



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline Fernandes da Silva

**Efeitos do LDT409 sobre o metabolismo energético e remodelamento
hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose**

Rio de Janeiro

2021

Aline Fernandes da Silva

Efeitos do LDT409 sobre o metabolismo energético e remodelamento hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza-Mello

Rio de Janeiro

2021

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

S586 Silva, Aline Fernandes da.
Efeitos do LDT409 sobre o metabolismo energético e remodelamento hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose / Aline Fernandes da Silva. – 2021.
104 f.
Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa Souza Mello

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

1. Esteatose hepática – Teses. 2. Estresse do Retículo Endoplasmático.
3. Frutose - Teses. 4. Metabolismo energético - Teses. I. Mello, Vanessa Souza.
II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.391

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Aline Fernandes da Silva

Efeitos do LDT409 sobre o metabolismo energético e remodelamento hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2021.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza-Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Egberto Gaspar de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Anderson Junger Teodoro

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

A toda a minha família por todo amor a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me darem a vida e todo o suporte para vivê-la. Ao meu pai, Alexandre, que é pra mim um grande exemplo de garra e sempre me estimulou a estudar e me incentivou a ir além. Minha mãe, Ivone, que com todo o seu afeto me acolhe sem hesitar diante de todos os dilemas e dores da vida, sendo sempre meu porto seguro. Aos meus irmãos por me ensinarem a partilhar. As minhas tias e tios que sempre foram como pais pra mim. Aos meus primos e primas, por toda a irmandade.

A todas as minhas amigas pelas alegrias vivenciadas e por me permitirem saber que não estou só, em especial à Camilla, Luna, Ju, Keron, Adriana, Virgínia, Hediane, e Carol, que me motivou a encarar essa oportunidade e trilhar pela pesquisa.

A Vanessa, minha querida orientadora. O maior exemplo de liderança que eu já tive e se não fosse por toda a sua benevolência, eu certamente não chegaria até aqui.

A Daiana, minha mais perfeita dupla! Como eu me sinto agraciada por ter tido você, a sua cumplicidade e generosidade. Eu não conseguiria colocar em palavras a importância do seu companheirismo nessa caminhada. Gratidão por toda a sua confiança em mim, por ser minha calma nos momentos de desespero. Por toda ajuda e pela sua amizade. Tenho muito orgulho dessa nossa conquista.

A Fabiane Martins, por todo o tempo dedicado e extenso conhecimento compartilhado.

A Aline Penna, pela leveza, calma, assistência dentro e fora do laboratório, e por nunca deixar de me lembrar de viver um dia de cada vez.

A Flavia, por toda a doçura, paciência e altruísmo, e a todas as Vanessetes pela convivência e parceria genuína, em especial à Fernanda, por toda a sua dedicação como IC.

Aos colegas de laboratório, por toda a ajuda de sempre.

A todos os meus professores ao longo da vida, que muito de si deixaram em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, à Prof^a. Dr^a. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda e a todos os professores e professoras do programa de pós-graduação e funcionários do LMMC.

Aos técnicos e funcionários da UERJ.

Às agências de fomento à pesquisa científica.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para esse trabalho.

Que o hoje seja hoje. Sem o peso de ontem ou a ansiedade pelo amanhã. Apenas hoje.

