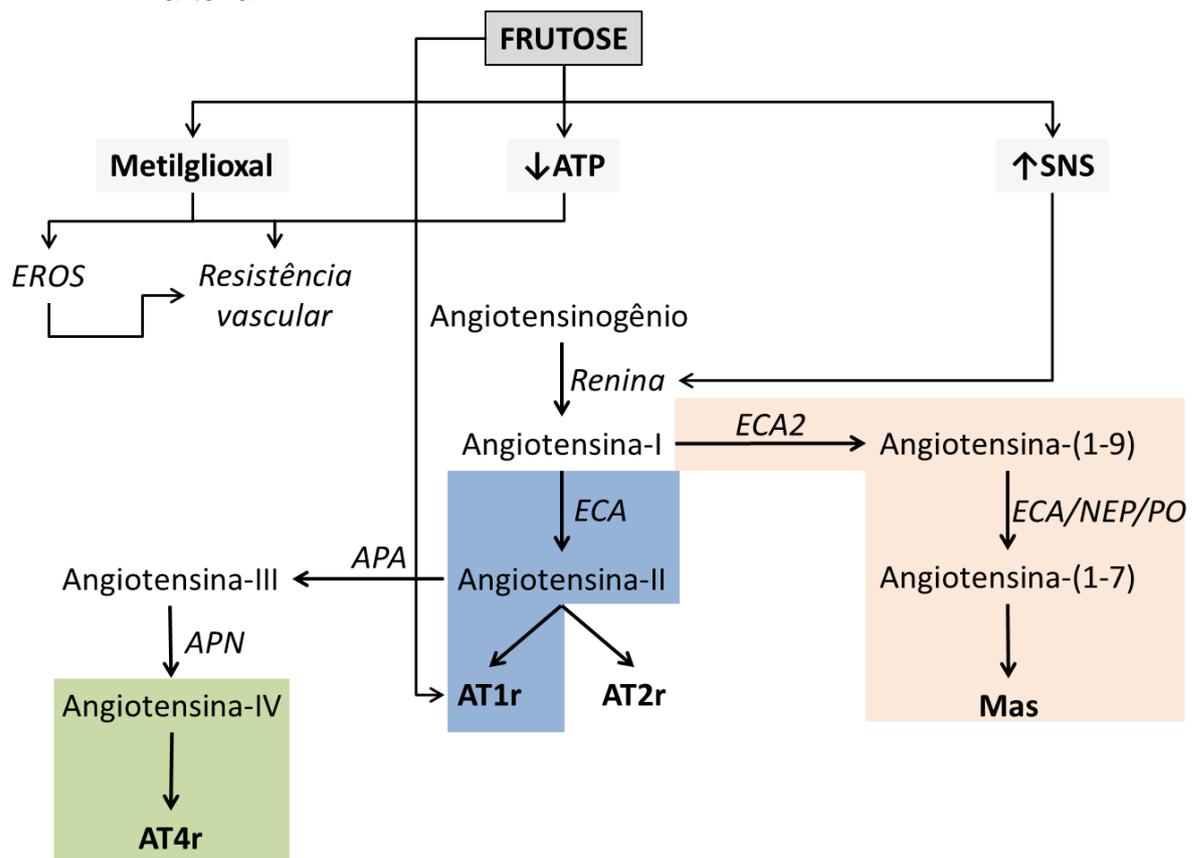
Classicamente a renina é sintetizada no aparelho justaglomerular dos rins em resposta a três estímulos: 1) diminuição da pressão arterial detectada por barorreceptores; 2) diminuição dos níveis de sódio no ultrafiltrado, detectada pela mácula densa; 3) aumento da atividade simpática. A renina é uma enzima que possui como substrato o angiotensinogênio, uma proteína produzida pela zona pericentral dos lóbulos hepático e que circula como um peptídeo inativo. Após a ação da renina, o angiotensinogênio forma um decapeptídeo denominado Ang-I que não possui efeito fisiológico. Esta reação é o passo limitante para a formação da Ang-II. A Ang-I por sua vez sofre hidrólise pela ECA e é convertida em um octapeptídeo ativo, a Ang-II. A ECA é predominantemente encontrada no endotélio dos vasos pulmonares. Os principais efeitos da Ang-II se dão através do AT1r, como vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula suprarrenal, anti-diurese etc, enquanto o AT2r, de forma geral, contrabalancearia esses efeitos (Ferrao *et al.*, 2014).

O SRA local já foi descrito em diversos tecidos como o tecido adiposo branco (TAB), fígado, rins, pâncreas, suprarrenais, sistema reprodutor, coração e sistema nervoso central (Paul *et al.*, 2006). O pré-requisito para que um SRA local seja identificado é a existência dos componentes necessários desse sistema para a biossíntese de Ang-II a nível tecidual. Dessa forma, o SRA local atua de forma parácrina e autócrina com as vias de sinalização locais regulando a fisiologia e estrutura do órgão em questão. Dentre as funções do SRA local destacam-se a regulação do crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose celular; geração de EROs, desencadeamento da inflamação e fibrose tecidual e estabelecimento de ligações cruzadas com alguns hormônios. O SRA local ainda pode ser controlado de maneira independente do SRA sistêmico (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008).

Além disso, vários achados na literatura sugerem novas propriedades para esse sistema, com novas enzimas, diferentes rotas para a formação da Ang-II, novos receptores e ainda novos peptídeos derivados da Ang-II. Desta forma o clássico eixo ECA/AT1r descrito anteriormente não é a única via de sinalização dentro do SRA, já que outros eixos como ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas e Ang-IV/AT4r indicam novas atividades dessa cascata (Harding *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2003).

Como as dietas ricas em frutose são caracterizadas pela ativação do eixo ECA/AT1r do SRA (Fukui *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012), serão descritas nas próximas sessões a relação entre esse eixo e a sua superativação no TAB, fígado e rins. A Figura 2 representa de forma esquemática a ação da frutose sobre o eixo ECA/AT1r e aumento da pressão arterial e também evidencia outros dois eixos dentro do SRA.

Figura 2 - Esquema ilustrativo dos três eixos dentro do SRA e de como a frutose poderia atuar na ativação do eixo ECA/AT1r e no aumento da pressão arterial



Legenda: ATP – adenina trifosfato, *adenine triphosphate*; SNS – sistema nervoso simpático; EROs – espécies reativas de oxigênio; ECA – enzima conversora de angiotensina; NEP – neprilisina; PO – prolil oligopeptidase; APA – aminopeptidase A; APN – aminopeptidase N; AT1r – receptor de angiotensina-II tipo 1; AT2r – receptor de angiotensina-II tipo 2; AT4r – receptor de angiotensina-II tipo 4.

Fonte: O autor, 2015

1.3 Eixo ECA/AT1r, TAB e inflamação

O TAB é composto por uma população de células que modula não somente a biologia do tecido adiposo, mas também a sensibilidade à insulina, a biologia dos tecidos reprodutivos e endócrinos, participam da imunidade e também da inflamação. Já existem diversas evidências sugerindo que a inflamação tem um papel importante no início e na manutenção da obesidade através da adipogênese (Santos *et al.*, 2012). O TAB durante a inflamação sofre um remodelamento tecidual, passando a apresentar hipertrofia e hiperplasia de adipócitos assim como uma mudança do fenótipo de macrófagos locais (polarização de macrófagos) do tipo M2, presentes principalmente em TAB saudável, para o tipo M1, presentes no TAB inflamado e obeso. Além disso, ocorre um recrutamento local de células imunitárias para o TAB que corroboram com o quadro de inflamação (Fujisaka *et al.*, 2009). Macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*)- α , a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP, *monocyte chemoattractant protein*)-1 e a interleucina(IL)-6 que contribuem substancialmente para o desenvolvimento da RI. Macrófagos M2 expressam proteínas diferentes das do M1, como o CD (*cluster of differentiation*)206, e sintetizam IL-10, uma citocina anti-inflamatória, participando ainda do reparo e remodelamento tecidual (Lumeng *et al.*, 2008). Dessa forma o TAB se torna um alvo de grande importância para estudos relacionados à obesidade e síndrome metabólica.

O TAB é um tecido caracterizado por apresentar todos os componentes do SRA a nível proteico e de RNAm (Marcus *et al.*, 2013) e a expressão e secreção de angiotensinogênio pelos adipócitos também exercem papel importante no controle e manutenção da pressão arterial sistêmica (Yiannikouris *et al.*, 2012). A Ang-II no TAB é capaz de inibir ou acelerar o processo de diferenciação de adipócitos *in vitro*, contudo a maioria dos artigos na literatura apontam a Ang-II como inibidora da adipogênese (Tomono *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2010). Além desse controle na população de adipócitos, a Ang-II também pode promover o aumento da inflamação do tecido através do estímulo da secreção de citocinas inflamatórias. Por exemplo, já foi demonstrado que a Ang-II aumenta os níveis de RNAm de MCP-1 no TAB de camundongos que receberam uma infusão de Ang-II (Tsuchiya *et al.*, 2006). A Ang-II

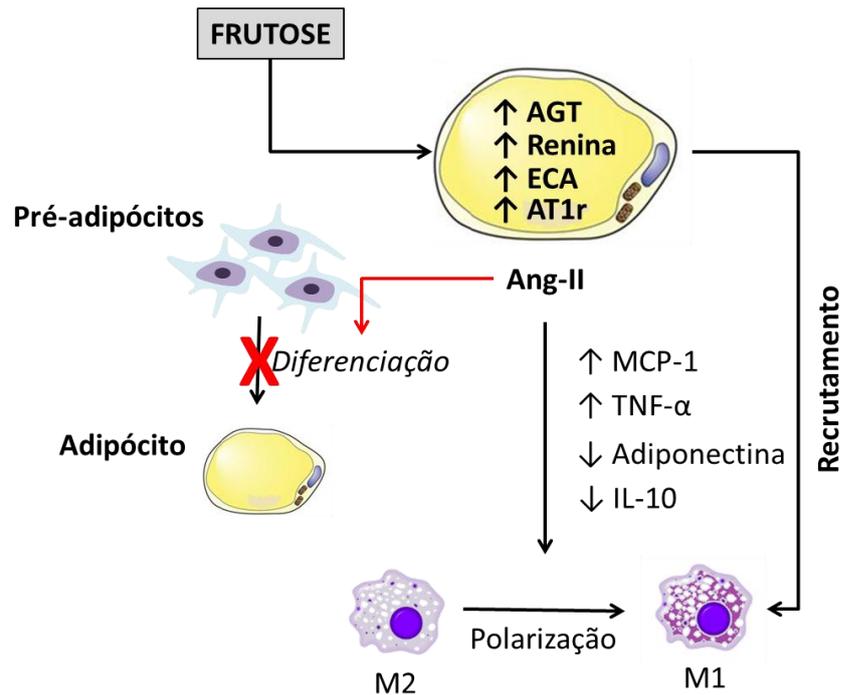
colabora ainda para o quadro inflamatório do TAB recrutando e também promovendo a polarização de macrófagos em macrófagos do tipo M1 (Fujisaka *et al.*, 2011).

A adiponectina, uma citocina considerada um hormônio produzido pelo TAB com funções anti-inflamatórias e efeitos na sensibilidade à insulina, tem sua ação prejudicada pelo aumento da Ang-II no TAB (Kadowaki *et al.*, 2006) e concordando com esse achado, a inibição do SRA em humanos melhora os níveis de adiponectina plasmáticos (Furuhashi *et al.*, 2003). Todas essas ações mediadas pela superativação do eixo ECA/AT1r no TAB podem ser visualizadas na figura 3.

É importante ressaltar dentro deste tema que a maioria dos efeitos da Ang-II no TAB se dá por sua ligação ao AT1r, que é mais expresso, e ao AT2r, que é menos expresso. Além disso, o AT1r apresenta dois subtipos, sendo o AT1ar e o AT1br (Marcus *et al.*, 2013). Trabalhos evidenciam que o AT1br seria o principal responsável pelo desenvolvimento da inflamação no TAB, já que animais *knockout* para o AT1ar alimentados com dieta rica em gordura continuam a desenvolver o perfil inflamatório da obesidade, enquanto que o tratamento com bloqueadores do AT1r, que bloqueiam tanto o AT1ar quanto o AT1br, melhora o quadro inflamatório e realiza a polarização de macrófagos M1 (pro-inflamatórios) para macrófagos M2 (anti-inflamatórios) (Ma *et al.*, 2011).

O TAB é conhecido por ser a maior fonte de citocinas inflamatórias presentes no plasma. Devido ao aumento do estado inflamatório desse tecido, os níveis plasmáticos das citocinas também aumentam e acabam por influenciar a função e estrutura de outros órgãos (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012).

Figura 3 - Superativação do eixo ECA/AT1r nos adipócitos



Legenda: A superativação do eixo ECA/AT1r em adipócitos culmina na polarização de macrófagos do tipo M2 para macrófagos do tipo M1, além do recrutamento desses últimos. Os macrófagos M1 apresentam características pró-inflamatórias que desencadeiam o aparecimento da inflamação no TAB. Além disso, a Ang-II é capaz de inibir a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Abreviações: AGT – angiotensinogênio; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*; Ang-II – angiotensina-II; MCP-1 - proteína quimioatratora de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; TNF- α – fator de necrose tumoral- α , *tumor necrosis factor- α* ; IL-10 – interleucina-10; M2 – macrófago de fenótipo M2; M1 – macrófago de fenótipo M1.

Fonte: Adaptado de (Marcus *et al.*, 2013)

1.4 Fígado e NAFLD

O fígado é um órgão central no metabolismo e uma de suas funções é manter os níveis de glicose plasmática de acordo com o estado nutricional do organismo. A glicose, no fígado, também é convertida em ácidos graxos que são utilizados para a síntese de TG que são a primeira fonte de estoque energético. Hepatócitos saudáveis oxidam ácidos graxos através de enzimas que ficam nos peroxissomas, mitocôndrias e retículo endoplasmático (Musso *et al.*, 2009). Os triglicerídeos, por sua vez, são empacotados em lipoproteínas no retículo endoplasmático granuloso e complexo de Golgi, e, então, exportados para o estoque no TAB. Alterações moleculares e fisiológicas no quadro da síndrome metabólica resultam em um

excessivo acúmulo de TG no tecido hepático conduzindo à NAFLD (Berlanga *et al.*, 2014).

A NAFLD é a mais comum desordem hepática no mundo e em problemas metabólicos sua incidência corresponde a 70%-90% dos casos. Por conta disso, a NAFLD foi classificada como o componente hepático da síndrome metabólica. De acordo com a Associação Americana de Estudos de Doenças do Fígado, a NAFLD é definida como um acúmulo de gordura no tecido hepático excedendo de 5%-10% do seu peso sem que haja algum histórico de ingestão excessiva de álcool ou outras doenças relacionadas e sua prevalência é estimada em 10%-25% da população no mundo ocidental (Tsochatzis e Papatheodoridis, 2011). No Brasil, a prevalência de NAFLD na população adulta foi estimada em 19,7% (ABESO, 2015).

A lipogênese *de novo* é uma via enzimática que contribui substancialmente para o desenvolvimento da NAFLD. Esse processo é regulado por fatores de transcrição como SREBP-1c e ChREBP. A ativação de ambos leva à conversão do piruvato em ácidos graxos livres no fígado e a um aumento das enzimas lipogênicas (Chen *et al.*, 2004; Denechaud *et al.*, 2008) culminando com o acúmulo excessivo de lipídios no tecido hepático.

A NAFLD pode ser benigna, mas também pode evoluir para a esteatohepatite não alcoólica (NASH, *nonalcoholic steatohepatitis*), uma patologia que também está intimamente ligada à síndrome metabólica. Embora a patogênese da NASH ainda não esteja bem definida, uma teoria denominada de “*two-hits*” foi proposta. De acordo com esta teoria, a esteatose hepática é principalmente causada pelo acúmulo de lipídios no tecido hepático (*first hit*), evoluindo então para a NASH devido aos efeitos do estresse oxidativo, EROs, peroxidação lipídica e/ou citocinas inflamatórias (*second hit*). Quando as EROs se ligam aos hepatócitos ocorre uma resposta imune muito prejudicial, formando corpos hialínicos de Mallory ou ativando as células estreladas hepáticas que promovem a síntese de colágeno no espaço de Disse. As EROs produzem danos hepatocelulares através de muitos mecanismos como a inibição da Na⁺/K⁺ ATPase da membrana, inibição da cadeia respiratória de mitocôndria, inativação dos canais de sódio da membrana plasmática e mediação da liberação de citocinas inflamatórias pelas células de Kupffer, o que prejudica ainda mais a função hepática. O quadro da NASH pode evoluir para cirrose através da fibrose hepática mediada pela intensa síntese colágena e finalmente conduzir ao hepatocarcinoma (Tacke *et al.*, 2009; Jaeschke e Ramachandran, 2011).

Concomitante ao processo de injúria do fígado, o TAB também exerce forte influência no desenvolvimento da NAFLD/NASH. Isso se deve a uma íntima relação que existe entre esses órgãos, já que vias de sinalização entre eles se interrelacionam tanto no metabolismo quanto no processo imune (Wree *et al.*, 2011).

A β -oxidação, uma sequência de remoção de dois fragmentos de carbono pela produção de cetonas ou geração de energia no interior na mitocôndria, é a principal rota do metabolismo de ácidos graxos longos sob condições normais. Esse processo, no entanto, pode ser afetado em diferentes pontos de ação enzimática e também corroboram para o desenvolvimento da NAFLD (Schreurs *et al.*, 2010). A importação de ácidos graxos para a matriz mitocondrial para a β -oxidação se dá pela sua ligação covalente à carnitina, uma molécula carreadora da mitocôndria. Cada ácido graxo se liga à carnitina através da carnitina O-palmitoiltransferase 1 (CPT1), uma enzima que também é responsável pela regeneração da carnitina, sendo esse um passo regulatório e limitante da β -oxidação. A malonil-CoA, formada pela dimerização e subsequente descarboxilação do acetil-CoA (primeiro passo da síntese de ácidos graxos) é conhecida por ser um inibidor da CPT1. As concentrações de malonil-CoA no tecido hepático começam a aumentar quando há um acúmulo de citrato, o primeiro substrato da lipogênese *de novo*, que é formado além da capacidade de oxidação ou de necessidade do fígado. Assim, o aumento da lipogênese *de novo* e o prejuízo da β -oxidação, corroboram para o desenvolvimento da NAFLD (Lim *et al.*, 2010).

1.4.1 NAFLD e ingestão de frutose

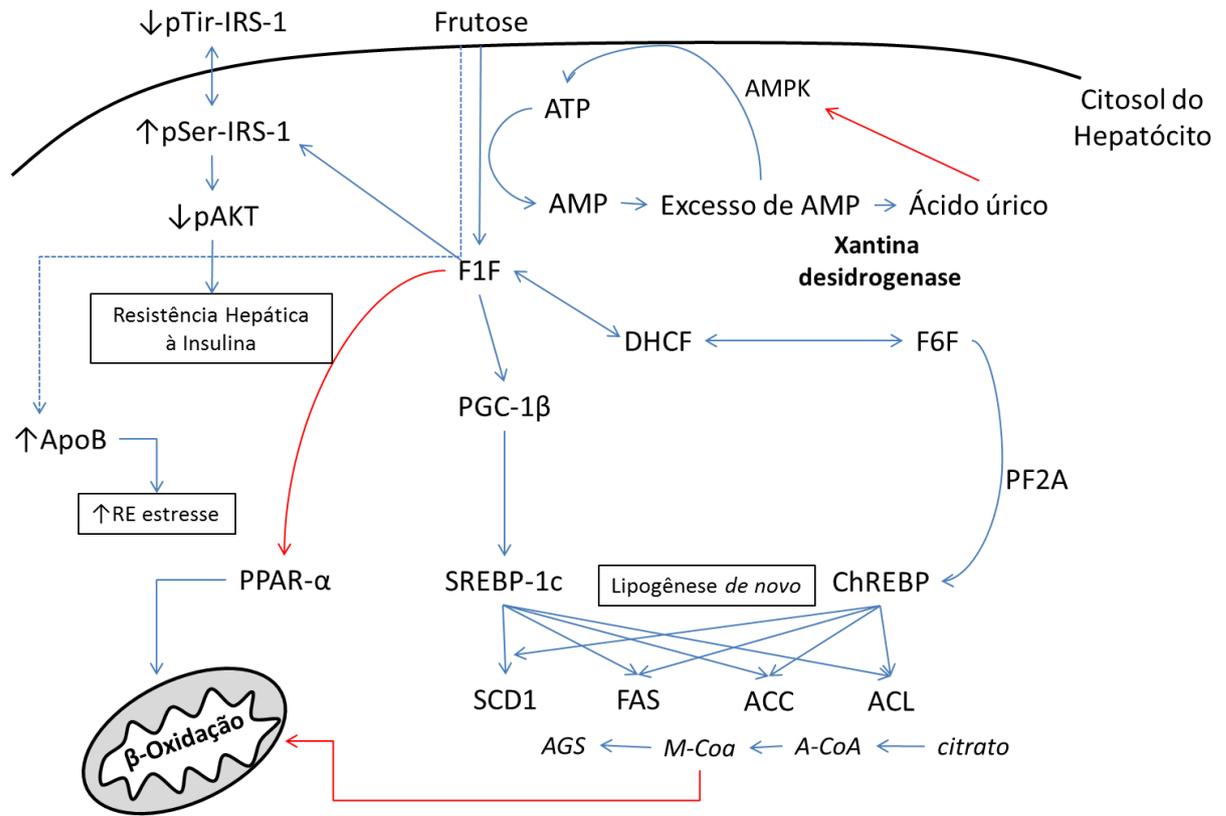
Após a frutose passar por seus receptores GLUT2 no hepatócito, ela sofre fosforilação pela frutoquinase sendo convertida em F1F, como já mencionado anteriormente. A F1F é capaz de ativar o SREBP-1c via co-ativador do ativador de proliferação peroxissomal gama (PGC, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator*)-1 β e através de sua conversão em frutose-6-fosfato pode ativar o ChREBP via proteína fosfatase 2A (PF2A). Tanto o SREBP-1c quanto o ChREBP são fatores de transcrição que ativam enzimas lipogênicas como a ATP citrato liase (ACL), acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e a esteroil

coenzima-A desaturase (SCD). Dessa forma, a frutose é capaz de ativar a lipogênese *de novo* e conseqüentemente a concentração de malonil-CoA é aumentada no interior do hepatócito, inibindo a CPT1 e posteriormente a β -oxidação (Denechaud *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). A F1F ainda ativa a C-junN-terminal quinase (JNK, *C-junN-terminal kinase*) que é capaz de fosforilar o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1, *insulin receptor substrate-1*) em serina 307, inibindo a via de sinalização da insulina e causando resistência hepática à insulina. Ainda, a F1F é capaz de diminuir os níveis de RNAm de PPAR- α , outro fator importante que contribui para a diminuição da β -oxidação (Nomura e Yamanouchi, 2012). Finalmente, a frutose é capaz de aumentar a síntese de apolipoproteína B que se acumula no retículo endoplasmático e gera um estresse do retículo, um passo importante para a ativação de vias inflamatórias e de estresse oxidativo no fígado (Figura 4) (Olofsson e Boren, 2005; Su *et al.*, 2009).

1.4.2 Eixo ECA/AT1r e células estreladas hepáticas

Os efeitos deletérios do eixo ECA/AT1r sobre as doenças hepáticas já são bem descritos na literatura. Sabe-se que tanto os genes da ECA quanto do AT1r são aumentando em áreas de fibrose hepática e que a ativação do AT1r pela Ang-II induz contração e proliferação das células estreladas hepáticas (Liu *et al.*, 2008). Corroborando para isso, já foi demonstrado que animais *knockout* para o AT1R apresentam uma menor inflamação e fibrose hepática (Kanno *et al.*, 2003).

Figura 4 - Metabolismo hepático da frutose



Legenda: A frutose é convertida em F1F pela frutoquinase com gasto de ATP. O excesso de frutose gera um excesso de AMP que passa a ser convertido em ácido úrico. Esse, por sua vez, é capaz de inibir a AMPK, facilitando ainda mais a síntese de ácido úrico. A F1F ainda é capaz de aumentar a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, o que diminui a ativação da AKT e pode levar à resistência hepática à insulina. Além desse mecanismo, a F1F ativa dois fatores de transcrição relacionados à lipogênese *de novo*, o SREBP-1c e o ChREBP, aumentando a síntese de lipídios pelos hepatócitos, e inibe o PPAR- α . O aumento da malonil-CoA gerado pelo aumento da lipogênese e a diminuição da atividade do PPAR- α inibem a β -oxidação mitocondrial. Por fim, a frutose pode levar a um aumento da síntese de apolipoproteína B que se acumula no retículo endoplasmático, gerando o estresse do retículo. Abreviações: F1F – frutose-1-fosfato; AMP – adenosina monofosfato; ATP – adenosine-5'-trifosfato; AMPK – proteína quinase ativada por AMP, *AMP-activated protein kinase*; DHCF – dihidroxiacetona fosfato; F6F – frutose-6-fosfato; PF2A – proteína fosfatase 2A; PPAR- α – receptor ativador de proliferação peroxissomal- α , *peroxisome proliferator-activated receptor- α* ; ChREBP – proteína ligante de elemento responsivo ao carboidrato, *carbohydrate-responsive element-binding protein*; SREBP-1c – proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c, *sterol regulatory element-binding protein-1c*; SCD1 – esteroil-Coa desaturase 1, *stearoyl-Coa desaturase 1*; FAS – ácido graxo sintase, *fatty acid synthase*; ACC – acetil-CoA carboxilase; ACL – ATP-citrato liase; A-CoA – acetil-CoA; M-Coa – malonil-CoA; AGS – ácido graxo saturado; pTir-IRS-1 – IRS-1 (substrato do receptor da insulina-1, *insulin receptor substrate-1*) fosforilado em resíduos de tirosina; pSer-IRS-1 – IRS-1 (substrato de receptor da insulina-1, *insulin receptor substrate-1*) fosforilado em resíduos de serina; pAKT – AKT fosforilada; ApoB – apolipoproteína B; RE – retículo endoplasmático.

Fonte: Adaptado de Nomura e Yamanouchi, 2012

A Ang-II local exerce grande influência sobre a função endotelial que envolve o tônus vascular, coagulação, crescimento celular e morte e migração de leucócitos. Essa função depende do estado redox da célula, determinado pela homeostase de óxido nítrico e EROs. Estudos mostram que o aumento de Ang-II local gera um aumento da produção de EROs e conseqüentemente uma disfunção endotelial, crescimento celular e ativação de vias inflamatórias (Moreira de Macedo *et al.*, 2014). Além disso, um trabalho recente na literatura demonstrou que a ativação do AT1r em hepatócitos é um passo importante para a ativação das células estreladas hepáticas através da fosforilação da JAK2 (Granzow *et al.*, 2014). Tais células desempenham um papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática (Giraudi *et al.*, 2015).

As células estreladas hepáticas, também conhecidas como células de Ito, se encontram quiescentes no espaço de Disse, um espaço entre o hepatócito e os capilares sinusóides do lóbulo hepático. Elas apresentam como função primária o armazenamento de vitamina A em gotículas de gordura (Granzow *et al.*, 2014), porém, quando ativadas, as células adquirem a forma de miofibroblastos, apresentando exacerbada proliferação e secreção de matriz extracelular. A vitamina A pode ser perdida e há um aumento da expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA, *α -smooth muscle actin*) (Friedman, 2008).

Diante dos malefícios ocasionados pela superativação do eixo ECA/AT1r no fígado, o estudo de drogas que possam impedir a sua superativação se faz necessário.

1.4.3 Fígado e AMPK

A AMPK está presente em todos os tecidos como um heterodímero consistindo de uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (Witczak *et al.*, 2008). Ela é uma enzima sensível às quantidades de AMP e ATP intracelulares, podendo tanto aumentar a produção de ATP quanto diminuir o seu gasto. Além dessa função, a AMPK atua em diversas vias de sinalização incluindo crescimento e proliferação celular, funcionamento e biogênese mitocondrial, inflamação, estresse do retículo endoplasmático e metabolismo de proteínas,

carboidratos e lipídios. Finalmente a AMPK pode atuar na ativação de fatores e cofatores de transcrição, como o PGC-1 α via sirtuína 1 (SIRT1) (Ruderman *et al.*, 2013) e ainda atua na regulação da atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*), uma enzima limitante no processo de gliconeogênese no fígado. A gliconeogênese é uma via metabólica responsável pela geração de glicose através de substratos como o piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos. Nessa via, a PEPCK atua sobre o oxalacetato realizando a sua descarboxilação seguida de fosforilação para formar o fosfoenolpiruvato (Viollet *et al.*, 2009).

A SIRT1 apresenta numerosos efeitos metabólicos protetores contra aqueles associados à obesidade e síndrome metabólica. Sua atividade também é controlada pela AMPK pelo aumento da relação NAD⁺/NADH intracelulares. A SIRT1 parece ser a principal reguladora *in vivo* e *in vitro* da desacetilação do PGC-1 α , já que, por exemplo, experimentos *in vitro* com hepatócitos *knockout* para SIRT1 mostraram um aumento da acetilação do mesmo. Dessa forma, a SIRT1 regula a atividade do PGC-1 α que por sua vez tem papel importante no metabolismo de glicose e de lipídios no fígado e na biogênese mitocondrial (Sack e Finkel, 2012). De maneira geral, o PGC-1 α aumenta o metabolismo oxidativo de duas formas: ele pode realizar o remodelamento celular estimulando a biogênese mitocondrial e de peroxissomas, e também pode realizar o remodelamento individual de organelas alterando suas funções e composições (Austin e St-Pierre, 2012). Diversos estudos apontam o estresse do retículo endoplasmático, inflamação e desregulação no metabolismo lipídico como responsáveis pela desregulação da atividade da AMPK que consequentemente gera prejuízos no funcionamento e formação de novas mitocôndrias e peroxissomas, organelas importantes no equilíbrio energético celular e metabolismo lipídico (Austin e St-Pierre, 2012; O'Neill *et al.*, 2013; Ruderman *et al.*, 2013). Finalmente, há estudos que demonstram que o excesso de ácido úrico pode inibir a atividade da AMPK em hepatócitos, o que contribui para efeitos deletérios no fígado (Figura 4) (Lanaspa *et al.*, 2012a; Cicerchi *et al.*, 2014)

1.5 Frutose e danos renais

A literatura já descreve a excessiva ingestão de frutose como um fator de predisposição ao desenvolvimento de doenças renais crônicas tanto em animais (Nakayama *et al.*, 2010; Oudot *et al.*, 2013) como em humanos (Shoham *et al.*, 2008). Como já descrito nas sessões anteriores, a frutose é capaz de ativar o eixo ECA/AT1r e, nos rins, quando a Ang-II se liga ao AT1r promove o desenvolvimento de falência renal causando hipertrofia de células renais, aumentando a pressão microvascular do rim, a produção de EROs, induzindo a apoptose, a inflamação mediada pela subunidade p-65 do fator de transcrição NF- κ B e fosforilação de ERK 1/2 (Karuppagounder *et al.*, 2015). O NF- κ B é um fator de transcrição intimamente relacionado à inflamação. Ele se encontra no citoplasma ligado ao inibidor de NF- κ B (I κ B, *inhibitor of NF- κ B*)- α , uma molécula que o mantém sequestrado e inativo e dessa forma inibe a sua atividade de transcrição no núcleo (Jacobs e Harrison, 1998). Além do papel inflamatório do NF- κ B, um recente estudo mostrou que esse fator de transcrição também tem um papel importante no controle da transcrição do AT1r (Luo *et al.*, 2015).

Há ainda evidências de que a frutose por si só pode iniciar ou acelerar o desenvolvimento da doença renal crônica. Ela promove o desenvolvimento direto da inflamação aumentando, por exemplo, a expressão de MCP-1 nas células (Kanellis *et al.*, 2003), induz proliferação das células dos túbulos renais, conduz à proteinúria e à glomerulosclerose; e de maneira importante é preciso ressaltar que esses resultados não foram encontrados em animais que receberam a mesma quantidade de dieta enriquecida com glicose o que leva à conclusão de que não o aumento do consumo de carboidratos simples, mas sim da própria frutose é o principal responsável pelos danos renais (Cirillo *et al.*, 2009; Jameel *et al.*, 2014).

Os rins, assim como o fígado, também são responsáveis pela metabolização da frutose, já que também apresentam a frutoquinase, enzima responsável pela fosforilação da frutose em F1F. Da mesma forma que acontece no fígado, o excesso de frutose nos rins causa um desequilíbrio entre AMP/ATP o que também favorece a formação de ácido úrico por esses órgãos (Bjornstad *et al.*, 2015). A hiperuricemia é comumente relacionada à síndrome metabólica e diversos estudos epidemiológicos também confirmaram a relação entre aumento de ácido úrico e essa síndrome

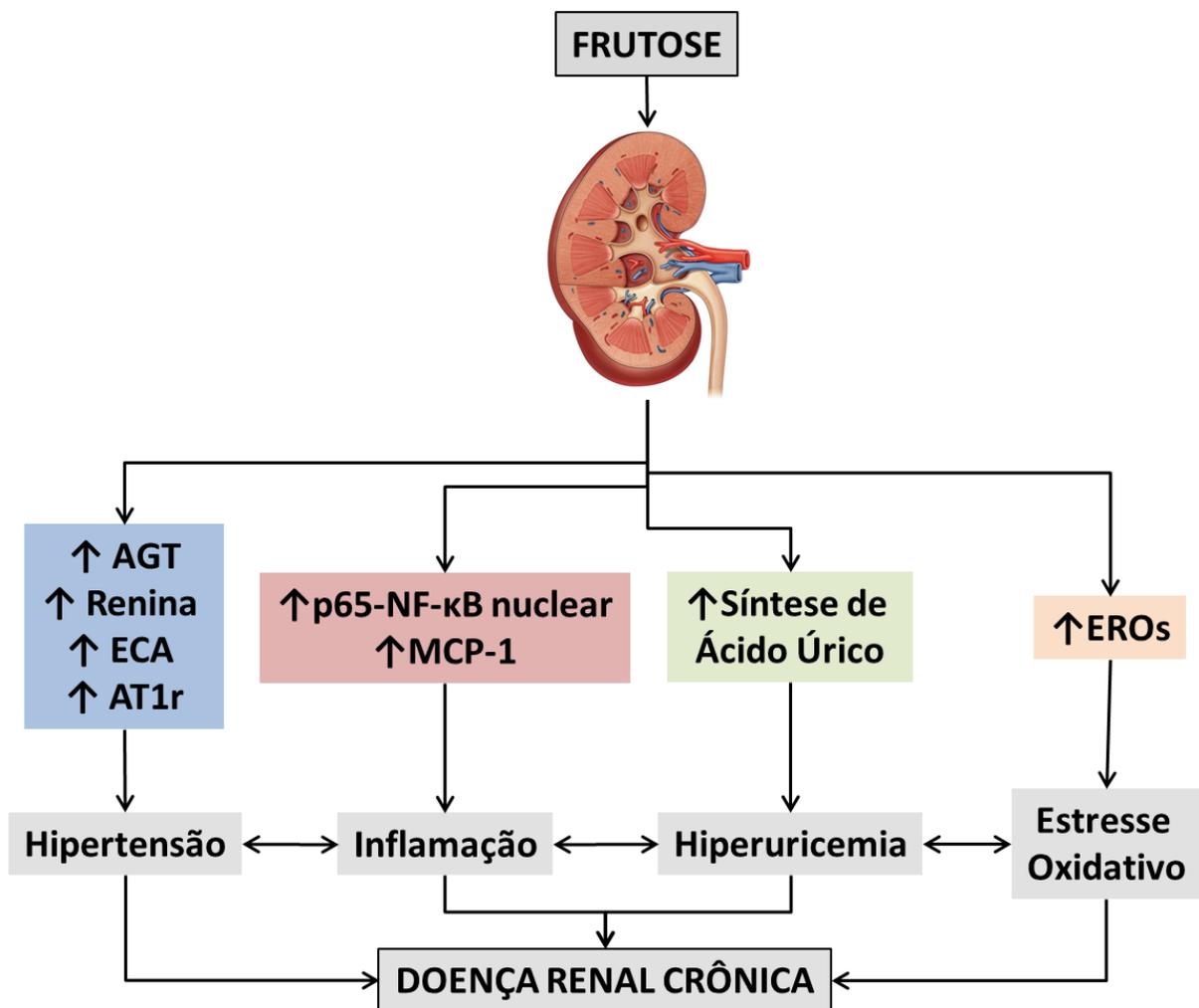
(Ishizaka *et al.*, 2005; Choi e Ford, 2007; Vieira *et al.*, 2014). Enquanto antigos estudos diziam que a hiperuricemia poderia ser uma simples consequência do aumento da absorção de ácido úrico pelo túbulo contorcido proximal, sendo secundária à hiperinsulinemia (Quinones Galvan *et al.*, 1995; Muscelli *et al.*, 1996) estudos mais recentes apontam que a hiperuricemia pode prever o desenvolvimento da síndrome metabólica, obesidade e diabetes (Dehghan *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2008).

Já é bem estabelecido que o ácido úrico quando depositado em tecidos pode formar cristais e iniciar um estado de inflamação como visto no quadro de artrite do tipo gota (Sanchez-Lozada *et al.*, 2006). Atualmente, novos mecanismos de ação têm sido descritos para o excesso de ácido úrico no organismo. Primeiramente, o ácido úrico pode agir de forma diferente se encontrado no meio extra ou intracelular. Enquanto no meio extracelular ele age como um potente antioxidante, no meio intracelular seu papel é oposto, sendo pro-oxidativo (Corry *et al.*, 2008). Além desse mecanismo, o ácido úrico pode causar disfunção endotelial através da diminuição da liberação de óxido nítrico e ativação de vias inflamatórias nessas células. Nos rins, o ácido úrico pode agir de duas formas: através da promoção e desenvolvimento da disfunção endotelial e da inflamação, e pela alteração da hemodinâmica dos glomérulos (Kanbay *et al.*, 2010).

As EROs são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. A produção desses agentes oxidantes é equilibrada pela remoção dos mesmos através de mecanismos de defesa antioxidantes presentes nas células. Entretanto, um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, ocasiona o processo conhecido como estresse oxidativo. As EROs também podem levar a disfunção de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril, além de poderem oxidar o DNA (Touyz e Schiffrin, 2004). O organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes (Kojo, 2004; Valko *et al.*, 2007). Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos conforme sua estrutura. A maior parte dos antioxidantes não enzimáticos é exógena, como vitaminas (vitamina A, C e E) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outros). Já o sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido-desmutase (SOD), catalase e

glutationa peroxidase (GPx), sendo o primeiro sistema a agir, evitando o acúmulo de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 . Como já descrito anteriormente, a frutose corrobora para o aumento da produção de EROs seja direta ou indiretamente através do aumento do ácido úrico. Dessa forma, o aumento da produção de EROs pode causar danos celulares ou o DNA das células, prejudicando sua estrutura e função (Kushiyama *et al.*, 2014). A figura 5 esquematiza os danos causados pela frutose no rim que culminam com o desenvolvimento de doenças renais crônicas.

Figura 5 - Esquema demonstrando os malefícios da frutose sobre o rim



Legenda: Malefícios da frutose sobre os rins que podem culminar no desenvolvimento da doença renal crônica. Abreviações: AGT – angiotensinogênio; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*; p65-NF-κB – unidade p65 do fator nuclear-κB (*nuclear factor-κB*); MCP-1 - proteína quimioatrativa de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; EROs – espécies reativas de oxigênio.

Fonte: O autor, 2015.

Em vista dos graves danos causados pela frutose no TAB, através da promoção da inflamação, no fígado, pelo desenvolvimento da NAFLD e ativação de células estreladas, e no rim, pela inflamação e desenvolvimento do estresse oxidativo, novas terapias se fazem necessárias para o tratamento de todas essas comorbidades comuns no quadro de síndrome metabólica.

1.6 PPARs

Os PPARs formam uma subfamília de uma superfamília de receptores nucleares. Foram descritas três isoformas de PPAR que atuam de formas diferentes: o PPAR- α , o PPAR- β/δ e o PPAR- γ . Os PPARs são moléculas compactas, possuindo, o PPAR- α , 468 resíduos de aminoácidos comparados com 441 do PPAR- β/δ e 479 do PPAR- γ , sendo encontrados em diversas espécies animais, desde o *Xenopus laevis* até o ser humano (Harrington *et al.*, 2007). O termo “ativadores de proliferação peroxissomal” foi utilizado inicialmente para designar este grupo de fatores que tinham em comum a promoção da proliferação de peroxissomos, que foi primeiramente reportada em ratos tratados com clofibrato em 1960 (De Duve *et al.*, 1960). As maiores atividades fisiológicas dos PPARs estão relacionadas à transcrição dos seus genes-alvo e assim regulam o metabolismo lipídico, a homeostase da glicose, diferenciação celular, obesidade e câncer. Além disso, os PPARs podem participar diretamente de respostas imunológicas e dos mecanismos de inflamação (Moraes *et al.*, 2006).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos ao PPAR (PPREs, *PPAR responsive elements*). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR, em que X pode ser α , β/δ ou γ) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes-alvo. Esse mecanismo de ação dos PPARs é conhecido como o mecanismo de trans-ativação. Em contextos específicos, a ação dos PPARs também pode depender de vários fatores como a sua expressão relativa, a região promotora do gene estar ou não acessível e a

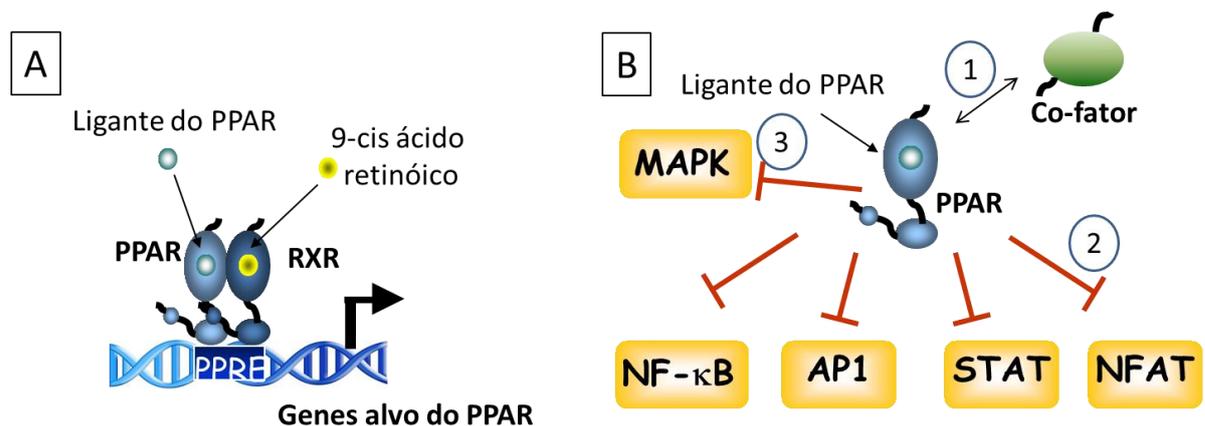
presença de co-fatores de ativação, como o PGC-1 α , que é o co-ativador de PPARs mais descrito na literatura (Salvado *et al.*, 2012). Além dessa forma de ação, os PPARs podem regular a expressão gênica independentemente de ligação ao PPREs, através do mecanismo de trans-repressão. Existe um *cross-talk* entre os PPARs e outros fatores de transcrição que influencia e regula a expressão gênica deles, e a maiorias dos efeitos anti-inflamatórios dos PPARs podem provavelmente ser explicados por esse mecanismo (Delerive *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). Entre os fatores de transcrição inibidos pelo mecanismo de trans-repressão estão o NF- κ B, proteína ativadora-1 (AP-1, *activator protein-1*), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs, *signal transducers and activators of transcription*) e o fator nuclear ativado de células T (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*) (Salvado *et al.*, 2012). Existem pelo menos quatro mecanismos de trans-repressão envolvidos com a subfamília dos PPARs que serão descritos a seguir.

O primeiro mecanismo resulta da competição entre PPARs e outros fatores de transcrição pelos co-ativadores em comuns que se apresentam em pequenas quantidades. Sob condições normais em que a quantidade de co-ativadores é limitante para o processo de ativação, a ativação de PPARs se sobressai e inibe a ativação dos outros fatores de transcrição. No segundo mecanismo, acredita-se que o heterodímero formado com o RXR pode realizar uma ligação física com outros fatores de transcrição, como os citados anteriormente. Essa ligação física resulta em um bloqueio dos fatores de transcrição que não conseguem se ligar às suas regiões específicas do DNA, inibindo assim sua atividade. Finalmente, acredita-se que o heterodímero PPAR-RXR poderia inibir a fosforilação e a ativação de membros da família de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), o que previne a ativação de certos fatores de transcrição (Salvado *et al.*, 2012). Apesar de grande parte dos mecanismos inflamatórios serem descritos pelo mecanismo de trans-repressão, mecanismos de trans-ativação são responsáveis também pela transcrição de genes-alvo anti-inflamatórios como o I κ B- α (Delerive *et al.*, 2000). A figura 6 representa os PPARs e seus mecanismos de ação.

O PPAR- α foi o primeiro receptor descoberto, sendo visto inicialmente em sapos, depois em ratos, coelhos e humanos. Em humanos este receptor foi mapeado no cromossomo 22q12-13.1 e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e gordura marrom (Sher *et al.*, 1993; Braissant *et al.*, 1996; Auboeuf *et al.*, 1997). Este receptor possui

como ligantes naturais os ácidos graxos poliinsaturados e os leucotrienos que são importantes mediadores inflamatórios; como ligantes farmacológicos, a família das drogas hipolipidêmicas (“fibratos”) é considerada um importante agonista PPAR- α (Vamecq e Latruffe, 1999). A ativação de PPAR- α está relacionada a um aumento do HDL e diminuição do LDL e TG plasmáticos. Além disso, o PPAR- α atua diretamente sobre a β -oxidação hepática, estimulando a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que participam desse processo. Já foi visto que a expressão de CPT-1 é extremamente aumentada com a ativação desse receptor (Brady *et al.*, 1989; Tenenbaum *et al.*, 2005).

Figura 6 - Figura ilustrativa dos PPARs e dos seus mecanismos de ação



Legenda: A - Mecanismo de trans-ativação: o PPAR e seu ligante se heterodimerizam com o RXR e seu 9-cis ácido retinóico, formando um complexo que se transloca para o núcleo e se liga ao seu respectivo PPRES realizando a transcrição de genes-alvo do PPAR. B: Mecanismo de trans-repressão. Em 1, o PPAR disputa co-fatores comuns a outros fatores de transcrição; em 2, o PPAR realiza ligação física a outros fatores de transcrição, inibindo a transcrição dos seus respectivos genes-alvo; em 3, o PPAR inibe as vias das MAPK. Abreviações: PPAR – receptor ativador de proliferação peroxissomal (*peroxisome proliferator-activated receptor*); PPRES – elemento responsivo ao PPAR (*PPAR responsive element*); RXR – receptor X retinóide; NF- κ B – fator nuclear- κ B (*nuclear factor- κ B*); AP-1 - proteína ativadora-1 (*activator protein-1*); STATs – transdutores de sinal e ativadores de transcrição (*signal transducers and activators of transcription*); NFAT – fator nuclear ativado de células T (*nuclear factor of activated T cells*); MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*).

Fonte: O autor, 2015

O PPAR- γ está localizado no cromossomo 3p25. Existem três subisoformas deste receptor tanto em humanos quanto em camundongos, em que o PPAR- γ 1 tem

uma maior distribuição no corpo, estando em tecidos como coração, músculo estriado esquelético e rins; o PPAR- γ 2 está expresso primariamente em adipócitos e participando do processo de esteatose hepática; e o PPAR- γ 3, expresso no intestino grosso, macrófagos e TAB. Apesar de apresentar três diferentes subisoformas, todas são ativadas pelos mesmos ligantes como as prostaglandinas (ligantes naturais) e os fármacos da família tiazolidinadionas (TZDs) (Vamecq e Latruffe, 1999; Berger, 2002; Schadinger *et al.*, 2005; Adeghate *et al.*, 2011). O PPAR- γ tem um importante papel na regulação da diferenciação e proliferação celular, principalmente nos adipócitos (Tenenbaum *et al.*, 2005).

O PPAR- β/δ foi identificado em seres humanos em 1992 e está localizado no cromossomo 6p21.2-21.1 encontrando-se de maneira ubíqua por todo o organismo (Berger, 2002; Roberts *et al.*, 2009; Adeghate *et al.*, 2011). Em comparação ao PPAR- α e ao PPAR- γ , as pesquisas com PPAR- β/δ ainda são escassas, porém têm crescido a cada ano, devido ao recente desenvolvimento de agonistas com alta afinidade por este receptor (GW0742, GW501516 e L-165041) de modo a facilitar o entendimento da sua importância dentro de modelos experimentais e humanos da síndrome metabólica (Roberts *et al.*, 2009). De maneira diferente do PPAR- α e do PPAR- γ , os agonistas do PPAR- β/δ ainda não estão em uso na prática clínica, o que justifica intensos estudos para a descoberta de mecanismos de ação desse receptor e de seus agonistas.

A ativação de PPAR- β/δ através de agonistas específicos mostrou um aumento de HDL em animais obesos e diabéticos. Outros estudos sugerem que a superexpressão de PPAR- β/δ no TAB protege o animal contra a obesidade induzida por dieta reduzindo o ganho de peso sem grandes efeitos na ingestão alimentar. Estudos mais recentes sugerem que a ativação do PPAR- β/δ modifique a preferência do corpo, alterando a prioridade da glicose pelos lipídios na obtenção de energia (Harrington *et al.*, 2007; Adeghate *et al.*, 2011). O PPAR- β/δ também participa da regulação das células de Kupffer, os macrófagos do tecido hepático. Neste contexto, o receptor agiria de forma anti-inflamatória, por apresentar propriedades que diminuem a expressão gênica de proteínas envolvidas nestas vias (Liu *et al.*, 2011b). O PPAR- β/δ ainda tem sido alvo de pesquisas que envolvem o SRA (Zarzuelo *et al.*, 2011; Sodhi *et al.*, 2014) e tais estudos demonstraram os efeitos benéficos do PPAR- β/δ na modulação desse sistema.

O GW501516, como já descrito anteriormente, é um agonista PPAR- β/δ e também foi descrito como um ativador da AMPK (Bojic *et al.*, 2014). Os trabalhos da literatura apresentam este sintético com efeitos de neuroproteção, anti-inflamatórios e de participação no metabolismo hepático (Kemmerer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015), porém outros trabalhos apontam a utilização do GW501516 como um fator para o desenvolvimento do câncer (Ma *et al.*, 2013; Ham *et al.*, 2014). Além disso, um estudo com humanos demonstrou os efeitos benéficos da utilização de GW501516 na dose de 10mg/dia em homens obesos sobre parâmetros hepáticos, plasmáticos e musculares (Riserus *et al.*, 2008). Desta forma, novos trabalhos para o esclarecimento dos mecanismos de ação do GW501516 são necessários.