Isabela Freitas

RESUMO

SILVA, Aline Fernandes da. *Efeitos do LDT409 sobre o metabolismo energético e remodelamento hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose*. 2021. 104f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O consumo excessivo de frutose está correlacionado à doença hepática gordurosa não-alcoólica (DGHNA) e à resistência à insulina (RI). A RI compromete a homeostase do retículo endoplasmático, produzindo efeito pró-inflamatório pelo desequilíbrio de vias metabólicas reguladas por fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferação peroxissomal (PPARS). Este estudo buscou avaliar os efeitos do LDT409 (agonista duo PPAR-alfa/gama) sobre o remodelamento estrutural hepático, com ênfase no metabolismo energético e estresse do retículo endoplasmático hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose. Trinta e dois camundongos C57BL/6 machos (três meses de idade) foram designados aleatoriamente para receber uma dieta controle ou uma dieta rica em frutose por dez semanas. Então, os grupos foram subdivididos em quatro grupos para iniciar o tratamento por cinco semanas: C, CT (dieta C + LDT409), HFRU, HFRUT (dieta HFRU + LDT409). O tratamento foi incorporado às dietas na dose de 40 mg/kg de massa corporal. Os animais HFRU apresentaram aumento de gordura intra-abdominal, RI, redução da beta-oxidação, e aumento da gliconeogênese, lipogênese e fibrogênese. Os dados avaliados sugerem ativação das células estreladas hepáticas após 17 semanas de dieta HFRU. Por outro lado, o tratamento foi capaz de normalizar estes parâmetros, exercendo efeitos anti-esteatóticos e impedindo a ativação das células estreladas nesse modelo a partir de uma redução da lipogênese e controle do estresse do retículo endoplasmático concomitante ao aumento da beta-oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias dos hepatócitos. O LDT409 pode representar um potencial nutracêutico para controle da DHGNA, a qual não possui até o presente momento um fármaco direcionado ao seu controle.

Palavras-chave: Frutose. PPAR. LDT409. Esteatose hepática. Estresse do retículo endoplasmático.

ABSTRACT

SILVA, Aline Fernandes da. *Effects of LDT409 on hepatic energy metabolism and remodeling in high-fructose-fed mice*. 104f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Excessive fructose intake, present in ultra-processed foods, is correlated with non-alcoholic fatty liver disease (DGHNA) and insulin resistance (IR). IR compromises endoplasmic reticulum homeostasis, producing a pro-inflammatory effect due to the imbalance of metabolic pathways regulated by transcription factors, such as receptors activated by peroxisomal proliferation (PPARS). This study sought to evaluate the effects of LDT409 (PPAR-alpha / gamma duplex agonist) on hepatic structural remodeling, highlighting energy metabolism and hepatic endoplasmic reticulum stress in mice fed a high-fructose diet. Forty-six male C57BL / 6 mice (three months old) were randomly assigned to receive either a control diet or a high-fructose diet for ten weeks. Then, groups were subdivided into four groups to start the treatment for five weeks: C, CT (diet C + LDT409), HFRU, HFRU (diet HFRU + LDT409). The treatment was added to the diets at a dose of 40 mg/kg of body weight. HFRU animals showed increased intra-abdominal fat, IR, reduced beta-oxidation and increased gluconeogenesis, lipogenesis, and fibrogenesis. The evaluated data suggest activation of hepatic stellate cells after 17 weeks of HFRU diet. On the other hand, the treatment normalized these parameters, exerting anti-steatotic effects and preventing the activation of the stellate cells in this model by reducing lipogenesis and controlling the endoplasmic reticulum stress concomitant with the increase in beta-oxidation of fatty acids in hepatocyte mitochondria. LDT409 may represent a potential nutraceutical for NAFLD, which does not currently have a drug directed to its control. Excessive dietary intake of saturated fat causes an imbalance in energy homeostasis, which is one of the leading causes for the development of obesity and, consequently, adipocyte dysfunction. Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) plays a paramount role in the browning of white adipocytes, as well as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP-4i) can enhance thermogenesis. This study sought to evaluate the association of the PPAR-alpha agonist (WY14643) and DPP-4i (linagliptin) on the subcutaneous white adipose tissue remodeling and thermogenesis induction in mice fed a high-fat diet. Forty male C57BL/6 mice (three months old) were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% energy as lipids) or a high-fat diet (HF, 50% energy as lipids) for twelve weeks. Then, each group was subdivided into two groups to start the treatment that lasted five weeks: C, CT (C diet plus PPAR- α agonist and DPP-4i), HF, and HFT (HF diet plus PPAR- α agonist and DPP-4i). Drugs were mixed to the diets at a dose of 2.5 mg/kg body mass for WY14643 and 15 mg/kg body mass for linagliptin. The animals in the HF group showed overweight, oral glucose intolerance, adipocyte hypertrophy, substantial accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat. Conversely, the treatment was able to normalize these parameters, besides increasing the body temperature, the presence of multilocular adipocytes (beige), and the high expression of thermogenic markers genes. These observations point to the activation of the browning cascade in the subcutaneous white adipose tissue concomitant with noticeable anti-inflammatory effects and endoplasmic reticulum stress alleviation. Hence, the association of the PPAR- α agonist with DPP-4i emerges as a promising target for obesity control through the induction of beige cells and adaptive thermogenesis.