Em vista de todo o conteúdo apresentado, a ativação dos PPARs torna-se um importante alvo terapêutico para o tratamento da síndrome metabólica, e de forma especial, estudos com o a ativação do PPAR- β/δ são necessárias para o melhor entendimento de como esse fator de transcrição poderia atuar nas desordens metabólicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do GW501516, um agonista PPAR- β/δ , sobre o SRA local do TAB, fígado, rins, variáveis morfológicas, plasmáticas e urinárias de camundongos alimentados com uma dieta rica em frutose.

2.2 Específicos

- a) Induzir o aumento da pressão arterial sistólica pelo aumento da expressão de marcadores do SRA e esteatose hepática não-alcoólica em camundongos através da administração de dieta rica em frutose;
- b) Realizar análise plasmática e urinária dos animais e verificar os efeitos do GW501516 nos parâmetros avaliados.
- c) No TAB, verificar a ativação do eixo ECA/AT1r e consequente inflamação, avaliando os efeitos da administração do GW501516 sobre elas;
- d) No fígado, verificar a ativação do eixo ECA/AT1r, estudar a estrutura hepática e vias de lipogênese e β -oxidação, a ativação de células estreladas hepáticas, assim como os efeitos do GW501516 sobre esses parâmetros;
- e) Nos rins, verificar a ativação do eixo ECA/AT1r com consequente inflamação e estresse oxidativo gerados, além de verificar os efeitos do GW501516 sobre esses parâmetros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, dieta e tratamento com GW501516

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo número CEUA 071/2012, Anexo 1).

Quarenta camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6 foram alocados no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC), em caixas de polipropileno, mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à comida e à água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 min/h). A escolha da linhagem de animais C57BL/6 foi devido à sua predisposição a alteração da composição da massa corporal frente a dietas ricas em açúcar (Glendinning *et al.*, 2010).

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos nutricionais ($n=20$), sendo o grupo controle (SC, *standard chow*) ou o grupo com dieta contendo 47% de frutose (HFru, *high-fructose*) e ambos foram alimentados com essas dietas por oito semanas. As dietas foram manufaturadas pela PragSoluções (Jaú, SP, Brasil) e estavam de acordo com as recomendações da AIN 93M (Tabela 1) (Reeves *et al.*, 1993). Após essas oito semanas, os animais foram novamente separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais ($n=10$) e tratados com GW501516 (Enzo Life Science, Farmingdale, Nova Iorque, EUA) que foi dissolvido em um meio de viscosidade de carboximetilcelulose (CMC) a 5% (peso/volume). Os grupos experimentais do estudo foram como os que se seguem:

- a) Grupo SC: ração controle durante todo o experimento com administração do veículo CMC pelas últimas três semanas;
- b) Grupo SC+GW501516: ração controle durante todo o experimento com administração de GW501516 (3mg/Kg/dia) pelas últimas três semanas;

- c) Grupo HFru: ração rica em frutose durante todo o experimento com administração do veículo CMC pelas últimas três semanas;
- d) Grupo HFru+GW501516: ração rica em frutose durante todo o experimento com administração de GW501516 (3mg/Kg/dia) pelas últimas três semanas.

Tanto a CMC como o GW501516 foram administrados por gavagem orogástrica uma vez ao dia às 10h00min. A ingestão alimentar foi controlada diariamente, a ingestão hídrica foi controlada duas vezes por semana e a massa corporal (MC), semanalmente.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/Kg)	SC	HFru
Caseína	140,0	140,0
Amido de milho	620,692	146,392
Sacarose	100,0	100,0
Frutose	-	474,3
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de minerais**	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total	1.000,0	1.000,0
Energia (Kcal)	3804	3804
Hidratos de carbono (%)	76	76
Amido de milho (%)	66	16
Sacarose (%)	10	10
Frutose (%)	0	47
Proteínas (%)	14	14
Lipídios (%)	10	10

Legenda: Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo recomendação da AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993).
Abreviações: SC – dieta controle, *standard-chow*; HFru – dieta rica em frutose, *high-fructose*.

Fonte: Reeves, Nielsen et al. 1993

3.2 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Os animais foram submetidos por duas semanas às condições para a aferição da PAS como forma de treinamento a fim de minimizar vieses de estresse durante os experimentos. Duas vezes ao mês e durante o tratamento, semanalmente, a PAS foi aferida pelo método não invasivo de pletismografia caudal (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos conscientes durante todo o procedimento.

3.3 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado dois dias antes do sacrifício. Para a realização do teste, os animais (n=5) ficaram em jejum durante 6 horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril - 0,9% NaCl) na dosagem de 1g/kg. Posteriormente, o sangue da veia caudal foi coletado nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, sendo a determinação dos níveis de glicose sanguínea obtida com o glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). Para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (ASC), mensurada a partir da utilização do software Prisma (versão 6.05 para Windows, software GraphPad, San Diego, CA, USA).

3.4 Coleta de urina

As amostras de urina foram coletadas na semana da eutanásia. Os camundongos (n=5) foram alocados em gaiolas metabólicas (um camundongo por gaiola) e mantidos por 48h para aclimatização e então foram deixados por mais 24h para a coleta da urina. A urina foi centrifugada (3500rpm por 5min) para a remoção de qualquer resíduo sólido e armazenada a -20°C até sua análise.

3.5 Eutanásia e extração de órgãos e tecidos de estudo

Após três semanas de tratamento com o GW501516, os animais foram mantidos em jejum por seis horas (das 1h:00min às 7h:00min) e então foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (150mg/Kg) intraperitonealmente. Juntamente da anestesia os animais receberam uma dose de heparina (200mg/Kg). Em seguida o tórax foi aberto expondo o coração e amostras de sangue foram obtidas rapidamente por punção cardíaca (átrio direito). Para a obtenção do plasma, o sangue foi imediatamente centrifugado (3500 rpm por 15min) à temperatura ambiente e armazenado individualmente a -20°C até sua análise. Foi coletado sangue caudal no momento do sacrifício para a determinação da glicemia de jejum obtida com o glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil).

Os depósitos de gordura epididimal, o fígado e os rins foram cuidadosamente dissecados, pesados e preparados para análise. A massa do fígado e dos rins foi corrigida pela tibia esquerda, que foi medida a partir dos côndilos até o maléolo medial, segundo Yin, 1982 (Yin *et al.*, 1982). Porções desses órgãos foram mantida em uma solução de fixação fresca (formaldeído 4% peso/volume, 0,1M tampão fosfato, pH 7,2) por 48h e preparados para a microscopia de luz. Outros fragmentos do depósito de gordura epididimal, do fígado e do rim foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida transferidos para o freezer -80°C para posterior análise molecular por *immunoblotting* e RT-qPCR. Parte do fígado congelado também foi utilizada para a dosagem de TG hepáticos.

3.6 Análise Plasmática

A concentração plasmática de TG, alanina aminotransferase (ALT), ácido úrico, insulina e creatinina foram dosadas por um espectrofotômetro automático usando um kit comercial (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil) e a adiponectina foi dosada pelo kit Single Plax (EZMADP-60K).

3.7 Análise Urinária

A concentração urinária de ácido úrico, proteínas e creatinina foram dosadas por um espectrofotômetro automático usando um kit comercial (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.8 Análise Microscópica TAB Epididimário

Amostras do TAB epididimário, depois de fixadas, foram processadas em banhos crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embebidas em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O tecido foi seccionado a 5µm e corado com hematoxilina e eosina (HE). Dez campos não consecutivos e aleatórios foram analisados por animal (n=5) no microscópio de luz (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e fotografados pela câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá). O diâmetro médio de pelo menos 50 adipócitos por animal foi medido usando o software Image ProPlus v7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os valores encontrados em cada grupo foram plotados em um gráfico de dispersão que foi feito pelo software GraphPad Prism versão 6.05 para Windows.

3.9 Bioquímica e Análise Microscópica do Fígado

Vários fragmentos de fígado de cada animal foram congelados a -80°C. Para a dosagem do TG hepático, 50mg de fígado foram pesados, macerados manualmente e colocados em um processador ultra-sônico (Ultrasonic Processor Model CV18) com 1ml de isopropanol por oito minutos. Logo após, o homogenato foi centrifugado a 3200 rpm por cinco minutos e 5µl do sobrenadante foram pipetados para a análise bioquímica. TG hepáticos foram determinados por um ensaio cinético colorimétrico e corrigidos pela massa do fígado (Bioclin System II, Quibasa Ltda., Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As amostras de fígado, depois de fixadas, foram processadas em banhos crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embebidas em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O tecido foi seccionado a 5µm e corado com HE. Dez campos não consecutivos e aleatórios foram analisados por animal (n=5) no microscópio de luz (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e fotografados pela câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá). Para a determinação da quantidade de esteatose hepática utilizou-se a análise estereológica com um sistema de vídeo-microscopia. Um sistema-teste com 36 pontos, produzido com STEPanizer (www.stepanizer.com) foi usado para a aquisição de dados. A densidade de volume da esteatose hepática (Vv) foi estimada através da razão entre os pontos parciais que tocam as gotículas de gordura (PP) em relação aos pontos totais (PT): $[Vv=PP/PT (\%)]$ (Aguila *et al.*, 2003).

3.10 Imunohistoquímica de α -SMA

Para a técnica de imunohistoquímica, o fígado foi submetido ao processamento histológico de rotina e seccionados com 5 µm de espessura. Após a desparafinização, a recuperação antigênica do órgão foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) a fim de facilitar a localização de proteínas intracelulares. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti- α -SMA com a diluição de 1:100. Ambos foram amplificados com um complexo biotinaestreptavidina (K0679; Universal DakoCytomation LSAB + Kit, Peroxidase, Glostrup, Denmark) e identificados com diaminobenzidina tetracloroeto (K3466, DAB, DakoCytomation). Os cortes foram contrastados com Hematoxilina de Mayer. Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários. As imagens digitais dos cortes corados foram adquiridas utilizando uma câmera digital Lumenera Infinito (Lumenera Co, Ottawa, ON, Canada) acoplado em um microscópio Leica DMRBE (Wetzlar, Germany).

3.11 Imunofluorescência de α -SMA

Cortes de 5 μ m do fígado foram desparafinizados e sofreram recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0). Os cortes foram bloqueados com 2% de glicina e incubados com anticorpo anti- α -SMA diluído em PBS/BSA 1% overnight. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa e o DAPI foi utilizado para a marcação dos núcleos. As lâminas foram montadas com *slow-fade* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) para a manutenção da fluorescência. Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários. O microscópio confocal a *laser* (Modelo C2, Nikon Inc., Tóquio) foi utilizado para identificação da marcação positiva de α -SMA.

3.12 Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)

A expressão do RNAm no TAB epididimário, fígado e rim foi medida por RT-qPCR. O RNA total dos órgãos foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C) e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. A essa porção foram adicionados 500 μ L de isopropanol que reagiu por 10 minutos para que o RNA precipitasse e logo após foi centrifugado (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C). O isopropanol foi retirado, o *pellet* formado foi ressuscitado com 500 μ L de etanol 75% e, logo após, centrifugado (11.200 rpm, durante 5 minutos a 4°C). O etanol foi retirado e o *pellet* ressuscitado em 20 μ L de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas ao banho seco (50°C por 5 minutos) e quantificadas no equipamento *Nanovue* (GE Life Sciences). O produto final, já quantificado, foi diluído na proporção 1:100 em água MilliQ.

Para transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA), 1,0 μ g de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA), e a primeira cadeia de DNAc foi sintetizada utilizando os iniciadores oligo (dT) para RNAm e o kit SuperScript III

(Invitrogen, CA, EUA). O RT-qPCR foi realizado utilizando termociclador BioRad CFX96 e *mix* SYBRGreen (Invitrogen, CA, EUA). As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (95°C durante 4 minutos), depois 44 ciclos, cada um a 95°C durante 10 segundos e 60°C durante 15 segundos. A especificidade da amplificação foi determinada por meio de curvas de fusão (60 a 95°C, com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s). A expressão gênica da β -actina foi realizada em todas as amostras, sendo então utilizada como controle endógeno para normalização do RNAm. Os sinais foram quantificados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ para estimar a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e do controle endógeno (Giulietti *et al.*, 2001). Os *primers* utilizados para a RT-qPCR estão na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados no RT-q-PCR e suas respectivas sequências para a avaliação da expressão gênica

Gene	Sequência <i>forward</i> 5'→3'	Sequência <i>reverse</i> 5'→3'
<i>aP2</i>	TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA	AATCCCCATTTACGCTGATG
<i>At1r</i>	CCCTGGCTGACTTATGCTTT	ACATAGGTGATTGCCGAAGG
<i>Catalase</i>	TTGACAGAGAGCGGATTCTT	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
<i>Cd68</i>	GGACTACATGGCGGTGGAATA	GATGAATTCTGCGCCATGAA
<i>Chrebp</i>	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
<i>Citrato sintase</i>	GTTGGCAAAGACGTGTCAGA	GTTGGCAAAGACGTGTCAGA
<i>Cpt1</i>	GCAGAGCACGGCAAATGA	GGCTTTGACCCGAGAAGAC
<i>Eca</i>	GTGGCTGGAAGAGCAGAATC	GCCTTGGCTTCATCAGTCTC
<i>Fat/cd36</i>	CCCTCCAGAATCCAGACAAC	TGCATTTGCCAATGTCTAGC
<i>Gpx</i>	CCCGTGCGCAGGTACAG	CAGCAGGGTTTCTATGTCAGTT
<i>Gr</i>	GGGATTGGCTGTGATGAGAT	GGTGACCAGCTCCTCTGAAG
<i>IL-1β</i>	CCAGAGCCACATGCTCCTAGA	GGTCCTTTGTTTAAAGAAAGTCTTC
<i>IL-6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Mcp-1</i>	GCTGGAGAGCTACAAGAGGATCA	CTCTCTCTTGAGCTTGGTGACAAA
<i>Pdk4</i>	CACCACATGCTCTTCGAACTCT	AAGGAAGGACGGTTTTCTTGATG
<i>Pgc-1α</i>	AACCACACCCACAGGATCAGA	TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
<i>Plin2</i>	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTTCCACTCC
<i>PPAR-α</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>PPAR-β/δ</i>	GCCACAACGCACCCTTTG	CCACACCAGGCCCTTCTCT
<i>Renina</i>	ACCTTGCTTGTGGGATTCAC	CCTGATCCGTAGTGGATGGT
<i>Sirt-1</i>	AACGTACACGCCAGCTCTA	TCGGTGCCAATCATGAGATG
<i>Sod2</i>	CAGGACCCATTGCAAGGAA	GTGCTCCCACACGTCAATCC

<i>Srebp-1c</i>	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
<i>β-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

Legenda: *aP2*, proteína ligante de ácido graxo em adipócitos, adipocyte fatty acid-binding protein; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, angiotensin-II type 1 receptor; Cd68 – cluster of differentiation 68; ChREBP – proteína ligadora a elemento responsivo ao carboidrato, carbohydrate response element-binding protein; Cpt1 – carnitina palmitoil transferase 1, carnitine palmitoyltransferase 1; ECA – enzima conversora de angiotensina; Fat/Cd36 – ácido graxo translocase, fatty acid translocase; Gpx – glutationa peroxidase; Gr – glutationa redutase; IL-1 β – interleucina-1 β ; IL-6 – interleucina 6; Mcp-1, proteína quimioatrativa de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; Pdk4 – piruvato desidrogenase quinase isoforma 4, pyruvate dehydrogenase kinase isozyme; Pgc-1 α – coativador-1 alfa do ativador de proliferação peroxissomal gama, peroxisome proliferator-activated gamma coactivator-1 alpha; Plin2 – perilipina 2, perilipin 2; Ppar- α – receptor ativador de proliferação peroxissomal- α , peroxisome proliferator-activated receptor- α ; Ppar- β/δ – receptor ativador de proliferação peroxissomal- β/δ , peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ ; Sirt1 – sirtuína 1; Sod – superóxido desmutase; Srebp-1c – proteína ligante de elemento regulador de estero-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c.

3.13 *Imunoblotting*

As proteínas totais a partir do TAB epididimário, fígado e rim foram extraídas com auxílio de tampão de lise RIPA e de inibidores de protease e fosfatase. Posteriormente, o homogenato obtido foi centrifugado (11000 rpm) durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida a concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de proteína BCA kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A cada gel que seria feito, as proteínas eram desnaturadas e em seguida separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de transferência para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Após a transferência as membranas eram coradas com Ponceau para a confirmação da transferência e, em seguida, incubadas com o anticorpo primário diluído em BSA 5% *overnight*. Após a incubação com anticorpos primários, a membrana era incubada com anticorpo secundário diluído em leite desnatado 5%. Os anticorpos primários utilizados foram:

- a) No TAB epididimário: ECA 170kDa, AT1r 43kDa, IL-6 24kDa, adiponectina 26kDa e β -actina 43kDa.

- b) No fígado: ECA 170kDa, AT1r 43kDa, JAK total 128kDa, JAK fosforilada (p-JAK) 128kDa, α -SMA 42kDa, PPAR- α 52kDa, CHREBP 94kDa, SREBP-1c 68kDa, SCD 37kDa, AKT total 60kDa, AKT fosforilada (p-AKT) 65kDa, PEPCK 62kDa, AMPK total 62kDa, AMPK fosforilada (p-AMPK) 62kDa, β -actina 43kDa e Lamina B1 68kDa.
- c) No rim: Renina 43 kDa, ECA 170kDa, AT1r 43kDa, I κ B- α 41kDa, ERK total 42/44kDa, ERK fosforilada (p-ERK) 42/44kDa, JNK total 54kDa, JNK fosforilada (p-JNK) 54kDa, SOD2 25kDa, Catalase 60kDa, GPX 23kDa, GR 30kDa e β -actina 43kDa

Os anticorpos foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Abcam ou Invitrogen™ Life Technologies.

3.14 Análise estatística

Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância, sendo expressos como média e desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram analisadas por *One Way ANOVA* seguida do pós-teste de Holm-Sidak (*GraphPad Prism v.6.05* para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, CA, EUA). Em todos os casos, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do GW501516 em variáveis morfológicas, ingestão hídrica, urina, PAS e determinações plasmáticas

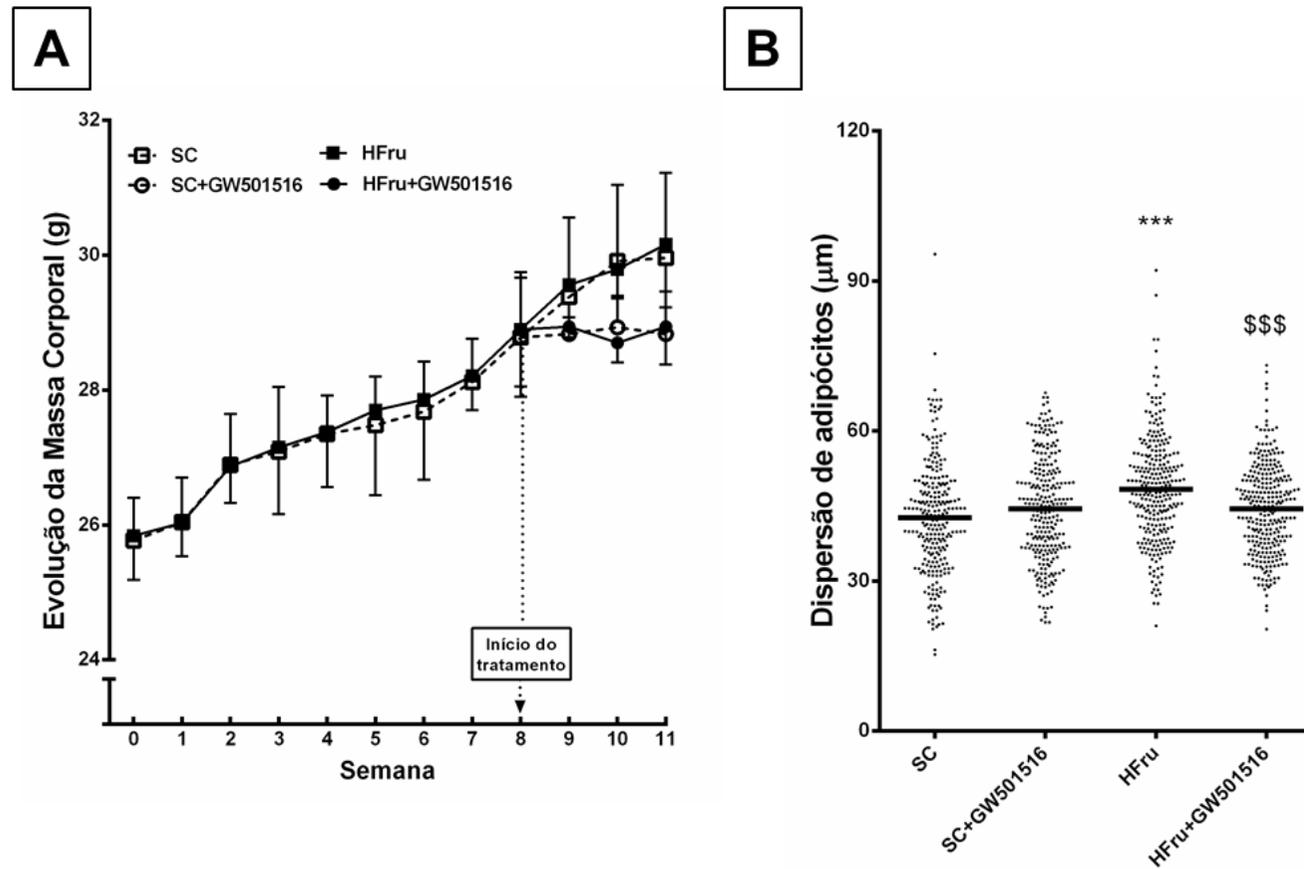
Os grupos SC e HFru começaram o tratamento com o GW501516 sem diferenças em suas MCs e ao final do tratamento também não foi verificada diferença significativa entre os quatro grupos experimentais (Figura 7A). Além disso, também não foi encontrada diferença na ingestão alimentar decorrente do tratamento. Embora não tenha sido encontrada diferença na MC dos animais, foi verificado um pequeno, porém significativo aumento do diâmetro dos adipócitos do grupo HFru que foi revertido pelo tratamento com o GW501516 (Figura 7B). Ademais, a relação massa hepática/tíbia esquerda e a relação massa renal/tíbia esquerda foram maiores no grupo HFru também sendo prevenida pelo GW501516 (Tabela 3). Como esperado, o grupo HFru apresentou uma elevação da PAS a partir da segunda semana de experimento sendo mantida por todo o período experimental. O tratamento com o GW501516 conseguiu reduzir progressivamente a PAS durante as três semanas de tratamento no grupo HFru+GW501516. Não foi encontrada diferença no grupo SC+GW501516 em relação ao grupo SC (Figura 8).

A dieta rica em frutose causou um aumento da ingestão de água e do volume urinário e a administração de GW501516 pôde recuperar estes parâmetros. De maneira semelhante, a dieta rica em frutose aumentou o ácido úrico plasmático e urinário no grupo HFru assim como a proteinúria e o tratamento com GW501516 pôde reverter essas mudanças. Não foram verificadas diferenças na creatinina plasmática nem urinária (Tabela 3).

Para verificar se o GW501516 foi capaz de prevenir o dano hepático induzido pela dieta rica em frutose, foram dosadas as concentrações plasmáticas de ALT e foi observado que o grupo HFru+GW501516 apresentou valores similares aos do grupo SC (Tabela 3). Apesar de alguns artigos na literatura descreverem a dieta HFru como indutora de resistência à insulina e hiperglicemia, não foram encontradas diferenças significativas na glicemia de jejum, insulina plasmática e no TOTG

realizado nos animais, assim como o GW501516 não apresentou efeitos sobre esses parâmetros (Tabela 3). Os valores de P podem ser encontrados nas figuras 7 e 8 e na tabela 3.

Figura 7 - Evolução da massa corporal e dispersão de adipócitos dos quatro grupos experimentais



Legenda: A dieta HFru não levou a um sobrepeso/obesidade dos animais embora diferenças tenham sido encontradas no diâmetro dos adipócitos. A: Evolução da massa corporal (n=10/group). Os dados são apresentados como média \pm DP. B: Gráfico de dispersão de adipócitos (n=5/grupo). Os dados são apresentados com a mediana. *** indica $P < 0,001$ comparado com o grupo SC; \$\$\$ indica $P < 0,001$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 - grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas.

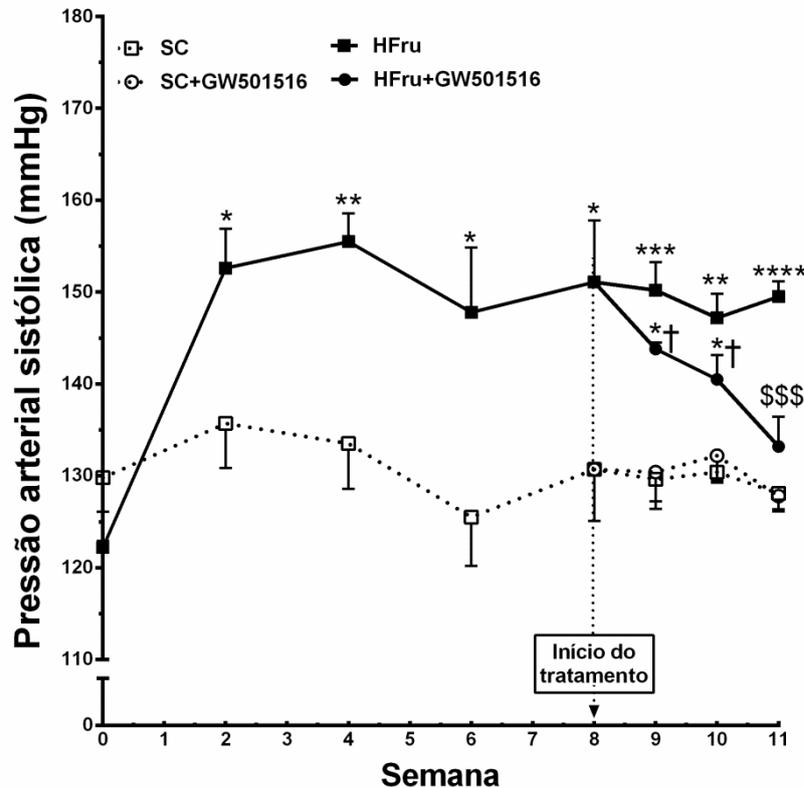
Fonte: O autor, 2015

Tabela 3 - Variáveis morfológicas, PAS, determinações plasmáticas e urinárias (n=10/grupo)

DADOS	GRUPOS			
	SC	SC+GW501516	HFru	HFru+GW501516
Ingestão alimentar, g/dia/animal	3,9±0,1	3,6± 0,1	4,2±0,2	3,7±0,2
Ingestão hídrica (última semana, ml/animal)	5,12±0,3	4,31±0,3	10,53±0,4 ***	7,4±0,4 **,††,\$\$
Diâmetro do adipócito, µm	42,6 ± 0,5	44,4 ± 0,8	48,1 ± 0,8 ***	44,9 ± 0,4 \$
Razão Fígado/Tíbia Esquerda, g/cm	0,52±0,01	0,49±0,04	0,63±0,07 **	0,55±0,02 \$
Razão Rim Esquerdo/Tíbia Esquerda, g/cm (10 ⁻³)	6,13±0,3	5,54±0,3	6,70±0,3 *	6,03±0,3 \$\$
TG hepático, mg/g fígado	16,38±0,51	14,97±0,26	19,47±1,1 *	16,04±0,29 \$
Esteatose, %	2,02±0,84	0,79±0,07	12,91±3,22 **	1,75±0,7 \$\$
ALT, mmol/L	1,55±0,05	1,83±0,05	2,0±0,05 *	1,61±0,05 \$
Adiponectina, 10 ⁴ pg/mL	8,5±0,7	7,4±0,8	5,8±0,5 **	7,7±0,9 \$
TG plasmático, mmol/L	1,62±0,08	1,66±0,08	2,11±0,12 **	1,55±0,01 \$\$
TOTG (ASC)	18706±1437	16968±1345	18348±1543	17761±1479
Insulina plasmática, pg/mL	1169,0±235,4	1318,0±235,0	1032,0±141,2	1034,0±323,8
Glicemia de jejum, mmol/L	6,44±0,15	6,94±0,22	7,27±0,15	7,44±0,44
Volume urinário (ml/24h/animal)	2,15±0,76	1,2±0,12	3,98±0,53 ***	2,86±0,53 †††,\$
Proteinúria (mmol/L/24h)	0,27±0,06	0,13±0,06 **	0,39±0,11 **	0,26±0,06 ††,\$\$
Ácido úrico urinário (µmol/L/24h)	11,6±3,8	5,5±1,1 **	18,8±1,6 ***	12,7±2,7 †††,\$\$
Ácido úrico plasmático (mmol/L)	0,20±0,008	0,20±0,019	0,22±0,005 ***	0,19±0,025 \$
Creatinina urinária (µmol/L/24h)	30±9,4	18,8±6,6	25±11,1	26,6±13,3
Creatinina plasmática (µmol/L)	40,0±8,2	42,0±6,2	44,0±7,8	42,0±5,7

Legenda: Os dados são apresentados como média ± DP. *, ** e *** indicam $P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,001$ comparado com o grupo SC; \$ e \$\$ indicam $P<0,05$ e $P<0,01$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; TG – triglicerídeo; ALT – alanina aminotransferase; TOTG – teste oral de tolerância à glicose

Figura 8 - Pressão arterial sistólica dos quatro grupos experimentais



Legenda: A dieta HFru levou a um aumento da pressão a partir da segunda semana de administração da dieta. O tratamento com GW501516 foi capaz de amenizar os efeitos deletérios causados pela dieta no grupo HFru+GW501516 (n=10/grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP. *, **, *** e **** indicam, respectivamente, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$ comparado com o grupo SC; \$\$\$ indica $P < 0,001$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas.

Fonte: O autor, 2015

4.2 Dados do TAB Epididimário

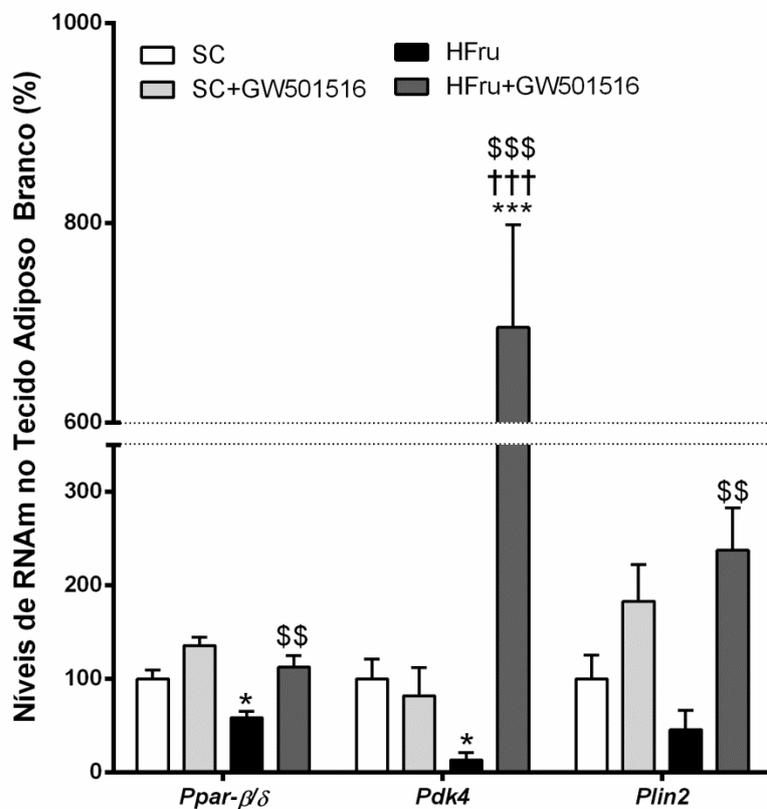
4.2.1 Efeitos do GW501516 sobre o $Ppar-\beta/\delta$ e seus genes-alvo no TAB epididimário

Com o intuito de verificar se o tempo de administração do GW501516 assim como a sua dose foram capazes de ativar o $Ppar-\beta/\delta$ e seus genes-alvo no TAB

epididimário, verificamos a expressão gênica deste fator de transcrição e de dois de seus genes-alvo.

Os níveis de RNAm do *Ppar-β/δ* apresentaram-se reduzidos no TAB epididimário do grupo HFru e o tratamento com GW501516 conseguiu restaurar os valores àqueles apresentados pelo grupo SC. Para confirmar se as mudanças observadas na expressão de *Ppar-β/δ* afetaram a atividade desse fator de transcrição, foram analisados os níveis de RNAm de dois conhecidos genes-alvo desse fator de transcrição, *Pdk4* e *Plin2*. Assim como o *Ppar-β/δ* apresentou-se reduzido, os níveis de *Pdk4* também se apresentaram diminuídos. Os resultados para a análise do RNAm de *Plin2* também corroboraram com os resultados de *Ppar-β/δ* e *Pdk4*, em que o grupo HFru apresentou uma redução da expressão de RNAm sendo revertida pelo tratamento com GW501516 (Figura 9). Os valores de *P* podem ser encontrados na figura 9.

Figura 9 - Níveis de RNAm do *Ppar-β/δ*, *Pdk4* e *Plin2* no tecido adiposo branco epididimário dos quatro grupos experimentais



Legenda: GW501516 foi capaz de ativar o *Ppar-β/δ* e seus dois genes alvo (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média ± DP. * e *** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$\$ indica $P < 0,01$ comparado com o grupo HFru. Abreviações:

SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; *Ppar-β/δ* – receptor ativador de proliferação peroxissomal-β/δ, *peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ*; *Pdk4* – piruvato desidrogenase quinase isoforma 4, *pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4*; *Plin2* – perilipina 2.

Fonte: O autor, 2015

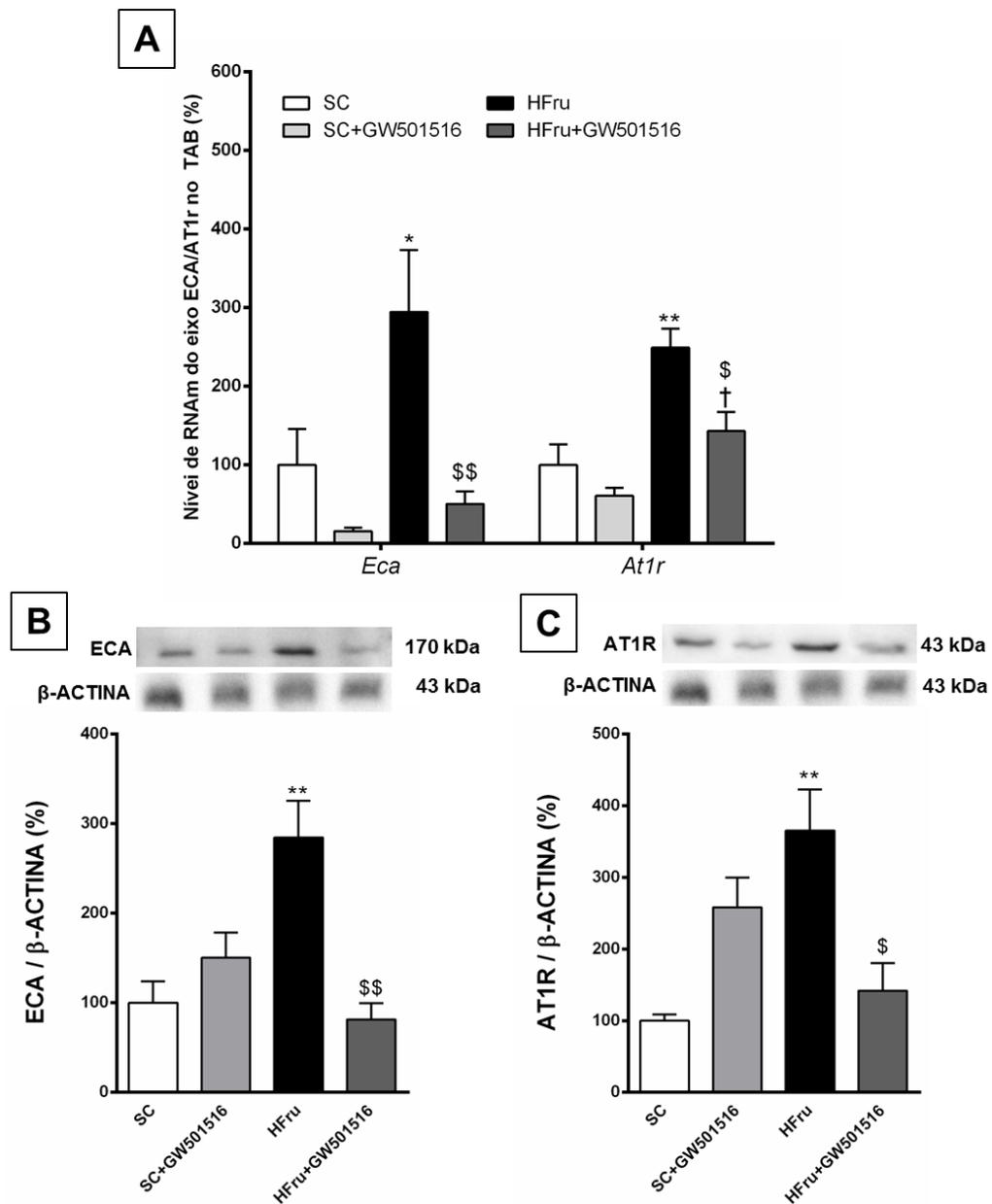
4.2.2 GW501516 reduz a ativação do eixo ECA/AT1r induzido pela dieta rica em frutose e melhora o quadro inflamatório do TAB epididimário

A expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r foram significativamente aumentadas no TAB epididimário do grupo HFru e o tratamento com GW501516 conseguiu reverter essas mudanças (Figura 10). Como a ativação do eixo ECA/AT1r está intimamente ligada com o estado inflamatório, os níveis de RNAm de *IL-6*, *Mcp-1* e *aP2* assim como os níveis proteicos de IL-6 foram verificados. Como esperado, o grupo HFru apresentou uma elevação dos níveis de RNAm de *IL-6*, *Mcp-1* e *aP2* assim como dos níveis proteicos de IL-6 e o tratamento com GW501516 reduziu todas essas alterações (Figura 11A e B).

Com o intuito de verificar se a frutose induziu mudanças nos níveis de adipocinas, os níveis proteicos de adiponectina, uma adipocina chave nos efeitos anti-inflamatórios, foram checados. Como esperado, o grupo HFru mostrou uma diminuição dos níveis de adiponectina e o tratamento com GW501516 recuperou as alterações deletérias causadas pelas dieta rica em frutose (Figura 11C). Consistente com esses dados, a adiponectina plasmática mostrou-se reduzida no grupo HFru e o tratamento com GW501516 melhorou este quadro no grupo HFru+GW501516 (Tabela 3).

Todos os valores de *P* podem ser encontrados nas figuras 10, 11 e na tabela 3.

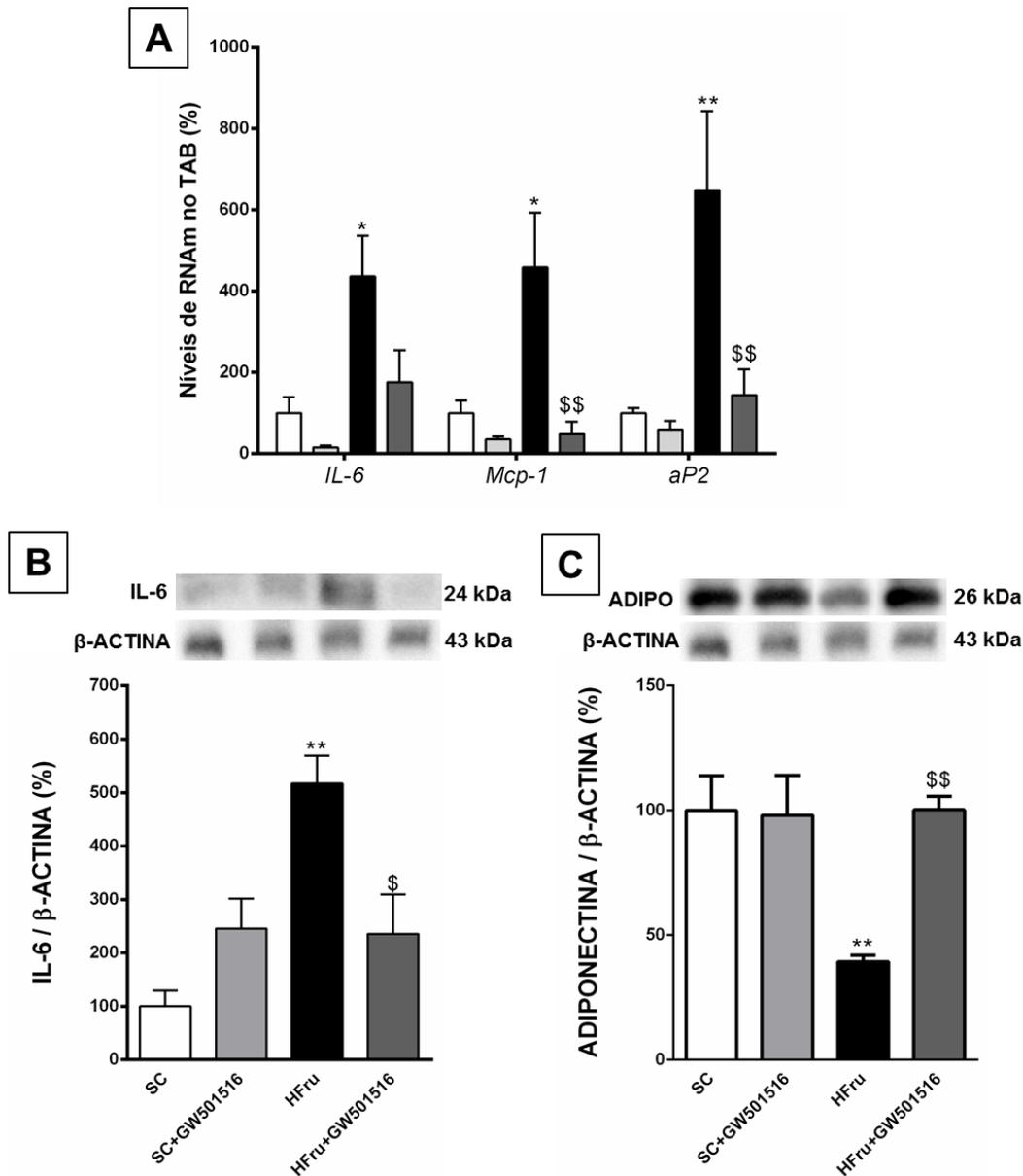
Figura 10 - Expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r no TAB epididimário dos quatro grupos experimentais



Legenda: O tratamento com GW501516 aliviou a superexpressão do eixo ECA/AT1r causada pela dieta rica em frutose (n=5/grupo). A: Expressão gênica do eixo ECA/AT1r. B: Expressão proteica de ECA. C: Expressão proteica de AT1R. Os dados são apresentados como média \pm DP. * e ** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$ e \$\$ indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 11 - Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias no TAB epididimário dos quatro grupos experimentais



Legenda: O tratamento com GW501516 melhorou o quadro inflamatório causado pela dieta rica em frutose (n=5/grupo). A: Expressão gênica de citocinas inflamatórias. B: Expressão proteica de IL-6. C: Expressão proteica de adiponectina. Os dados são apresentados como média \pm DP. * e ** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$ e \$\$ indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; IL-6, interleucina-6, *interleukin-6*; Mcp-1, proteína quimioatrativa de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; aP2, proteína ligante de ácido graxo em adipócitos, *adipocyte fatty acid-binding protein*.

Fonte: O autor, 2015

4.3 Dados do fígado

4.3.1 Efeitos do GW501516 sobre o *Ppar-β/δ* e seus genes-alvo no fígado

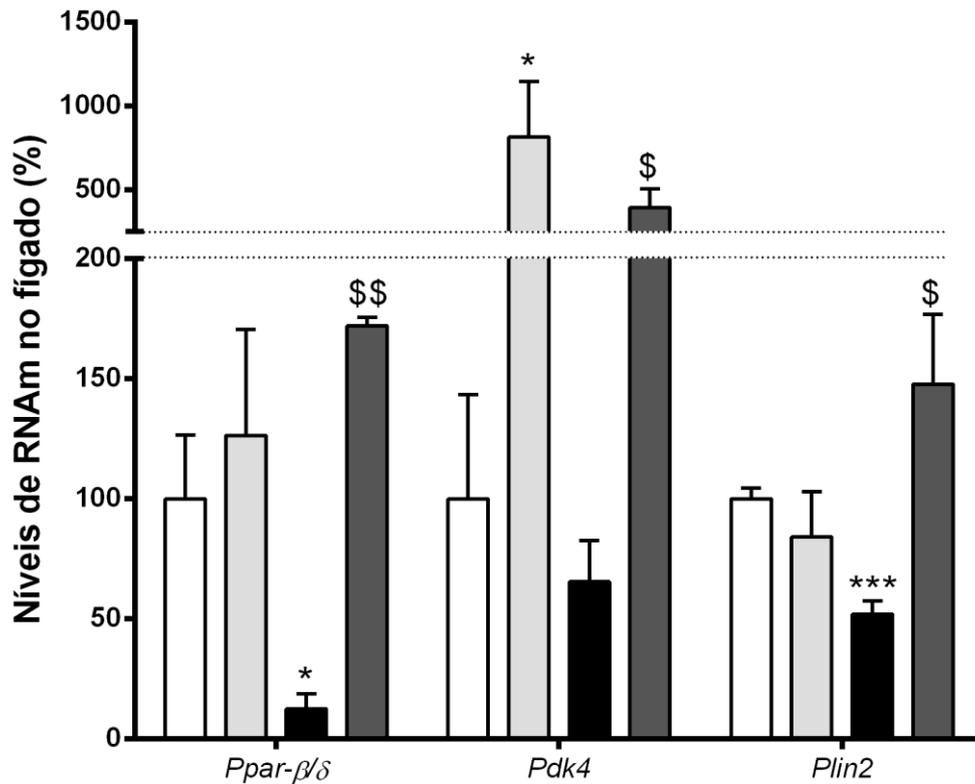
Com o intuito de verificar se o tempo de administração do GW501516 assim como a sua dose foram capazes de ativar o *Ppar-β/δ* e seus genes-alvo no fígado, verificamos a expressão gênica deste fator de transcrição e de dois de seus genes-alvo.

Os níveis de RNAm do *Ppar-β/δ* apresentaram-se reduzidos no órgão no grupo HFru e o tratamento com GW501516 conseguiu restaurar os valores àqueles apresentados pelo grupo SC. Para confirmar se as mudanças observadas na expressão de *Ppar-β/δ* afetaram a atividade deste fator de transcrição, foram analisados os níveis de RNAm de *Pdk4* e *Plin2*. Assim como o *Ppar-β/δ* apresentou-se reduzido, os níveis de *Pdk4* também foi reduzido apesar de não apresentarem diferença estatística significativa. Os resultados para a análise do RNAm de *Plin2* também corroboraram com os resultados de *Ppar-β/δ* e *Pdk4*, em que o grupo HFru apresentou uma redução da expressão de RNAm sendo revertida pelo tratamento com GW501516. Os valores de *P* podem ser encontrados na figura 12.

4.3.2 GW501516 previne a fosforilação de JAK-2 induzida pela dieta rica em frutose e reduz a ativação de células estreladas no fígado independentemente da expressão de AT1r

No fígado, a expressão gênica do eixo ECA/AT1r não apresentou diferenças estatísticas entre os quatro grupos experimentais (Figura 13A). Quando foi verificada a expressão proteica de ECA, o grupo HFru apresentou um aumento da expressão desta proteína apesar de as diferenças entre os grupos não terem alcançado uma diferença estatística (Figura 13B). Da mesma forma, foi verificada a expressão proteica de AT1r e ambos os grupos que receberam a dieta rica em frutose apresentaram uma elevação nos níveis desta proteína (Figura 13C).