Keywords: Fructose. PPAR. LDT409. Hepatic steatosis. Endoplasmic reticulum stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Lóbulos hepáticos.....	17
Figura 2 –	Metabolismo lipídico hepático.....	22
Figura 3 –	Bioquímica da frutose.....	26
Figura 4 –	Frutólise e os perigos diretos e indiretos.....	28
Figura 5 –	Ilustração do mecanismo de ativação de PPAR e principais efeitos fisiológicos da ativação das diferentes isoformas.....	35
Figura 6 –	Primeira ilustração do Cajueiro, de André Thevet, 1558.....	40
Figura 7 –	Pseudofruto e fruto da <i>Anacardium Occidentale</i> e partes.....	41
Figura 8 –	Desenho Experimental.....	48
Figura 9 –	Evolução da massa corporal e ingestão hídrica.....	55
Figura 10 -	Glicemia de Jejum, insulina plasmática e FIRI.....	57
Figura 11 –	Triacilglicerol e colesterol (plasmáticos e hepáticos).....	58
Figura 12 –	Pressão arterial sistólica.....	59
Figura 13 –	Fotomicrografias representativas da estrutura hepática ao final do experimento	60
Figura 14 –	Genes marcadores do estresse do reticulo endoplasmático	61
Figura 15 -	Genes marcadores da gliconeogênese	62
Figura 16 –	Genes marcadores da beta-oxidação e lipogênese hepática.....	63
Figura 17 -	Genes marcadores pró-fibrogênicos e ativação das células estreladas.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional das dietas experimentais.....	49
Tabela 2 –	Detalhamento dos primers utilizados.....	52
Tabela 3 –	Comportamento alimentar.....	55
Tabela 4 –	Distribuição de gordura.....	56
Tabela 5 –	Resultados do ANOVA de duas vias	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-Coa Carboxilase
ADP	Adenosina difosfato
AF-2	Activation function 2
AGL	Ácidos graxos livre
AGs	Ácidos graxos
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AP-1	Proteína ativadora 1
AST	Aspartato aminotransferase
ATF4	Fator de ativação de transcrição 4
ATP	Adenosina trifosfato
CEBP α	Proteínas estimuladoras de ligação CCAAT alfa
CEBP β	Proteínas estimuladoras de ligação CCAAT beta
CHH	Carcinoma hepatocelular
CHOP	Proteína homóloga à proteína ligante estimuladora de CCAAT
CHREBP	Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos
CNSL	<i>Cashew</i> nutshell liquid
CPT-1a	Carnitina palmitoil transferase-1 ^a
CT	Colesterol total
DAMPs	Padrão molecular associado a danos
DBD	DNA Bindind Domain
DHAP	Di-hidroxiacetona
DHGAM	Doença hepática associada ao metabolismo
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoolica
DIO	Obesidade induzida por dieta
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
EHNA	Esteatohepatite não-alcoolica
eIF2 α	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 α
EPA	Eicosapentaenóico