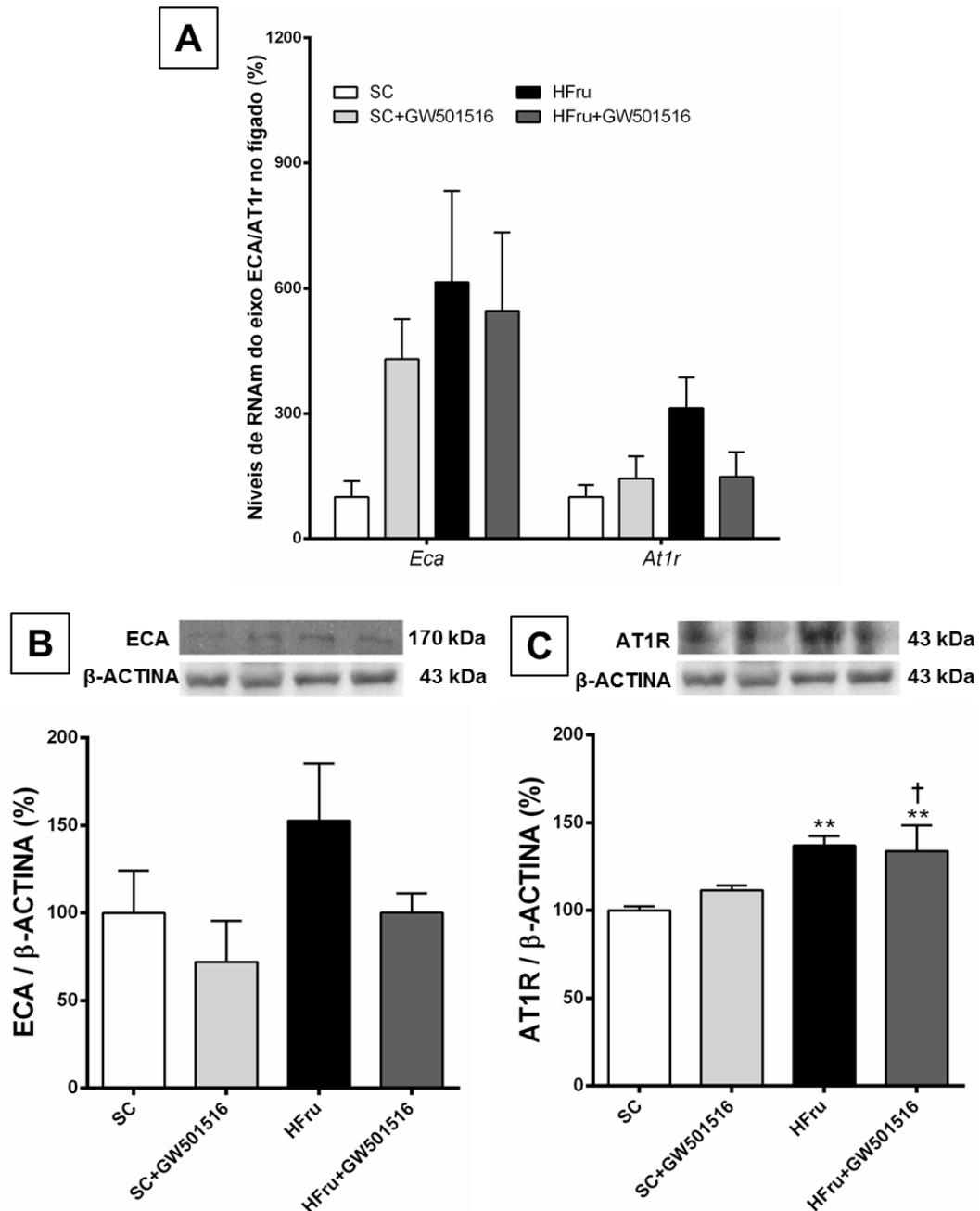
Figura 12 - Níveis de RNAm do *Ppar-β/δ*, *Pdk4* e *Plin2* no fígado dos quatro grupos experimentais



Legenda: GW501516 foi capaz de ativar o *Ppar-β/δ* e seus dois genes alvo (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média ± DP. * e *** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$ e \$\$ indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; *Ppar-β/δ* – receptor ativador de proliferação peroxissomal-β/δ, *peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ*; *Pdk4* – piruvato desidrogenase quinase isoforma 4, *pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4*; *Plin2* – perilipina 2, *perilipin 2*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 13 - Expressão gênica e proteica do eixo ECA/AT1r no fígado dos quatro grupos experimentais

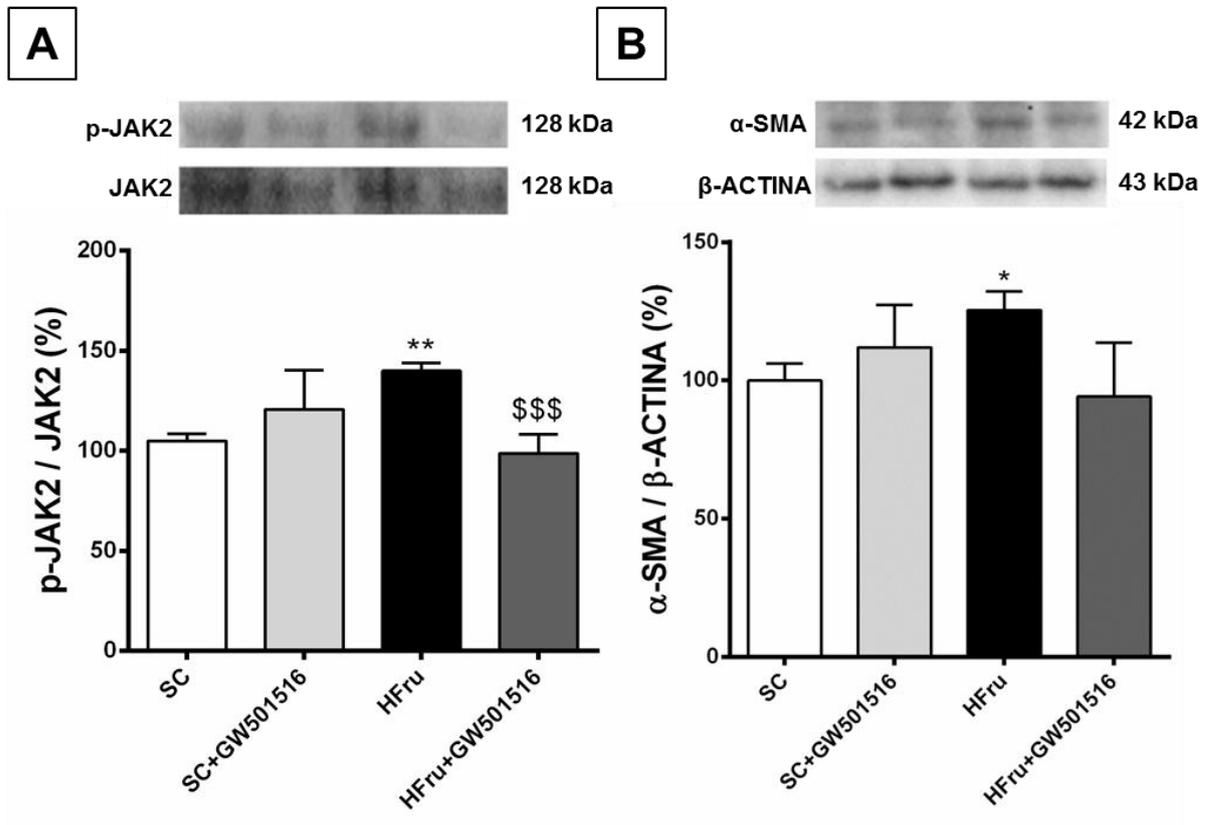


Legenda: O tratamento com GW501516 não apresentou resultados significativos (n=5/grupo). A: Expressão gênica do eixo ECA/AT1r. B: Expressão proteica de ECA. C: Expressão proteica de AT1R. Os dados são apresentados como média ± DP. ** indica $P < 0,01$ comparado com o grupo SC; † indica $P < 0,05$ comparado com o grupo SC+GW501516. **Abreviações:** SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*.

Fonte: O autor, 2015

Como a ativação do AT1r está intimamente ligada a ativação de células estreladas induzida por JAK-2, nós também avaliamos a fosforilação desta proteína. Como esperado, o grupo HFru exibiu um aumento na fosforilação de JAK-2 e o grupo HFru+GW501516 mostrou uma diminuição da fosforilação desta proteína em relação ao grupo HFru (Figura 14A). Para verificar se a fosforilação de JAK-2 levou a uma ativação das células estreladas e se o GW501516 poderia minimizar esse quadro, realizou-se a coloração por *picro Sirius red*, imunohistoquímica e imunofluorescência para α -SMA. A avaliação da fibrose hepática por *picro Sirius red* mostrou que o grupo HFru apresentou uma fibrose inicial e o grupo HFru+GW501516 apresentou melhoras deste parâmetro. Em concordância com esses resultados, a imunohistoquímica e a imunofluorescência revelaram reações positivas para α -SMA em ambos os grupos que receberam a dieta rica em frutose, mas o grupo HFru+GW501516 apresentou uma melhora neste parâmetro (Figura 15). Confirmando estes resultados, também foi investigada a expressão proteica de α -SMA. O grupo HFru apresentou um aumento nos níveis desta proteína e, apesar de haver uma tendência, o grupo HFru+GW501516 não mostrou diferença estatística em relação ao grupo HFru (Figura 14B).

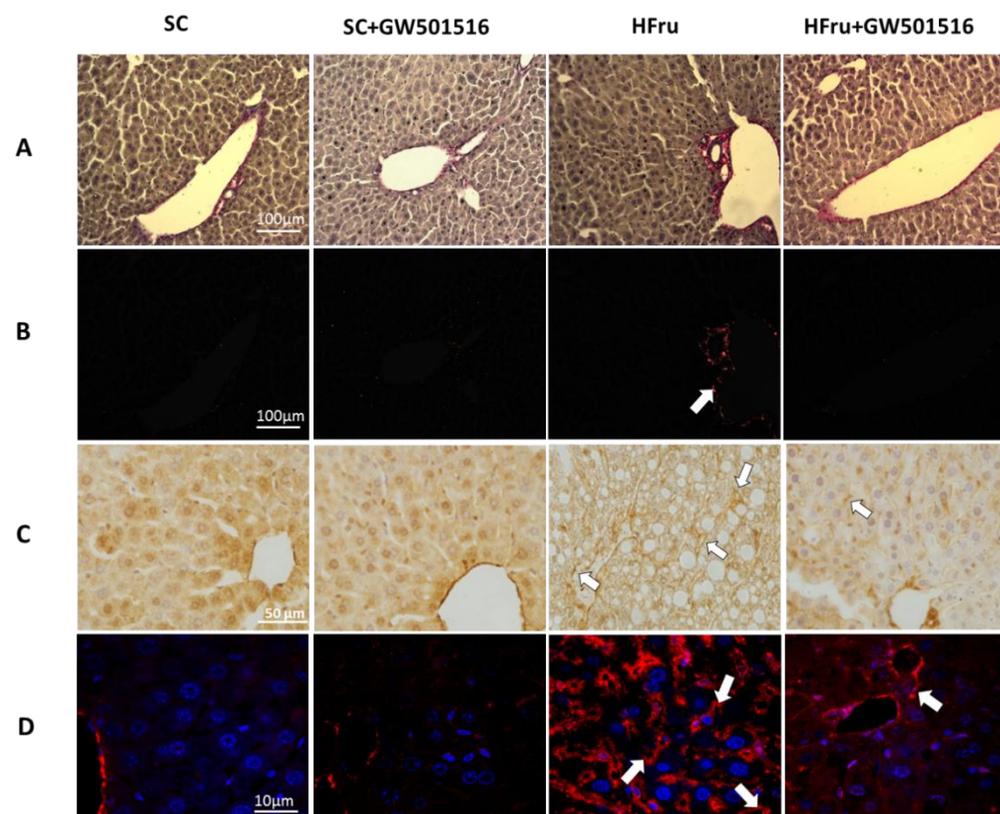
Figura 14 - Expressão proteica de JAK2, JAK2 fosforilada e α -SMA no fígado dos quatro grupos experimentais



Legenda: A: Expressão proteica da razão p-JAK2/JAK. B: Expressão proteica de α -SMA. Os dados são apresentados como média \pm DP. * e ** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$\$\$ indica $P < 0,001$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; JAK2 – janus quinase 2, *janus kinase 2*; p-JAK2, janus quinase 2 fosforilada, *phospho-janus kinase 2*; α -SMA – alfa-actina de músculo liso, *alpha-smooth muscle actin*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 15 – Análise histológica do Fígado



Legenda: Linhas A e B: coloração por picro Sirius red; Linha C: Imunohistoquímica para α -SMA; Linha D: Imunofluorescência para α -SMA. As setas indicam as células estreladas. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas.

Fonte: O autor, 2015

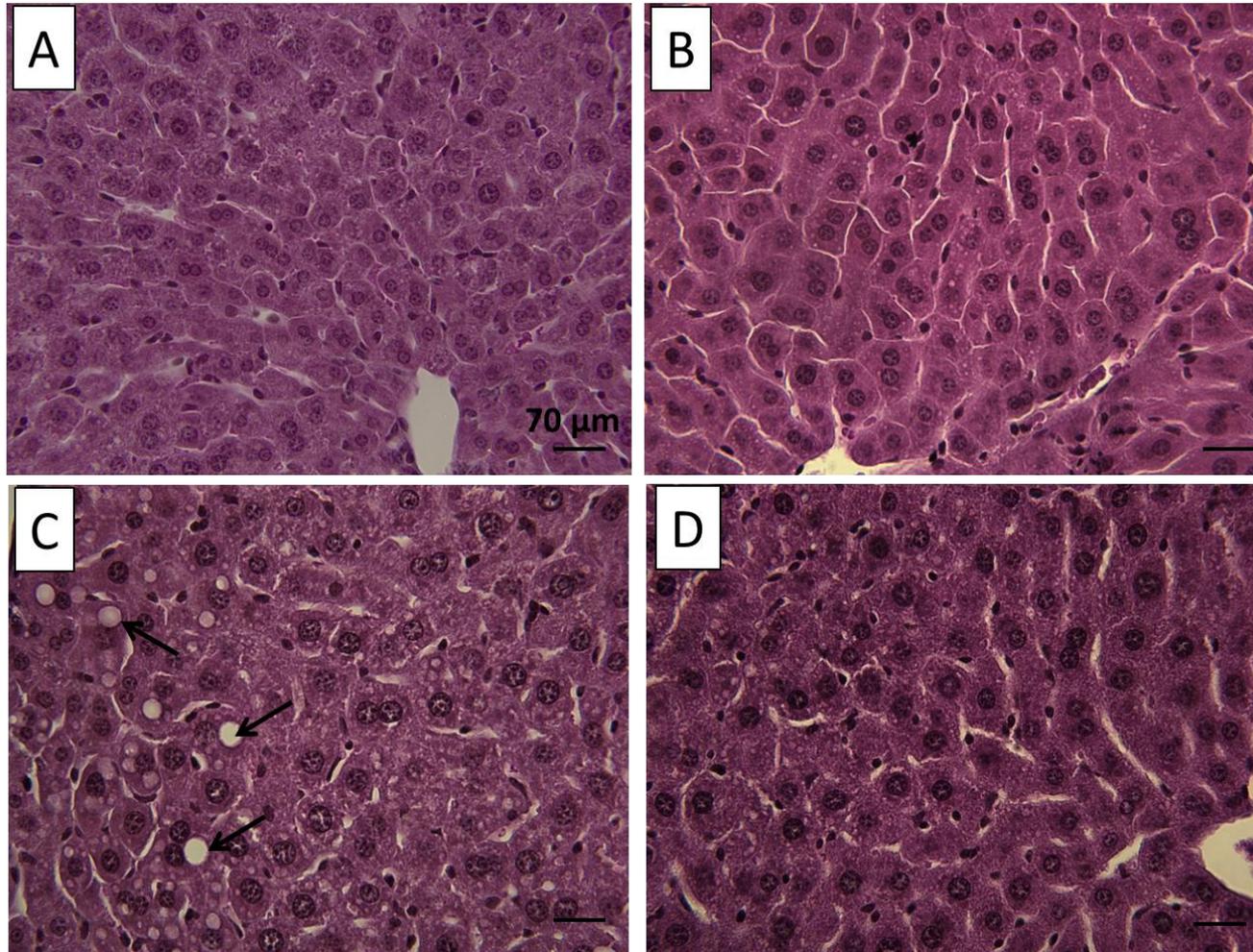
4.3.3 GW501516 estimula genes e proteínas envolvidas na β -oxidação e diminui a lipogênese hepática induzida pela dieta rica em frutose

Como o grupo HFru apresentou elevados níveis de TG plasmático e uma elevada porcentagem de esteatose em relação ao grupo SC (Figura 16 e Tabela 3) e como o tratamento com GW501516 pôde melhorar esses parâmetros no grupo HFru+GW501516, foram analisados os níveis gênicos e proteicos de enzimas e fatores de transcrição envolvidos na oxidação de ácidos graxos e na lipogênese no fígado.

Primeiramente foram avaliadas a expressão gênica de *Ppar- α* e seus genes-alvo, *Cpt1* e ácido graxo translocase (*Fat/Cd36*, *fatty acid translocase*). Também foram avaliados os níveis proteicos de PPAR- α nos extratos nucleares do fígado. A alimentação com frutose reduziu a expressão gênica e proteica de PPAR- α assim como a expressão gênica de *Cpt1*, enquanto o tratamento com GW501516 restaurou a expressão gênica e proteica de PPAR- α e de seus genes-alvo no grupo HFru+GW501516 (Figura 17).

O ChREBP e o SREBP-1c são dois fatores de transcrição bem conhecidos por aumentar a lipogênese hepática em modelos de dieta rica em frutose. Com o intuito de verificar se o tratamento com GW501516 inibiu a expressão desses genes, foram analisados os níveis gênicos e proteicos de ChREBP e SREBP-1c. Não foram encontradas diferenças nas análises do SREBP-1c tanto em níveis de RNAm quanto de proteínas. Contudo, o ChREBP apresentou-se elevado a níveis proteicos no grupo HFru e o tratamento com GW501516 pôde reduzir tanto os níveis de RNAm e de proteína desse fator de transcrição (Figura 18A, B e C). Para confirmar a diminuição da expressão do ChREBP, avaliou-se a expressão proteica da SCD, uma enzima chave envolvida na síntese de ácidos graxos, que está sob controle desse fator de transcrição. O Grupo HFru+GW501516 apresentou uma diminuição da expressão proteica de SCD, sugerindo uma redução da lipogênese hepática (Figura 18D)

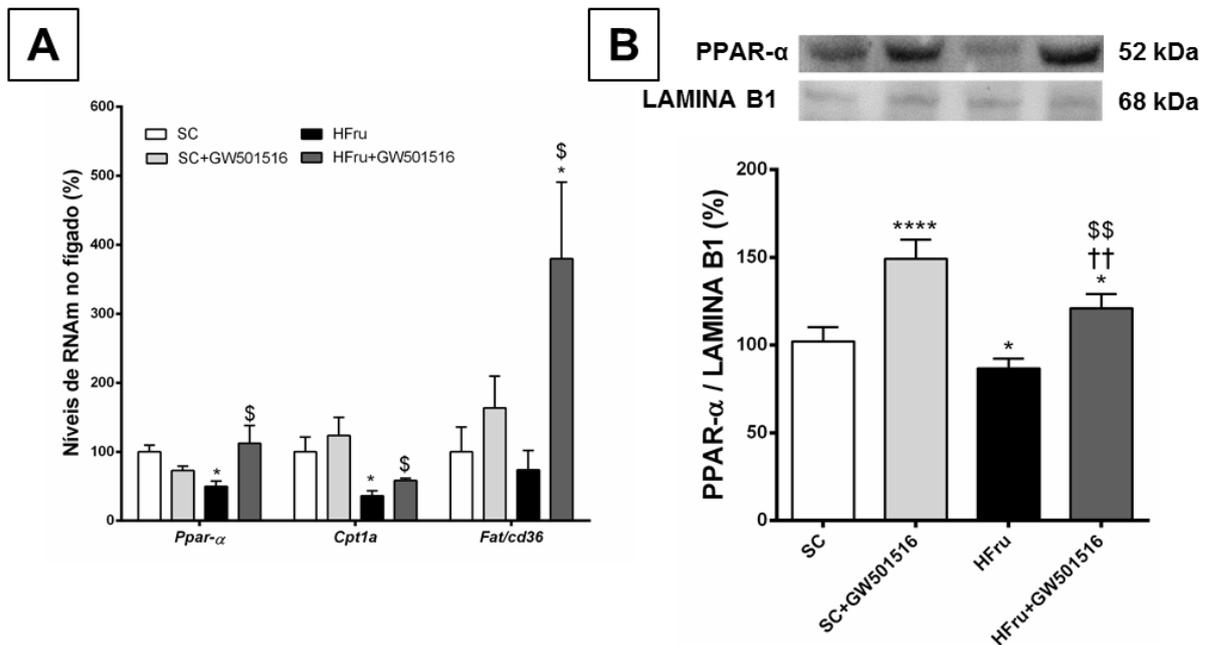
Figura 16 - Fotomicrografias do fígado dos quatro grupos experimentais



Legenda: A: Grupo SC B: Grupo SC+GW501516 C: Grupo HFru D: Grupo HFru+GW501516. As setas apontam as gotículas lipídicas no parênquima hepático. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semana.

Fonte: O autor, 2015

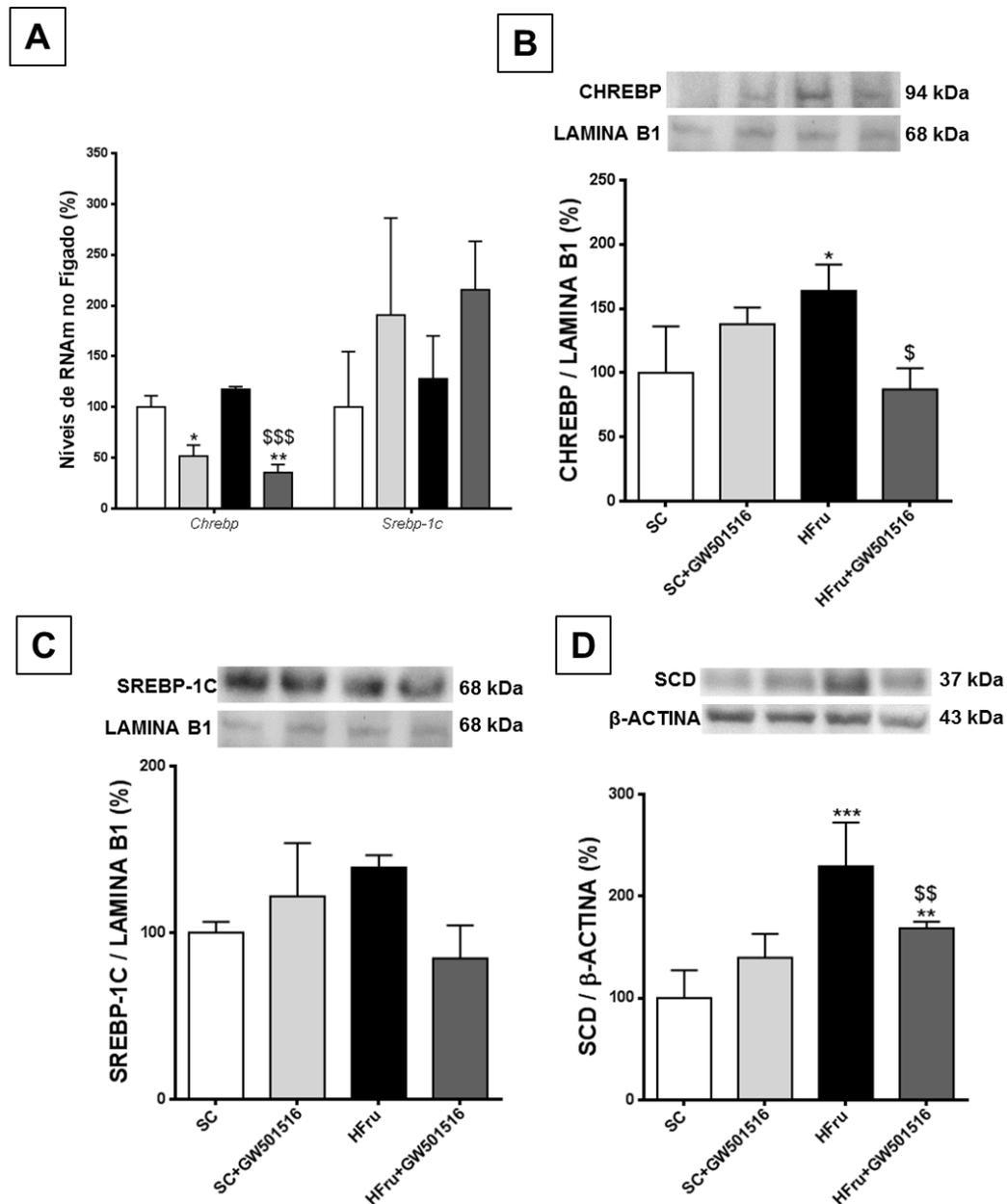
Figura 17 - GW501516 aumenta a expressão gênica e proteica de *Ppar-α* e de seus genes-alvo



Legenda: A: Expressão gênica de *Ppar-α* e dois de seus genes-alvo, *Cpt1a* e *Fat/Cd36*. B: Expressão proteica de PPAR-α nos extratos nucleares do fígado. Os dados são apresentados como média ± DP. * e **** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,0001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; †† indica $P < 0,01$ comparado com o grupo SC+GW501516; \$ e \$\$ indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; PPAR-α – receptor ativador de proliferação peroxissomal-α, *peroxissome proliferator-activated receptor-α*; Cpt1 – carnitina palmitoil transferase 1, *carnitine palmitoyltransferase 1*; Fat/Cd36 – ácido graxo translocase, *fatty acid translocase*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 18 - GW501516 diminui a expressão gênica e proteica de *Chrebp* e de seu gene-alvo SCD



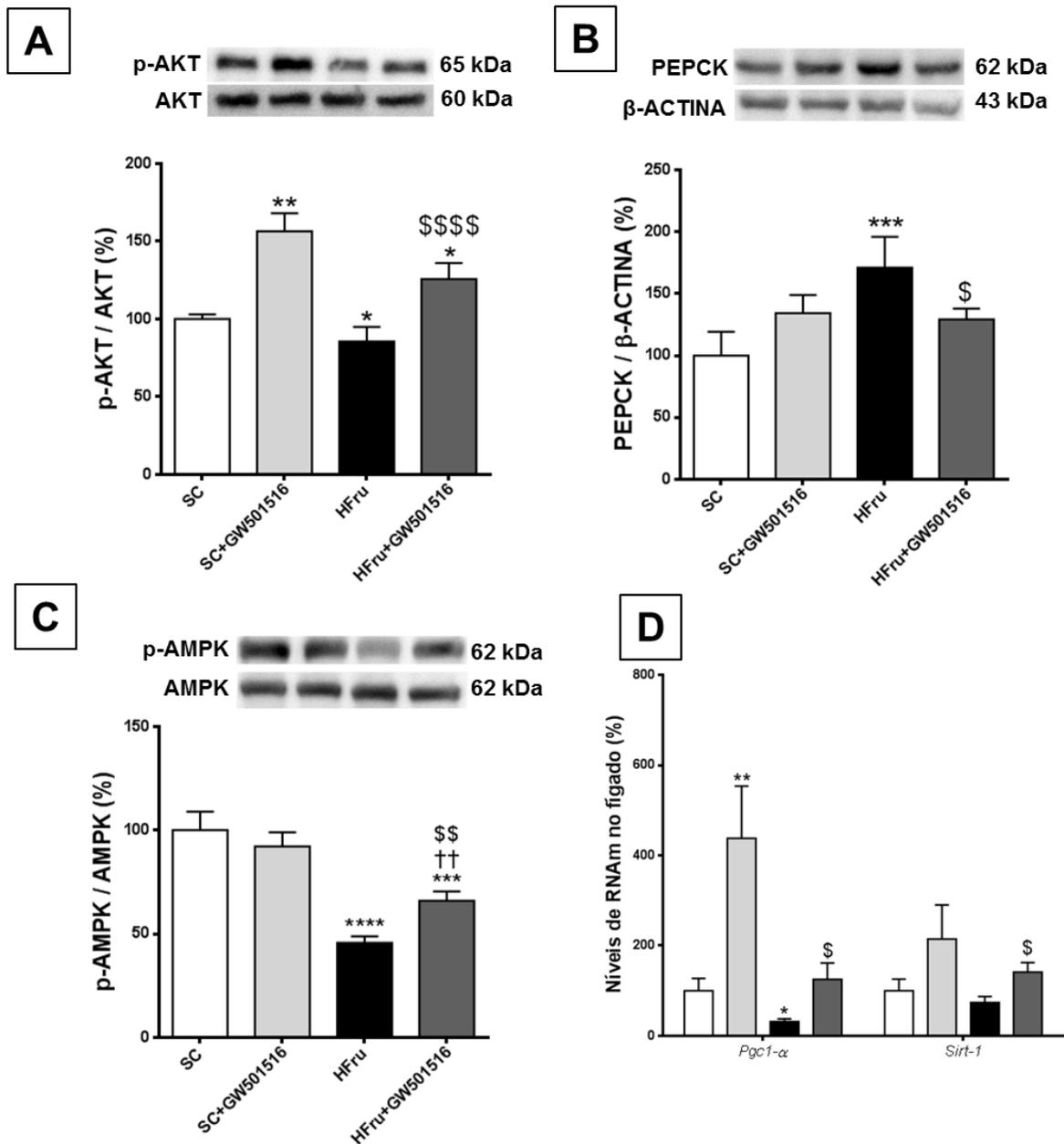
Legenda: Não foi encontrada diferença estatística nas análises de *Srebp-1c*. A: Expressão gênica de *Chrebp* e *Srebp-1c*. B: Expressão proteica de CHREBP nos extratos nucleares do fígado. C: Expressão proteica de SREBP-1c nos extratos nucleares do fígado. D: Expressão proteica de SCD. Os dados são apresentados como média \pm DP. *, ** e *** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$, \$\$ e \$\$\$ indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; ChREBP – proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato, *carbohydrate response element-binding protein*; SREBP-1c – proteína ligante de elemento regulador de esteroil-1c, *sterol regulatory elemento-binding protein-1c*; SCD – esteroil-Coa desaturase, *stearoyl-Coa desaturase*;

Fonte: O autor, 2015

4.3.4 GW501516 alivia a gliconeogênese possivelmente por uma maneira dependente de AMPK

Embora não tenham sido encontradas diferenças nem na insulina plasmática nem na glicose plasmática (Tabela 3), investigou-se se a sinalização de insulina teria sido afetada pela dieta rica em frutose durante as 11 semanas. Para isso, foi avaliada a fosforilação da AKT em serina-473. O GW501516 provocou um aumento da fosforilação de AKT em ambos os grupos tratados (Figura 19A). Além disso, foi examinada a expressão de PEPCK, uma enzima limitante na gliconeogênese. De maneira interessante, o GW501516 aboliu o aumento da PEPCK provocado pela dieta rica em frutose (Figura 19B). Finalmente, foram avaliados os níveis de fosforilação da AMPK, um regulador central do metabolismo hepático. Como esperado, o grupo HFru apresentou uma diminuição dos níveis da fosforilação de AMPK e, de forma interessante o grupo HFru+GW501516 mostrou um aumento da fosforilação de AMPK, mas não o grupo SC+GW501516. Para confirmar a ativação do AMPK, foi avaliada a expressão de *Sirt1* e *Pgc1- α* . O grupo HFru+GW501516 mostrou um aumento da expressão gênica tanto de *Sirt1* quanto de *Pgc1- α* . Todos os valores de *P* podem ser encontrados na figura 19 e na tabela 3.

Figura 19 - Níveis de fosforilação de AKT, gliconeogênese e ativação da AMPK



Legenda: A: Níveis de fosforilação da AKT em serina-473. B: Expressão proteica de PEPCK. C: Níveis de fosforilação da AMPK. D: Expressão gênica de *Pgc1-α* e *Sirt1*. Os dados são apresentados como média ± DP. *, **, *** e **** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; †† indica $P < 0,01$ comparado com o grupo SC+GW501516; \$, \$\$ e \$\$\$ indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,0001$, respectivamente, comparado com o grupo HFru. **Abreviações:** SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; AKT – proteína quinase B, *protein kinase B (PKB)*; PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; AMPK – proteína quinase ativada por AMP, *AMP-activated protein kinase*; PGC1-α – coativador-1 alfa do ativador de proliferação peroxissomal gama, *peroxisome proliferator-activated gamma coactivator-1 alpha*; SIRT1 – sirtuína 1.

Fonte: O autor, 2015

4.4 Dados dos rins

4.4.1 Efeitos do GW501516 sobre o *Ppar-β/δ* e seus genes-alvo nos Rins

Com o intuito de verificar se o tempo de administração do GW501516 assim como a sua dose foram capazes de ativar o *Ppar-β/δ* e seus genes alvos nos rins, verificamos a expressão gênica deste fator de transcrição e de dois de seus genes-alvo.

Os níveis de RNAm do *Ppar-β/δ* apresentaram-se reduzidos nos órgãos do grupo HFru, embora não tenha havido uma diferença estatística significativa em relação ao grupo SC. De maneira inversa o grupo HFru+GW501516 apresentou um aumento dos níveis de RNAm do *Ppar-β/δ* em relação ao grupo HFru. Para confirmar se as mudanças observadas na expressão de *Ppar-β/δ* afetaram a atividade deste fator de transcrição, foram analisados os níveis de RNAm de *Pdk4* e *Cpt1*. Concordando com os resultado do RNAm do *Ppar-β/δ*, o *Pdk4* apresentou-se diminuído no grupo HFru e o GW501516 pôde aumentar a expressão desse gene-alvo do *Ppar-β/δ*. A expressão gênica de *Cpt1* apresentou-se aumentada em ambos os grupos tratados e não foi encontrada diferença em relação aos grupos HFru e SC. Esses resultados confirmam a ativação do *Ppar-β/δ*. Os valores de *P* podem ser encontrados na figura 20.

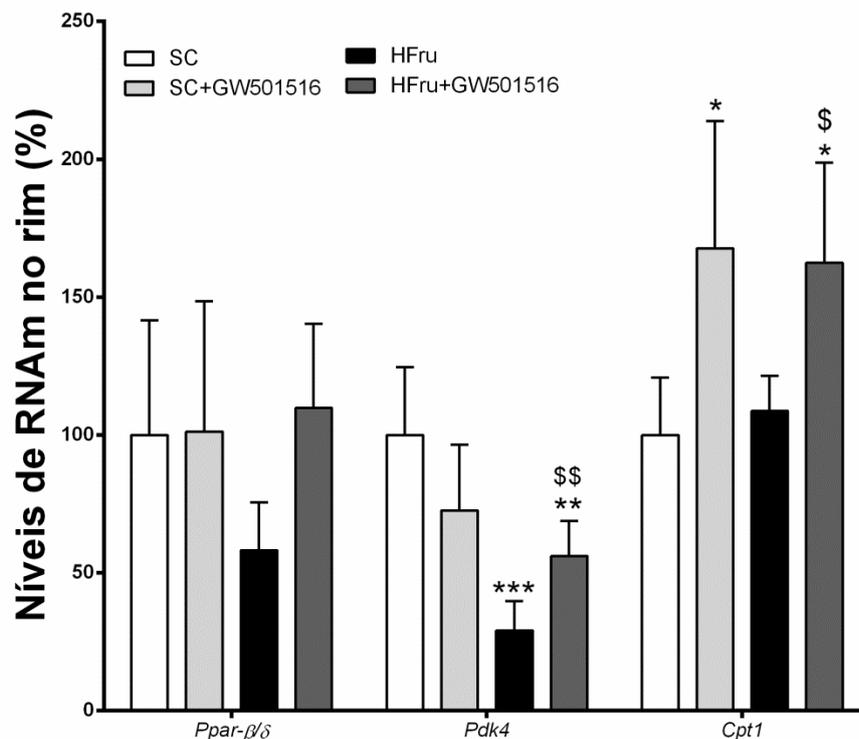
4.4.2 Efeitos anti-inflamatórios do GW501516 nos rins são independentes da *downregulation* de AT1r

Como esperado, a dieta rica em frutose causou uma ativação do eixo ECA/AT1r e uma elevação nos níveis proteicos e gênicos de renina, dados esses que corroboram com a elevação da PAS encontrada nesse mesmo grupo (Figura 21). De forma interessante, a administração de GW501516 não teve efeitos sobre a superativação do eixo ECA/AT1r induzida pela dieta o que sugere que as melhoras

encontradas no grupo HFru+GW501516 foram independentes da *downregulation* do AT1r (Figura 21).

Como a superativação do AT1r está intimamente relacionada ao estado inflamatório e com o intuito de confirmar esses efeitos causados pela dieta rica em frutose, os níveis de RNAm de *IL-1 β* , *IL-6*, *Mcp-1* e *Cd68* foram investigados. A dieta rica em frutose causou uma elevação desses marcadores inflamatórios e o GW501516 conseguiu suprimir essas mudanças (Figura 22A). Concordando com os resultados dos genes pro-inflamatórios, a dieta rica em frutose diminuiu a expressão proteica de I κ B- α , sugerindo que o NF- κ B poderia estar sendo translocado para o núcleo onde ativaria seus genes-alvo como *IL-6* e *Mcp-1*. Nesse parâmetro, o GW501516 conseguiu aumentar a expressão de I κ B- α (Figura 21B). Também foram verificadas a expressão proteica de duas proteínas inflamatórias relacionadas a ativação do AT1r. A dieta rica em frutose aumentou a fosforilação tanto da ERK 1/2 quanto da JNK e o tratamento com o GW501516 aliviou estas mudanças, sugerindo uma diminuição do estado inflamatório dos animais (Figura 22C e D).

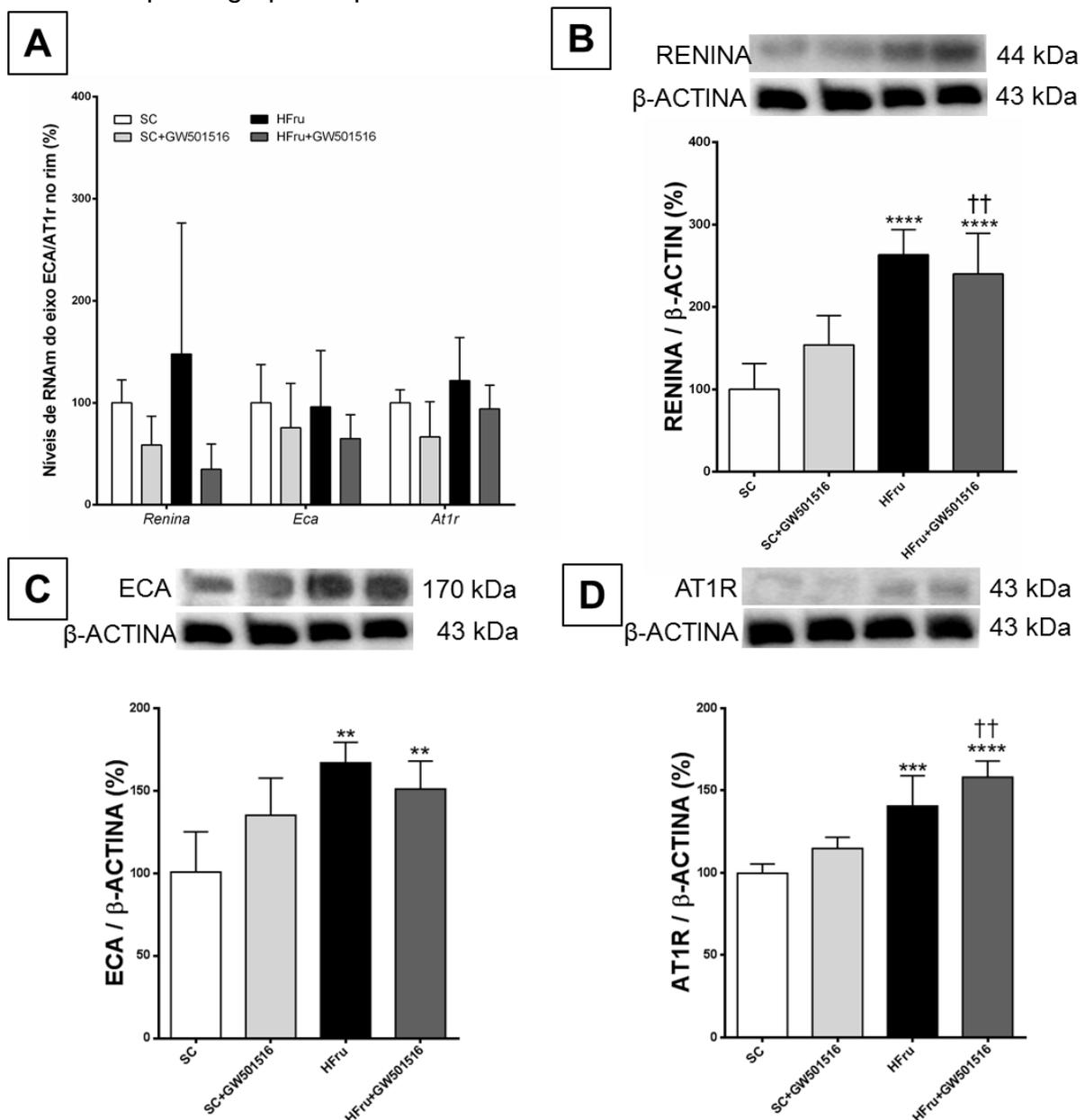
Figura 20 - Níveis de RNAm do *Ppar- β/δ* , *Pdk4* e *Cpt1* no rim dos quatro grupos experimentais



Legenda: GW501516 foi capaz de ativar o *Ppar-β/δ* e seus dois genes alvo (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média ± DP. *, ** e *** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$ e \$\$ indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$ comparado com o grupo HFru. **Abreviações:** SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; *Ppar-β/δ* – receptor ativador de proliferação peroxissomal-β/δ, *peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ*; *Pdk4* – piruvato desidrogenase quinase isoforma 4, *pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4*; *Cpt1* – carnitina palmitoil transferase 1, *carnitine palmitoyltransferase 1*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 21 - Expressão gênica e proteica de renina e do eixo ECA/AT1r no rim dos quatro grupos experimentais

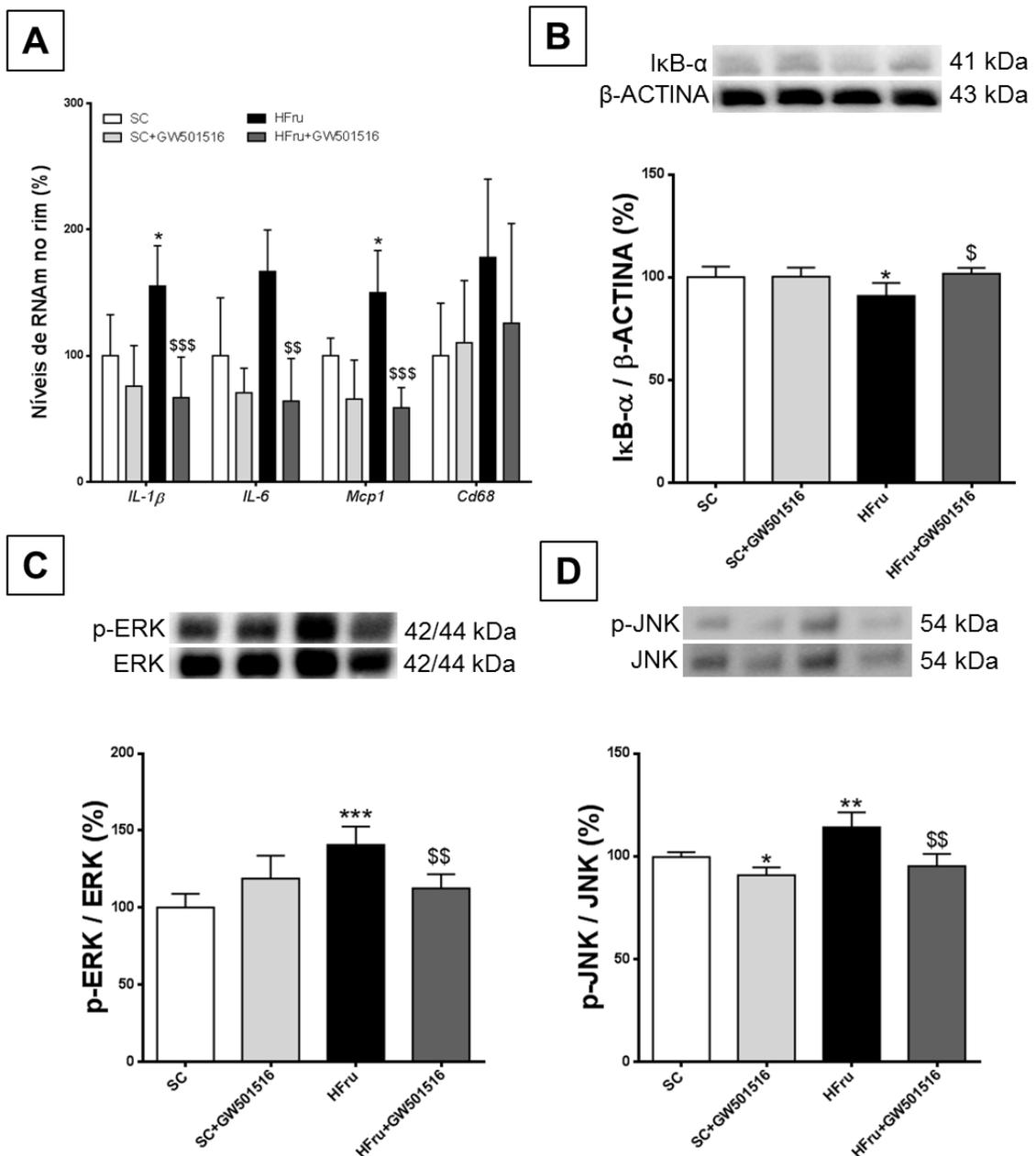


Legenda: O tratamento com GW501516 não apresentou resultados significativos (n=5/grupo). **A:** Expressão gênica de renina e do eixo ECA/AT1r. **B:** Expressão proteica de renina. **C:** Expressão proteica de ECA. **D:** Expressão proteica de AT1r. Os dados são apresentados

como média \pm DP. **, *** e **** indicam $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; †† indica $P < 0,01$ comparado com o grupo SC+GW501516. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 22 - Expressão gênica de marcadores inflamatórios e proteica de proteínas relacionadas a vias inflamatórias no rim



Legenda: A: Expressão gênica de marcadores inflamatórios. B: Expressão proteica de I κ B- α . C: Expressão proteica de p-ERK. D: Expressão proteica de p-JNK. Os dados são apresentados

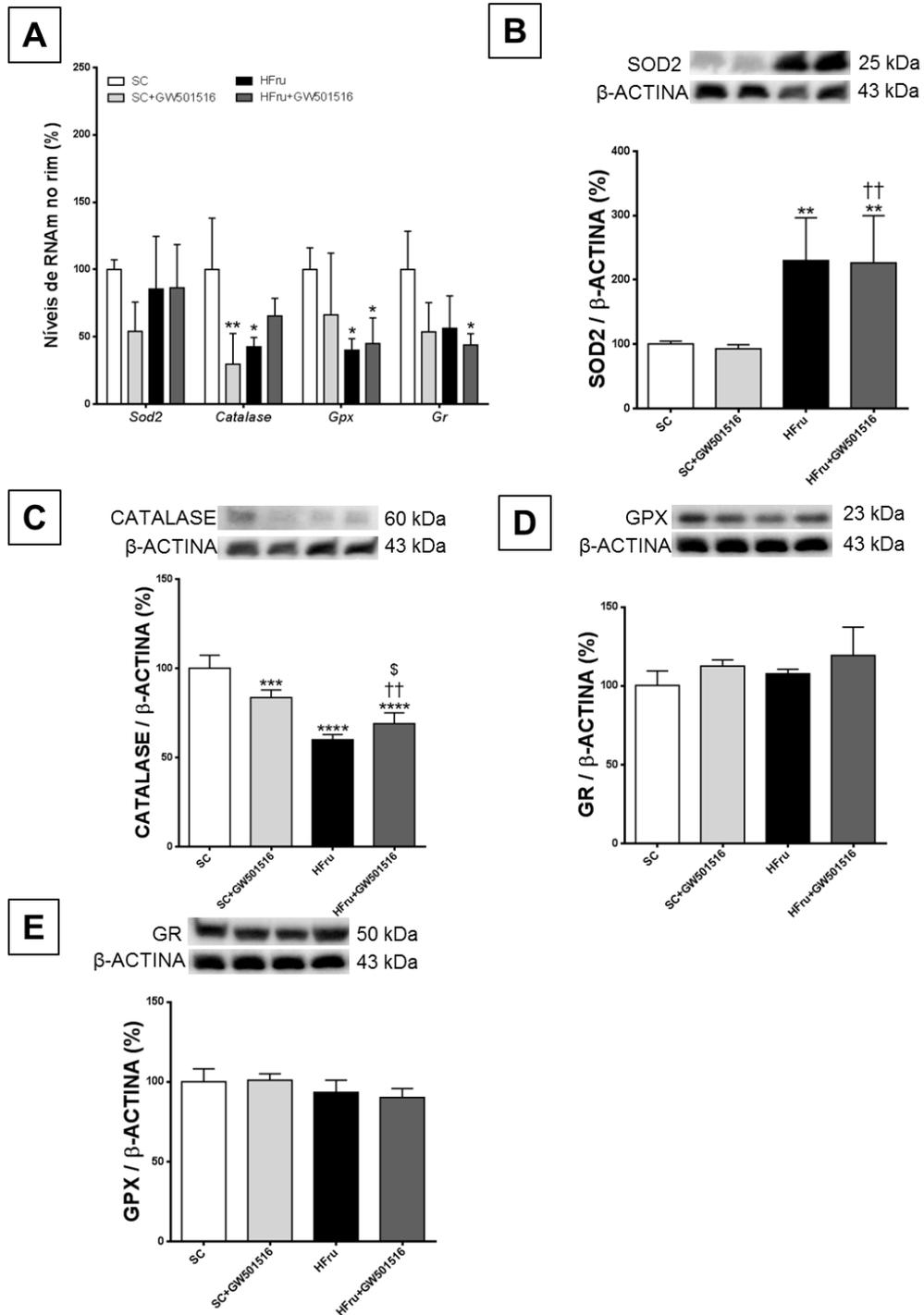
como média \pm DP. *, ** e *** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; \$, \$\$ e \$\$\$ indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; IL-1 β – interleucina-1 β ; IL-6 – interleucina-6; Mcp-1, proteína quimioatrativa de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; Cd68 – *cluster of differentiation 68*; I κ B- α – inibidor do NF- κ B- α , *inhibitor of NF- κ B- α* ; p-ERK/ERK – relação da fosforilação da ERK (quinase regulada por sinais extracelulares, *extracellular signal-regulated kinase*) e ERK total; p-JNK/JNK – relação da fosforilação de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e JNK total.

Fonte: O autor, 2015

4.4.3 GW501516 não reduz o estresse oxidativo induzido pela dieta rica em frutose no rim

Também foi verificado se o GW501516 poderia restaurar a expressão gênica e proteica das enzimas antioxidantes uma vez que dietas ricas em frutose alteram a sua expressão. O grupo HFru apresentou uma elevação da expressão proteica de SOD2 confirmando um desequilíbrio das enzima antioxidantes, mas de forma interessante o GW501516 não pôde restaurar este parâmetro no grupo HFru+GW501516 (Figura 23B). A expressão proteica de catalase apresentou-se diminuída no grupo HFru e no grupo HFru+GW501516 em relação ao grupo SC, mas o grupo HFru+GW501516 apresentou um pequeno porém significativo aumento da expressão desta proteína em relação ao grupo HFru (Figura 23C). As enzimas GPx e GR também foram analisadas e não foram encontradas diferenças estatísticas na sua expressão proteica em todos os grupos experimentais (23D e E), apesar de a expressão gênica de *Gpx* ter apresentado uma diminuição em ambos os grupos que receberam a dieta rica em frutose e a expressão gênica de *Gr* também apresentou-se diminuída no grupo HFru+GW501516 (Figura 23).

Figura 23 - Expressão gênica e proteica de proteínas anti-oxidantes



Legenda: A: Expressão gênica. B: Expressão proteica de SOD2. C: Expressão proteica de catalase. D: Expressão proteica de GR. E: Expressão proteica de GPx. Os dados são apresentados como média \pm DP. *, **, *** e **** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente, comparado com o grupo SC; †† indica $P < 0,01$ comparado com o grupo SC+GW501516; \$ indica $P < 0,05$ comparado com o grupo HFru. Abreviações: SC – grupo controle; SC+GW501516 – grupo controle tratado com GW501516 por três semanas; HFru – grupo com dieta rica em frutose; HFru+GW501516 – grupo com dieta rica em frutose tratado com GW501516 por três semanas; SOD2 – superóxido desmutase 2; GPX – glutatona peroxidase; GR – glutatona redutase.

Fonte: O autor, 2015

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a administração de GW501516, um agonista PPAR- β/δ , pôde melhorar o estado inflamatório do TAB, diminuir a ativação de células estreladas e a expressão gênica e de proteínas envolvidas na lipogênese e gliconeogênese no fígado, além de reduzir a inflamação renal em um modelo de dieta rica em frutose.

O consumo desse monossacarídeo tem aumentado em todo o mundo e modelos para estudar a ingestão crônica desse monossacraídeo, como a ingestão de água contendo frutose (Spruss *et al.*, 2009) ou de dieta contendo frutose (Schultz *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014), têm sido propostos. Devido às diferenças na fonte de frutose (líquido ou dieta) e devido ao tempo de exposição à dieta, diversos resultados têm sido descritos na literatura. Neste trabalho foi utilizado um modelo de dieta rica em frutose que imita o consumo excessivo de frutose em comidas processadas. Os animais foram expostos à essa dieta durante oito semanas e então foi administrado o GW501516 na dose de 3mg/Kg/dia durante três semanas como descrito em um estudo prévio (Serrano-Marco *et al.*, 2011).

Previamente nosso grupo demonstrou que uma dieta rica em frutose pode induzir desordens metabólicas independentemente de sobrepeso ou obesidade (Schultz *et al.*, 2013) e outros estudos têm descrito que dietas ricas em frutose podem levar a um aumento da adiposidade e inflamação do TAB (Mamikutty *et al.*, 2014; Prieto *et al.*, 2015) de uma maneira diferente daquela encontrada em dietas ricas em gordura. Além disso, a literatura atual já descreve a utilização da frutose como um modelo para a exarcebação da atividade do eixo ECA/AT1r (Chou *et al.*, 2015), dados que corroboram com os achados nos três órgãos estudados. Os achados deste trabalho mostram que o GW501516 inibiu a inflamação induzida pela dieta rica em frutose. Esta droga tem mostrado propriedades anti-inflamatórias através da ativação do PPAR- β/δ , já que ele pode inibir fatores de transcrição relacionados à inflamação, como o NF- κ B, e conseqüentemente seus genes alvo, como *IL-6* e *Mcp1* (Coll *et al.*, 2010).

Neste estudo, nós propomos um mecanismo adicional pelo qual o PPAR- β/δ pode prevenir a inflamação no TAB induzida por dieta rica em frutose. A inflamação também pode ocorrer no TAB devido a uma super ativação do eixo ECA/AT1r. No

TAB, o angiotensinogênio é convertido em Ang-I e em seguida em Ang-II que afeta os adipócitos de maneira autócrina e parácrina através dos receptores de angiotensina. O AT1r está intimamente relacionado à sinalização inflamatória e sua inibição melhora a sensibilidade à insulina em modelos experimentais e em humanos (Carroll *et al.*, 2013). Neste estudo, o grupo HFru+GW501516 mostrou uma redução da ativação do eixo ECA/AT1r comparado com o grupo HFru e essa melhora foi relacionada a uma melhora no estado inflamatório do TAB.

A ativação do AT1r leva a uma fosforilação de tirosinas quinase incluindo a JAK2 (Alves *et al.*, 2012) e recentemente foi demonstrado que, no fígado, a fosforilação de JAK2 é um importante passo para a ativação de células estreladas (Granzow *et al.*, 2014). Neste estudo foi mostrado que os animais que receberam a dieta rica em frutose apresentaram uma superativação do eixo ECA/AT1r e consequentemente a ativação de células estreladas através da fosforilação de JAK2 no fígado. De maneira interessante, o grupo HFru+GW501516 apresentou uma diminuição da ativação de células estreladas, embora algumas células ativadas tenham sido encontradas nesse grupo e não tenha sido encontrada diferença estatística na análise por *immunoblotting* do α -SMA. Do mesmo modo a fosforilação de JAK2 encontrou-se diminuída no grupo HFru+GW501516 independentemente da modulação do eixo ECA/AT1r, uma vez que não foi encontrada diferença na expressão proteica do AT1r nesse grupo. Isso sugere que o GW501516 pode inibir a fosforilação de JAK2 dependente de AT1r independentemente da diminuição de AT1r.

Além da ativação do eixo ECA/AT1r, a ingestão da dieta rica em frutose leva a um aumento do acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos. Isto é atribuído a uma inibição da oxidação de ácidos graxos, aumento da lipogênese *de novo* e um prejuízo no *clearance* do TG hepático (Nomura e Yamanouchi, 2012). A frutose advinda do sangue portal é eficientemente absorvida pelo GLUT2 para o interior dos hepatócitos. O primeiro passo do seu metabolismo consiste na sua conversão em F1F pela frutoquinase. A F1F por si só é capaz de diminuir os níveis hepáticos de RNAm de PPAR- α , prejudicando a oxidação de ácidos graxos (Nagai *et al.*, 2002; Roglans *et al.*, 2007). No grupo HFru+GW501516 foi verificado um aumento dos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e, corroborando com esses resultados, a expressão proteica de PPAR- α nos extratos nucleares também foi aumentada. Também foi verificado que o conteúdo de TG hepático foi diminuído com

a curta administração de GW501516 sugerindo uma melhora do *clearance* do TG hepático.

Dietas ricas em frutose também são caracterizadas por ativarem a lipogênese *de novo* pelo incremento da expressão de SREBP-1C e ChREBP (Nomura e Yamanouchi, 2012). Embora não tenha sido encontrada diferença estatística na expressão gênica de SREBP-1c, o ChREBP apresentou-se aumentado nos extratos nucleares hepáticos no grupo HFru assim como seu gene alvo, a enzima SCD. O grupo HFru+GW501516 apresentou uma redução de ChREBP e SCD colaborando para a diminuição da lipogênese *de novo* induzida pela dieta rica em frutose. Esses resultados corroboram com dados recentes que mostram que o GW501516 aumenta a beta-oxidação de ácidos graxos e atenua a lipogênese em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Bojic *et al.*, 2014).

Embora não tenha sido encontrada hiperinsulinemia e hiperglicemia, uma diminuição da fosforilação da AKT em serina-473 foi encontrada no grupo HFru, mas é importante ressaltar que somente esse parâmetro não é conclusivo para indicar uma resistência hepática à insulina. De fato, a falta de mudanças na insulina plasmática, tanto pela dieta rica em frutose como pela resposta ao GW501516 sugere que os animais não eram resistentes à insulina e a administração do GW501516 neste estudo não teve efeitos sobre a resistência à insulina. Contudo, têm sido mostrado que o GW501516 pode melhorar a sinalização da insulina no fígado em modelos de dieta rica em gordura (Bojic *et al.*, 2014).

Como descrito acima, quando a frutose é transportada para o interior dos hepatócitos, a frutoquinase realiza a sua fosforilação em F1F. No modelo de dieta rica em frutose, isso conduz a um aumento do consumo de ATP, levando a um desbalanço entre ATP/AMP, aumentando os níveis de AMP (Lanaspa *et al.*, 2012b). O destino desse AMP é definido por duas enzimas: a AMPK e a xantina desidrogenase. Quando a xantina desidrogenase é mais ativa que a AMPK, o AMP é convertido em ácido úrico (Abdelmalek *et al.*, 2010). Neste trabalho, foi mostrado que a fosforilação da AMPK estava diminuída no grupo HFru, o que sugere que a sua atividade encontrava-se prejudicada. Além disso, foi encontrado um aumento do ácido úrico plasmático e urinário no grupo HFru, o que corrobora com a literatura que descreve as dietas ricas em frutose capazes de aumentar os níveis desse metabólito que inibem a atividade da AMPK (Bjornstad *et al.*, 2015). O GW501516 tem sido descrito como um ativador da AMPK (Barroso *et al.*, 2013; Bojic *et al.*,

2014) e também foi mostrado que o grupo HFru+GW501516 apresentou uma elevação da fosforilação de AMPK, embora o grupo SC+GW501516 não tenha apresentado uma elevação desta fosforilação. Possivelmente pela melhora na atividade da enzima AMPK do fígado, os animais do grupo HFru+GW501516 apresentaram uma redução dos níveis de ácido úrico plasmático e urinário.

A AMPK é um regulador central no metabolismo hepático e possui diversos mecanismos para regular o metabolismo de carboidratos e lipídios. As análises de SIRT1 e PGC1- α , ambos substratos que aumentam a transcrição mitocondrial e que são regulados pela atividade da AMPK, mostraram que os dois encontraram-se aumentados nos grupos tratados. A SIRT1 é intimamente relacionada ao PGC1- α , aumentando sua atividade assim como inibindo a ação do SREBP-1c (Houtkooper *et al.*, 2012). O PGC1- α aumenta a biogênese mitocondrial e taxas de respiração desta organela e diretamente coativa múltiplos fatores de transcrição, como os PPARs (Canto e Auwerx, 2009).

A AMPK também regula a expressão de genes envolvidos na gliconeogênese, como a PEPCK (Viollet *et al.*, 2009). O modelo experimental utilizado neste trabalho mostrou uma elevação da expressão proteica da PEPCK e o grupo HFru+GW501516 reverteu este estado, o que sugere um outro mecanismo de atividade da AMPK.

Finalmente, a literatura descreve que a ativação das células estreladas pode inibir a atividade da AMPK através do 2-aracondoiliglicerol em um modelo de doença hepática induzida pelo álcool (Suh e Jeong, 2011). Além disso, a adiponectina de alto peso molecular pode inibir a ativação e proliferação das células estreladas através da ativação da AMPK (Adachi e Brenner, 2008). Esses estudos demonstram, então, uma forte relação entre a AMPK e a atividade das células estreladas. Todos esses dados sugerem que a atividade de AMPK induzida pelo GW501516 poderia atenuar a ativação das células estreladas no fígado.

O presente estudo confirmou que 11 semanas de dieta rica em frutose foram capazes de levar a uma superativação do AT1r e consequente ativação de vias inflamatórias nos rins dos animais. O grupo HFru+GW501516 mostrou uma melhora do estado inflamatório renal independentemente do *downregulation* do AT1r. A expressão da proteína I κ B- α foi aumentada no grupo HFru+GW510156 sugerindo uma menor atividade do fator de transcrição NF- κ B. Isso pôde ser confirmado pela diminuição da expressão gênica de seus genes-alvo, como a *IL-6* e *Mcp-1*, que se

encontraram reduzidas com o tratamento. Esses resultados estão de acordo com àqueles do TAB epididimário assim como os de outro estudo que mostrou a capacidade do GW501516 em diminuir a inflamação tubulointersticial em um modelo de proteinúria renal (Yang *et al.*, 2011). A *IL-1 β* também tem um papel importante no desenvolvimento da inflamação renal. Quando ela é secretada por macrófagos recruta outras células inflamatórias para o local, amplificando o sinal de inflamação (Gustafsson e Unwin, 2013). Neste estudo foi demonstrado que a expressão gênica de *IL-1 β* foi diminuída no grupo HFru+GW501516, confirmando os efeitos anti-inflamatórios do GW501516.

A literatura descreve que o NF- κ B tem um papel importante na transcrição do AT1r (Luo *et al.*, 2015). Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na expressão gênica e proteica do AT1r no fígado e nos rins, mas somente no TAB epididimário, e assim mesmo melhoras no perfil inflamatório tenham sido observadas, sugere-se que a curta administração do GW501516 (três semanas) não pôde alterar a expressão de AT1r induzida pela dieta rica em frutose, porém foi capaz de melhorar o perfil inflamatório de vias relacionadas a ativação deste receptor.

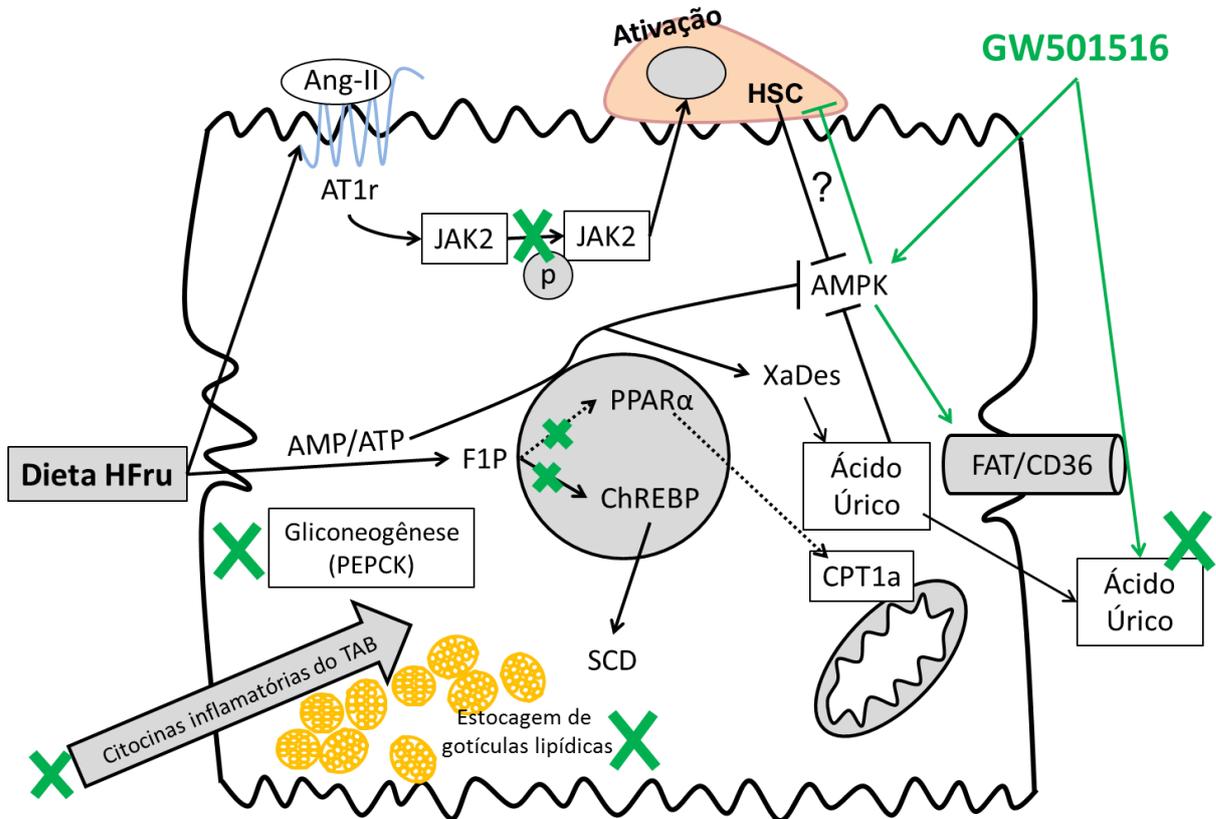
O presente estudo confirmou que a dieta rica em frutose pode conduzir a um estresse oxidativo nos rins dos animais. Contudo a administração do GW501516 não apresentou efeitos relevantes sobre o desequilíbrio das enzimas antioxidantes. A SOD2 é a primeira enzima antioxidante que degrada as EROs e age como a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo (Velarde *et al.*, 2012). Neste estudo, a dieta rica em frutose administrada por 11 semanas para os animais foi capaz de aumentar a expressão proteica mas não gênica desta enzima, o que sugere um inicial desequilíbrio entre as enzimas e que o GW501516 não apresentou efeito sobre o grupo HFru+GW501516. O balanço entre as atividades da SOD2 e catalase nas células são cruciais na determinação do estado saudável de EROs no interior da célula (Mladenov *et al.*, 2015). Neste trabalho foi encontrada uma diminuição da expressão proteica e gênica da catalase no grupo HFru e o GW501516 pôde melhorar este parâmetro somente a nível proteico no grupo HFru+GW501516. Contudo, os níveis proteicos de catalase encontrados no grupo HFru+GW501516 foram menores que no grupo SC. Além disso, não foram encontradas diferenças no ciclo GPx-GR quanto a expressão proteica e gênica. Desta forma, sugere-se que o

GW501516 não apresentou efeitos sobre o desequilíbrio das enzimas antioxidantes nos rins.

Este estudo apresenta algumas limitações. Alguns experimentos com cultura de células poderiam verificar a eficiência do GW501516 no controle do eixo ECA/AT1r em adipócitos e hepatócitos e conseqüentemente suas cascatas próinflamatórias intracelulares. Embora um mecanismo pelo qual o GW501516 poderia melhorar o dano hepático tenha sido sugerido, é necessário confirmar alguns deles, especialmente àqueles relacionados a AMPK e a inibição/ativação de células estreladas. Além disso, o isolamento da região cortical e medular dos rins poderia fornecer melhores informações a respeito da inflamação renal e da atuação do GW501516 sobre ela.

A figura 24 mostra a hipótese deste trabalho pela qual o GW501516 poderia melhorar o dano hepático causado por uma dieta rica em frutose. E a figura 25 mostra a hipótese pela qual o GW501516 poderia melhorar a inflamação renal e conseqüentemente os parâmetros urinários causados por uma dieta rica em frutose.

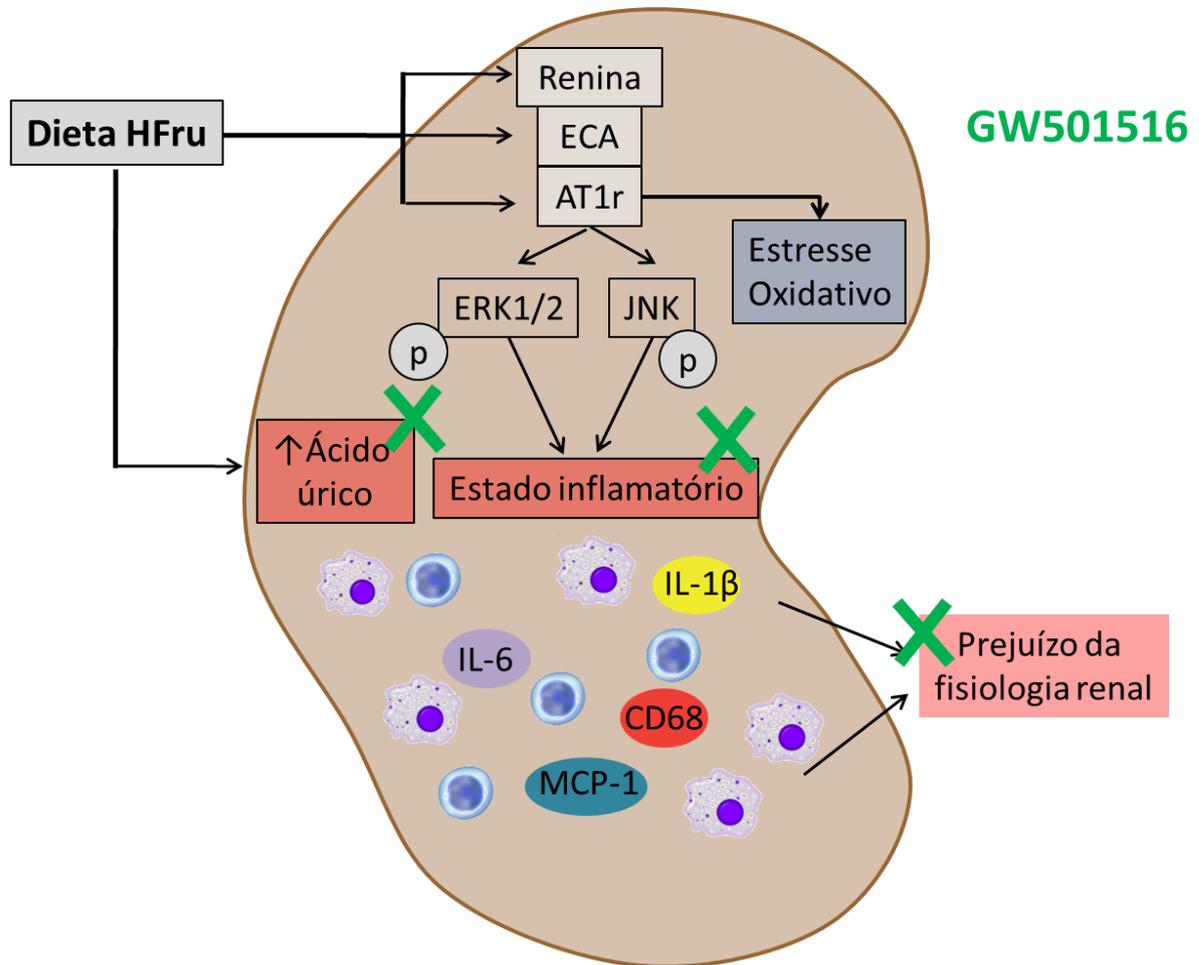
Figura 24 - Possível mecanismo pelo qual o GW501516 poderia melhorar o dano hepático causado pela dieta rica em frutose



Legenda: O GW501516 ativa a AMPK que melhora a expressão de genes e proteínas envolvidas na beta-oxidação, diminui a expressão proteica de PEPCK e poderia diminuir a ativação de células esteladas. O GW501516 também diminui a fosforilação de JAK2 dependente de AT1r. Citocinas inflamatórias advindas do TAB foram reduzidas pelo GW501516, assim como a produção de ácido úrico pelos hepatócitos. As setas interias indicam estímulo; as setas pontilhadas indicam inibição. Em verde, as ações do GW501516. **Abreviações:** HFru – *high-fructose*; Ang-II – angiotensina-II; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*; JAK2 – janus quinase 2, *janus kinase 2*; AMPK – proteína quinase ativada por AMP, *AMP-activated protein kinase*; XaDes – xantina desidrogenase; HFru – dieta rica em frutose, *high-fructose*; AMP – adenosina monofosfato, ATP – adenosine-5'-trifosfato; F1P – frutose-1-fosfato; PPAR- α – receptor ativador de proliferação peroxissomal- α , *peroxisome proliferator-activated receptor- α* ; ChREBP – proteína ligante de elemento responsivo ao carboidrato, *carbohydrate-responsive element-binding protein*; PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; TAB – tecido adiposo branco; SCD – estearoil-Coa desaturase, *stearoyl-Coa desaturase*; Fat/Cd36: ácido graxo translocase, *fatty acid translocase*; CPT1a: carnitina palmitoiltransferase I a, *carnitine palmitoyltransferase I a*.

Fonte: O autor, 2015

Figura 25 - Possível mecanismo pelo qual o GW501516 poderia melhorar o dano renal causado pela dieta rica em frutose



Legenda: O GW501516 inibe as vias inflamatórias ativadas pelo AT1r apesar de causar uma diminuição da expressão desse receptor. Além disso, a melhora do quadro inflamatório resultou em uma melhora da fisiologia renal. Abreviações: HFru – *high-fructose*; ECA – enzima conversora de angiotensina; AT1r – receptor tipo 1 da angiotensina-II, *angiotensin-II type 1 receptor*; ERK 1/2 - quinase regulada por sinais extracelulares 1/2 , *extracellular signal-regulated kinase 1/2*; JNK - *c-Jun N-terminal kinase*; IL-1β – interleucina-1β; IL-6 – interleucina-6; Mcp-1, proteína quimioatratora de monócitos-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; Cd68 – *cluster of differentiation 68*.

Fonte: O autor, 2015

CONCLUSÃO

À luz do exposto, a dieta rica em frutose é um interessante modelo para o estudo da superativação do eixo ECA/AT1r sem o fenótipo de obesidade. O GW501516, um agonista PPAR- β/δ , pôde melhorar a inflamação do TAB, dano hepático e a inflamação renal no modelo proposto e poderia servir como uma possível opção terapêutica para o tratamento da superativação do eixo ECA/AT1r nesses órgãos, um quadro comum na síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

- Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51:1961-1971.
- ABESO. 2015. Mapa de obesidade. Disponível em: www.abeso.org.br Acesso em: 03/05/2015
- Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* 2008; 47:677-685.
- Adeghate E, Adem A, Hasan MY, Tekes K, Kalasz H. Medicinal Chemistry and Actions of Dual and Pan PPAR Modulators. *Open Med Chem J* 2011; 5:93-98.
- Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23:363-370.
- Alves ES, Haidar AA, Quadros CD, Carvalho DS, Morgan D, Rocha MS, Curi R, Carpinelli AR, Hirata AE. Angiotensin II-induced JNK activation is mediated by NAD(P)H oxidase in isolated rat pancreatic islets. *Regul Pept* 2012; 175:1-6.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008; 60:311-357.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 46:1319-1327.
- Austin S, St-Pierre J. PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 2012; 125:4963-4971.
- Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One* 2012; 7:e39837.
- Barroso E, Astudillo AM, Balsinde J, Vazquez-Carrera M. [PPARbeta/delta Activation prevents hypertriglyceridemia caused by a high fat diet. Involvement of AMPK and PGC-1alpha-Lipin1-PPARalpha pathway]. *Clin Investig Arterioscler* 2013; 25:63-73.
- Berger Ma. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53:409-435.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7:221-239.

Bjornstad P, Lanaspá MA, Ishimoto T, Kosugi T, Kume S, Jalal D, Maahs DM, Snell-Bergeon JK, Johnson RJ, Nakagawa T. Fructose and uric acid in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2015; 10.1007/s00125-015-3650-4.

Bojic LA, Telford DE, Fullerton MD, Ford RJ, Sutherland BG, Edwards JY, Sawyez CG, Gros R, Kemp BE, Steinberg GR, Huff MW. PPARdelta activation attenuates hepatic steatosis in Ldlr^{-/-} mice by enhanced fat oxidation, reduced lipogenesis, and improved insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2014; 55:1254-1266.

Brady PS, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR. Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs. *Biochem J* 1989; 260:93-100.

Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137:354-366.

Canto C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:98-105.

Carroll WX, Kalupahana NS, Booker SL, Siriwardhana N, Lemieux M, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:10.

Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11245-11250.

Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med* 2007; 120:442-447.

Chou CL, Pang CY, Lee TJ, Fang TC. Beneficial effects of calcitriol on hypertension, glucose intolerance, impairment of endothelium-dependent vascular relaxation, and visceral adiposity in fructose-fed hypertensive rats. *PLoS One* 2015; 10:e0119843.

Cicerchi C, Li N, Kratzer J, Garcia G, Roncal-Jimenez CA, Tanabe K, Hunter B, Rivard CJ, Sautin YY, Gaucher EA, Johnson RJ, Lanaspá MA. Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: evolutionary implications of the uricase loss in hominids. *FASEB J* 2014; 28:3339-3350.

Cirillo P, Sautin YY, Kanellis J, Kang DH, Gesualdo L, Nakagawa T, Johnson RJ. Systemic inflammation, metabolic syndrome and progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1384-1387.

Coll T, Barroso E, Alvarez-Guardia D, Serrano L, Salvado L, Merlos M, Palomer X, Vazquez-Carrera M. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *PPAR Res* 2010; 2010.

Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, Nyby MD, Makino H, Tuck ML. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2008; 26:269-275.

De Duve C, Beaufay H, Jacques P, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, De Coninck S. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1960; 40:186-187.

Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, Hofman A, Witteman JC. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31:361-362.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999; 274:32048-32054.

Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000; 275:36703-36707.

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582:68-73.

Dianat M, Veisi A, Ahangarpour A, Fathi Moghaddam H. The effect of hydro-alcoholic celery (*Apiumgraveolens*) leaf extract on cardiovascular parameters and lipid profile in animal model of hypertension induced by fructose. *Avicenna J Phytomed* 2015; 5:203-209.

DiNicolantonio JJ, Lucan SC. The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease. *Open Heart* 2014; 1:e000167.

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E227-237.

Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1988; 255:F563-573.

Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, Morris M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci* 2006; 130:41-50.

Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009; 25:818-827.

Ferrao FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World J Nephrol* 2014; 3:64-76.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134:1655-1669.

Fuentes P, Acuna MJ, Cifuentes M, Rojas CV. The anti-adipogenic effect of angiotensin II on human preadipose cells involves ERK1,2 activation and PPAR γ phosphorylation. *J Endocrinol* 2010; 206:75-83.

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58:2574-2582.

Fujisaka S, Usui I, Kanatani Y, Ikutani M, Takasaki I, Tsuneyama K, Tabuchi Y, Bukhari A, Yamazaki Y, Suzuki H, Senda S, Aminuddin A, Nagai Y, Takatsu K, Kobayashi M, Tobe K. Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology* 2011; 152:1789-1799.

Fukui T, Hirano T, Shiraishi Y, Nagashima M, Adachi M. Chronic insulin infusion normalizes blood pressure and the gene expressions of angiotensin II type 1 receptor in fructose-fed rats. *Hypertens Res* 2008; 31:127-133.

Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida D, Shimamoto K. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2003; 42:76-81.

Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens* 2000; 18:695-702.

Giraudi PJ, Becerra VJ, Marin V, Chavez-Tapia NC, Tiribelli C, Rosso N. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Exp Mol Pathol* 2015; 98:85-92.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001; 25:386-401.

Glendinning JI, Breinager L, Kyrillou E, Lacuna K, Rocha R, Sclafani A. Differential effects of sucrose and fructose on dietary obesity in four mouse strains. *Physiol Behav* 2010; 101:331-343.

Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Kowallick B, Huss S, Linhart M, Mazar IG, Gortzen J, Vogt A, Schildberg FA, Gonzalez-Carmona MA, Wojtalla A, Kramer B, Nattermann J, Siegmund SV, Werner N, Furst DO, Laleman W, Knolle P, Shah VH,

Sauerbruch T, Trebicka J. Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology* 2014; 60:334-348.

Gustafsson D, Unwin R. The pathophysiology of hyperuricaemia and its possible relationship to cardiovascular disease, morbidity and mortality. *BMC Nephrol* 2013; 14:164.

Ham SA, Yoo T, Hwang JS, Kang ES, Lee WJ, Paek KS, Park C, Kim JH, Do JT, Lim DS, Seo HG. Ligand-activated PPARdelta modulates the migration and invasion of melanoma cells by regulating Snail expression. *Am J Cancer Res* 2014; 4:674-682.

Harding JW, Cook VI, Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, Hall KL, Stobb JW, Swanson GN, Coleman JK, Wright JW, et al. Identification of an AII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain Res* 1992; 583:340-343.

Harrington WW, C SB, J GW, N OM, J GB, D CL, W RO, M CL, D MI. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res* 2007; 2007:97125.

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:225-238.

Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1038-1044.

Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 1998; 95:749-758.

Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol* 2011; 55:227-228.

Jameel F, Phang M, Wood LG, Garg ML. Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation. *Lipids Health Dis* 2014; 13:195.

Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspas MA. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* 2013; 62:3307-3315.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116:1784-1792.

Kanbay M, Solak Y, Dogan E, Lanaspas MA, Covic A. Uric acid in hypertension and renal disease: the chicken or the egg? *Blood Purif* 2010; 30:288-295.

Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, Wamsley A, Sheikh-Hamad D, Lan HY, Feng L, Johnson RJ. Uric acid stimulates monocyte

chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41:1287-1293.

Kanno K, Tazuma S, Chayama K. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl(4). *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308:177-183.

Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, Harima M, Suzuki H, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Naringenin ameliorates daunorubicin induced nephrotoxicity by mitigating AT1R, ERK1/2-NFkappaB p65 mediated inflammation. *Int Immunopharmacol* 2015; 28:154-159.

Kell KP, Cardel MI, Bohan Brown MM, Fernandez JR. Added sugars in the diet are positively associated with diastolic blood pressure and triglycerides in children. *Am J Clin Nutr* 2014; 100:46-52.

Kemmerer M, Finkernagel F, Cavalcante MF, Abdalla DS, Muller R, Brune B, Namgaladze D. AMP-Activated Protein Kinase Interacts with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta to Induce Genes Affecting Fatty Acid Oxidation in Human Macrophages. *PLoS One* 2015; 10:e0130893.

Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11:1041-1064.

Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390:285-289.

Kushiyama A, Tanaka K, Hara S, Kawazu S. Linking uric acid metabolism to diabetic complications. *World J Diabetes* 2014; 5:787-795.

Lanaspa MA, Cicerchi C, Garcia G, Li N, Roncal-Jimenez CA, Rivard CJ, Hunter B, Andres-Hernando A, Ishimoto T, Sanchez-Lozada LG, Thomas J, Hodges RS, Mant CT, Johnson RJ. Counteracting roles of AMP deaminase and AMP kinase in the development of fatty liver. *PLoS One* 2012a; 7:e48801.

Lanaspa MA, Sanchez-Lozada LG, Cicerchi C, Li N, Roncal-Jimenez CA, Ishimoto T, Le M, Garcia GE, Thomas JB, Rivard CJ, Andres-Hernando A, Hunter B, Schreiner G, Rodriguez-Iturbe B, Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid stimulates fructokinase and accelerates fructose metabolism in the development of fatty liver. *PLoS One* 2012b; 7:e47948.

Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes Rev* 2009; 10 Suppl 1:24-33.

Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20:4699-4707.

- Li X, Li J, Lu X, Ma H, Shi H, Li H, Xie D, Dong L, Liang C. Treatment with PPAR δ agonist alleviates non-alcoholic fatty liver disease by modulating glucose and fatty acid metabolic enzymes in a rat model. *Int J Mol Med* 2015; 10.3892/ijmm.2015.2270.
- Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:251-264.
- Liu J, Gong H, Zhang ZT, Wang Y. Effect of angiotensin II and angiotensin II type 1 receptor antagonist on the proliferation, contraction and collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121:161-165.
- Liu J, Wang R, Desai K, Wu L. Upregulation of aldolase B and overproduction of methylglyoxal in vascular tissues from rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Res* 2011a; 92:494-503.
- Liu S, Hatano B, Zhao M, Yen CC, Kang K, Reilly SM, Gangl MR, Gorgun C, Balschi JA, Ntambi JM, Lee CH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ / β in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem* 2011b; 286:1237-1247.
- Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 2008; 57:3239-3246.
- Luo H, Wang X, Wang J, Chen C, Wang N, Xu Z, Chen S, Zeng C. Chronic NF- κ B blockade improves renal angiotensin II type 1 receptor functions and reduces blood pressure in Zucker diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14:76.
- Ma JJ, Monsivais D, Dyson MT, Coon JS, Malpani S, Ono M, Zhao H, Xin H, Pavone ME, Kim JJ, Chakravarti D, Bulun SE. Ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor β / δ modulates human endometrial cancer cell survival. *Horm Cancer* 2013; 4:358-370.
- Ma LJ, Corsa BA, Zhou J, Yang H, Li H, Tang YW, Babaev VR, Major AS, Linton MF, Fazio S, Hunley TE, Kon V, Fogo AB. Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300:F1203-1213.
- Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int* 2014; 2014:263897.
- Marcus Y, Shefer G, Stern N. Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 378:1-14.
- Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, Gjorgoski I, Jankulovski N. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidation in senescent rat erythrocytes. *Physiol Res* 2015.

Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 110:371-385.

Moreira de Macedo S, Guimaraes TA, Feltenberger JD, Sousa Santos SH. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides* 2014; 62:189-196.

Muscelli E, Natali A, Bianchi S, Bigazzi R, Galvan AQ, Sironi AM, Frascerra S, Ciociaro D, Ferrannini E. Effect of insulin on renal sodium and uric acid handling in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9:746-752.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009; 48:1-26.

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E1180-1190.

Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* 2006; 536:182-191.

Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Roncal C, Perez-Pozo SE, Johnson RJ, Nakagawa T. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298:F712-720.

Nguyen S, Choi HK, Lustig RH, Hsu CY. Sugar-sweetened beverages, serum uric acid, and blood pressure in adolescents. *J Pediatr* 2009; 154:807-813.

Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2012; 23:203-208.

O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 366:135-151.

Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2005; 258:395-410.

Oudot C, Lajoix AD, Jover B, Rugale C. Dietary sodium restriction prevents kidney damage in high fructose-fed rats. *Kidney Int* 2013; 83:674-683.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86:747-803.

Prieto MA, Bettaieb A, Lanzi CR, Soto VC, Perdicaro DJ, Galmarini CR, Haj FG, Miatello RM, Oteiza PI. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in

fructose-fed rats and in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2015; 10.1002/mnfr.201400631.

Quinones Galvan A, Natali A, Baldi S, Frascerra S, Sanna G, Ciociaro D, Ferrannini E. Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol* 1995; 268:E1-5.

Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2052-2059.

Reaven GM. The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? *J Intern Med* 2011; 269:127-136.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.

Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, Dos Santos RA, Simoes e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4:787-803.

Riserus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Fang Z, Hegde P, Richards D, Sarov-Blat L, Strum JC, Basu S, Cheeseman J, Fielding BA, Humphreys SM, Danoff T, Moore NR, Murgatroyd P, O'Rahilly S, Sutton P, Willson T, Hassall D, Frayn KN, Karpe F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* 2008; 57:332-339.

Roberts LD, Hassall DG, Winegar DA, Haselden JN, Nicholls AW, Griffin JL. Increased hepatic oxidative metabolism distinguishes the action of Peroxisome proliferator-activated receptor δ from Peroxisome proliferator-activated receptor γ in the ob/ob mouse. *Genome Med* 2009; 1:115.

Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007; 45:778-788.

Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2013; 123:2764-2772.

Sack MN, Finkel T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4.

Salvado L, Serrano-Marco L, Barroso E, Palomer X, Vazquez-Carrera M. Targeting PPAR β / δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16:209-223.

Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T, Kang DH, Feig DI, Franco M, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Hormonal and cytokine effects of uric acid. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15:30-33.

Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Bautista-Garcia P, Soto V, Avila-Casado C, Vega-Campos IP, Nakagawa T, Zhao L, Franco M, Johnson RJ. Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:F710-718.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8258-8263.

Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RA. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* 2008; 57:340-347.

Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimaraes AL, de Paula AM, Campagnole-Santos MJ, Alvarez-Leite JI, Bader M, Santos RA. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept* 2012; 178:64-70.

Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E1195-1205.

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 2003; 42:664-668.

Schreurs M, Kuipers F, van der Leij FR. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2010; 11:380-388.

Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci* 2013; 14:21873-21886.

Serrano-Marco L, Rodriguez-Calvo R, El Kochairi I, Palomer X, Michalik L, Wahli W, Vazquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPAR-beta/delta) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes* 2011; 60:1990-1999.

Sharma N, Li L, Ecelbarger CM. Sex differences in renal and metabolic responses to a high-fructose diet in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 10.1152/ajprenal.00403.2014:ajprenal 00403 02014.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 1993; 32:5598-5604.

Shoham DA, Durazo-Arvizu R, Kramer H, Luke A, Vupputuri S, Kshirsagar A, Cooper RS. Sugary soda consumption and albuminuria: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *PLoS One* 2008; 3:e3431.

Sodhi K, Puri N, Kim DH, Hinds TD, Stechschulte LA, Favero G, Rodella L, Shapiro JI, Jude D, Abraham NG. PPARdelta binding to heme oxygenase 1 promoter prevents angiotensin II-induced adipocyte dysfunction in Goldblatt hypertensive rats. *Int J Obes (Lond)* 2014; 38:456-465.

Soyal SM, Nofziger C, Dossena S, Paulmichl M, Patsch W. Targeting SREBPs for treatment of the metabolic syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36:406-416.

Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009; 50:1094-1104.

Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, Santha M, Adeli K. Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. *Hepatology* 2009; 50:77-84.

Suh YG, Jeong WI. Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17:2543-2551.

Sui X, Church TS, Meriwether RA, Lobelo F, Blair SN. Uric acid and the development of metabolic syndrome in women and men. *Metabolism* 2008; 57:845-852.

Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36:4-12.

Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 2010; 90:23-46.

Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 2010; 26:1044-1049.

Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4:14.

Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M, Horiuchi M. Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens* 2008; 21:206-212.

Tong Q, Wu L, Gao Q, Ou Z, Zhu D, Zhang Y. PPARbeta/delta Agonist Provides Neuroprotection by Suppression of IRE1alpha-Caspase-12-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in the Rotenone Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 2015; 10.1007/s12035-015-9309-9.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:339-352.

Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV. Is there any progress in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2011; 2:1-5.

Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirono Y, Tateno T, Sugiyama T, Hirata Y. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rat preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E771-778.

Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006; 4:107-110.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.

Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354:141-148.

Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem* 2004; 37:1-9.

Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY)* 2012; 4:3-12.

Vieira FO, Leal Vde O, Stockler-Pinto MB, Barros Ade F, Borges NA, Lobo JC, Mafra D. Fructose intake: is there an association with uric acid levels in nondialysis-dependent chronic kidney disease patients? *Nutr Hosp* 2014; 31:772-777.

Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14:3380-3400.

Weiss R, Kaufman FR. Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2:S310-316.

Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3737-3755.

Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011; 83:124-133.

Yang X, Kume S, Tanaka Y, Isshiki K, Araki S, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Koya D, Haneda M, Sugaya T, Li D, Han P, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. GW501516, a PPARdelta agonist, ameliorates tubulointerstitial inflammation in proteinuric kidney disease via inhibition of TAK1-NFkappaB pathway in mice. *PLoS One* 2011; 6:e25271.

Yiannikouris F, Karounos M, Charnigo R, English VL, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA. Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302:R244-251.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243:H941-947.

Zarzuelo MJ, Jimenez R, Galindo P, Sanchez M, Nieto A, Romero M, Quintela AM, Lopez-Sepulveda R, Gomez-Guzman M, Bailon E, Rodriguez-Gomez I, Zarzuelo A, Galvez J, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor-beta activation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2011; 58:733-743.

Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:166.

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/071/2012** sobre **“Inibição da atividade de NF-kB através de PPAR-beta-gama modula o sistema renina angiotensina local do tecido adiposo branco em modelo de dieta rica em frutose”**, sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **21/12/2012**. Este certificado expira em **21/12/2016**.

Rio de Janeiro, 21 de Dezembro de 2012.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8
/ass

ANEXO B – Premiação no II Encontro Discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
 Centro Biomédico
 Departamento de Anatomia
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental

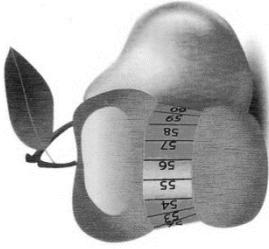
Certificado de Premiação

Certifico que o trabalho intitulado AGONISTA GW501516 ESTABILIZA O EIXO ECA/ANGIO-II/ATIR NO TECIDO ADIPOSE BRANCO DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM FRUTOSE de autoria MAGLIANO DC, ORNELLAS F, PENNA-DE-CARVALHO A , VÁZQUEZ-CARRERA M, MANDARIM-DE-LACERDA CA, AGUILA MB foi premiado com primeiro lugar na forma de pôster no II Encontro Discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, realizado no Auditório do Pavilhão Mario Franco - UERJ, nos dias 17 e 18 de setembro de 2014.

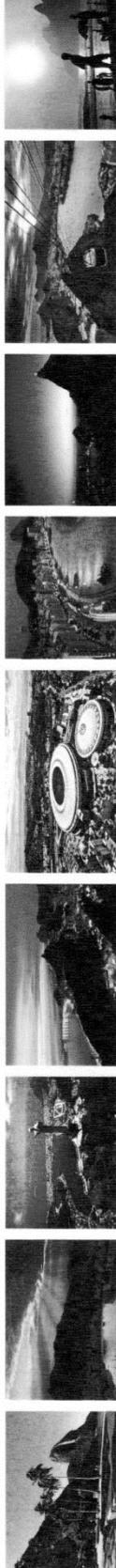
 Representante discente Mestrado	 Coordenador do BHEx Representante discente Doutorado
---	--

ANEXO C – Premiação no XVI Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica

**XVI CONGRESSO
BRASILEIRO DE OBESIDADE
E SÍNDROME METABÓLICA**



30/04, 01 e 02/05/2015 - Windsor Barra - Rio de Janeiro



Certificado

O PÔSTER TÍTULO CURTA ADMINISTRAÇÃO DE GW501516 MELHORA DANO HEPÁTICO CAUSADO POR DIETA RICA EM FRUTOSE EM CAMUNDONGOS: NA ÁREA TEMÁTICA ÁREA BÁSICA DE AUTORIA DE MAGLIANO DC* E COAUTORIA DE PENNA-DE-CARVALHO A, SOUZA-MELLO V, VÁZQUEZ-CARRERA M, MANDARIM-DE-LACERDA CA, ÁGUILA MB DA INSTITUIÇÃO UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UERJ - BRASIL) e UNIVERSIDADE DE BARCELONA (UB - ESPANHA), RECEBEU O PRÊMIO DE MELHOR TRABALHO NA ÁREA BÁSICA.

Alexander Benchiñol

Dr. Alexander Benchiñol
Presidente do XVI Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica

Walmir Coutinho

Dr. Walmir Coutinho
Presidente da Comissão Científica

ANEXO D – Entrevista para a revista “Evidências em Obesidade” da Associação Brasileira de Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica

• • • • Especial CBOSM 2015

O melhor trabalho da área clínica foi "Mudança cognitiva em obesos com comprometimento cognitivo leve submetidos à perda intencional de peso", de autoria da geriatra Nídia Horie. Na área básica, o estudo vencedor foi "Curta administração de GW501516 melhora dano hepático causado por dieta rica em frutose em camundongos", de D'Angelo Magliano

O premiado da área básica, D'Angelo Magliano, trabalhou com uma droga que ainda não é um medicamento (GW501516), mas que vem sendo estudada para se tornar uma opção de tratamento de obesidade e síndrome metabólica. Em seu estudo, Magliano conseguiu reduzir a esteatose hepática não-alcoólica em ratos ao administrar GW501516, que

agiria como modulador da ação do PPAR Beta. Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma, conhecidos como PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) são um grupo de proteínas receptoras nucleares que funcionam como fatores de transcrição que regulam a homeostase glicêmica e lipídica e são ativados principalmente por substâncias endógenas,

como ácidos graxos. Três tipos de PPAR foram já identificados: alfa, gama e delta (beta). Enquanto alvos terapêuticos no PPAR-gama (glitazonas) e alfa (fibratos) já são bem estabelecidos, o beta, alvo de estudo de Magliano, ainda é menos conhecido e estudado, mas parece tão promissor quanto, como nos revela seu trabalho. Estudos anteriores já sugeriam ser esse PPAR associado a um maior catabolismo de gorduras no músculo, coração e tecido adiposo, além de melhorar a sensibilidade à insulina. O estudo de Magliano agrega novos dados para o melhor conhecimento de sua ação.

O próximo passo, segundo Magliano, é induzir esteatose *in vitro*, tanto em hepatócitos quanto adipócitos, e fazer o tratamento para realmente descobrir onde este medicamento poderia estar bloqueando os malefícios da frutose ou de outros nutrientes que podemos colocar no meio de cultura. Buscar futuros tratamentos para a esteatose é de fundamental importância pela elevada prevalência e risco de progressão para cirrose hepática.

A comissão julgadora dos trabalhos científicos submetidos ao CBOSM 2015 foi formada por: Alexandre Hohl, Erika Paniago, Fábio Trujillo, Miguel Madeira e Rodrigo Moreira.



Na área básica, o estudo vencedor foi desenvolvido por D'Angelo Magliano

ANEXO E – Artigo publicado na revista Endocrine, Abril de 2015

Endocrine
DOI 10.1007/s12020-015-0590-1

ORIGINAL ARTICLE

Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system

D'Angelo C. Magliano^{1,2,3} · Aline Penna-de-Carvalho¹ · Manuel Vazquez-Carrera^{2,3} · Carlos A. Mandarim-de-Lacerda¹ · Marcia B. Aguila¹

Received: 22 September 2014 / Accepted: 30 March 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract High activation of the angiotensin-converting enzyme (ACE)/(angiotensin-II type 1 receptor) AT1r axis is closely linked to pro-inflammatory effects and liver damage. The aim of this study was to evaluate the effects of the short-term administration of GW501516 on pro-inflammatory markers in white adipose tissue (WAT) and hepatic stellate cells (HSCs), lipogenesis and insulin resistance in the liver upon high-fructose diet (HFru)-induced ACE/AT1r axis activation. Three-month-old male C57Bl/6 mice were fed a standard chow diet or a HFru for 8 weeks. Then, the animals were separated randomly into four groups and treated with GW501516 for 3 weeks. Morphological variables, systolic blood pressure, and plasma determinations were analyzed. In the WAT, the ACE/AT1r axis and pro-inflammatory cytokines were assessed, and in the liver, the ACE/AT1r axis, HSCs, fatty acid oxidation, insulin resistance, and AMPK activation were evaluated. The HFru group displayed a high activation of the ACE/AT1r axis in both the WAT and liver; consequently, we detected inflammation and liver damage. Although

GW501516 abolished the increased activation of the ACE/AT1r axis in the WAT, no differences were found in the liver. GW501516 blunted the inflammatory state in the WAT and reduced HSC activation in the liver. In addition, GW501516 alleviates damage in the liver by increasing the expression of the genes that regulate beta-oxidation and decreasing the expression of the genes and proteins that are involved in lipogenesis and gluconeogenesis. We conclude that GW501516 may serve as a therapeutic option for the treatment of a highly activated ACE/AT1r axis in WAT and liver.

Keywords ACE/AT1r axis · GW501516 · Hepatic stellate cells · AMPK · Inflammation

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by the association of several risk factors, including hypertension, insulin resistance (IR), and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), in addition to low-grade chronic inflammation [1, 2]. Changes in dietary habits are among the main contributors to the growing global prevalence of MetS. These changes are characterized by an increased intake of fat and refined sugars, particularly fructose. [3, 4]. This monosaccharide is present in small quantities in fruits and honey; however, since the introduction of fructose as a sweetener in foods and beverages in 1967, its consumption has risen quickly and has contributed to the increased incidence of MetS [5, 6].

The renin-angiotensin system (RAS) is classically described as an important regulator of blood pressure, but recent studies have shown that RAS plays a key role in MetS development. Experimental evidence suggests that in

✉ Carlos A. Mandarim-de-Lacerda
mandarim@uerj.br;
<http://www.lmmc.uerj.br>

¹ Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

² Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

³ Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ANEXO F – Submissão de artigo à revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA)

Title: GW501516 ameliorates a fructose-induced inflammation independent of AT1r downregulation in the kidney

Article Type: Regular Paper

Corresponding Author: Prof. Marcia Barbosa Aguila

All Authors: D'Angelo C Magliano; Isabele Bringhenti; Vanessa Souza-Mello; Carlos A Mandarin-de-Lacerda, M.D., Ph.D.; Marcia Barbosa Aguila, R.D., Ph.D.

Dear Prof. Aguila,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in BBA - General Subjects.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/bbagen/>

Your username is: marciaguila@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/bbagen/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

No additional authors will be added post submission unless editors receive agreement from all authors and detailed information is supplied as to why the author list should be amended.

Thank you for submitting your work to BBA - General Subjects. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,

Editorial Office

BBA - General Subjects