ERAD	Sistema de degradação associado ao RE
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F1P	Frutose-1-fosfato
FOXO-1	Subfamília-1 da proteína O contendo a caixa da forquilha
G6Pase	Glicogênio 6-fosfatase
GLUT2	Transportador de glicose 2
GLUT5	Transportador de glicose 5
GLUT8	Transportador de glicose 8
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	High density lipoprotein
HFCS	<i>High-fructose corn syrup</i>
HFRU	<i>High-fructose</i>
HSCs	Células estreladas hepáticas
IL18	Interleucina 18
IL1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase
IRE1	Proteína cinase dependente de inositol 1
JNK	Janus quinase
KHK	Frutoquinase
LADER	Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas
LCC	Líquido da casca da castanha
LC-CoA	Acil-CoA de cadeia longa
LDL	Low density lipoprotein
LMMC	Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares
MAFLD	Metabolic associated fatty liver disease
MC	Massa corporal
MG	Metilglioxal
MMI	Membrana mitocondrial interna
MTP	Proteína microssômica de transferência de triglicerídeos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido

NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
Pdgfr- beta	Receptor <i>beta</i> do fator de crescimento derivado de plaquetas
Pepck	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PERK	Proteína cinase ativada pelo retículo endoplasmático
PGA1	Prostaglandina A1
PGC-1 α	Coativador gama-1 alfa ativado por proliferador peroxissômico
PGD2	Prostaglandina D2
PPARS	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPRES	Elementos responsivos ao PPAR
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RNs	Receptores nucleares
RXR	Receptor retinóico X
SM	Síndrome metabólica
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis 1c
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Tecido adiposo marrom
TLR4	Receptor toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TT	Triacilglicerol total
TZD	Tiazolidenedionas
UFF	Universidade Federal Fluminense
UPR	Unfolded Protein Response
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa
WY14643	Agonista purificado do PPAR-alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Fígado	17
1.2	Metabolismo energético	18
1.3	Doença hepática gordurosa não alcoólica	20
1.4	Frutose	23
1.4.1	<u>Absorção da frutose</u>	24
1.4.2	<u>Frutólise</u>	25
1.4.3	<u>Frutose x DHGNA</u>	26
1.5	Modelo experimental	29
1.6	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma	29
1.6.1	<u>Estrutura dos PPARs</u>	30
1.6.2	<u>Mecanismo de ação</u>	31
1.6.3	<u>PPAR-alfa (α)</u>	32
1.6.4	<u>PPAR-beta/delta (β/δ)</u>	33
1.6.5	<u>PPAR-gama (γ)</u>	34
1.7	Agonistas PPARs como agentes terapêuticos	35
1.7.1	<u>Agonistas PPAR-alfa (α)</u>	36
1.7.2	<u>Agonistas PPAR-beta/delta (β/δ)</u>	36
1.7.3	<u>Agonistas PPAR-gama (γ)</u>	37
1.7.4	<u>Agonistas duo PPAR-alfa-gama (α/γ)</u>	38
1.8	<i>Anacardium Occidentale</i> (Cajueiro)	39
1.8.1	<u>Líquido da casca da castanha de caju</u>	39
1.9	LDT 409	42
2	OBJETIVOS	46
2.1	Objetivo geral	46
2.2	Objetivos específicos	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1	Animais e dieta	47
3.2	Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética	49

3.3	Eutanásia	50
3.4	Análises bioquímicas e FIRI	50
3.5	Microscopia de luz	51
3.6	PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	51
3.7	Análise estatística	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Comportamento alimentar e massa corporal	54
4.2	Distribuição de gorduras	55
4.3	Dosagens bioquímicas	56
4.4	Pressão arterial sistólica	58
4.5	Microscopia de luz	59
4.6	PCR quantitativa em tempo real	60
4.6.1	<u>Expressão gênica: Marcadores de estresse do retículo endoplasmático</u>	60
4.6.2	<u>Expressão gênica: Marcadores da glicoenogênese</u>	61
4.6.3	<u>Expressão gênica: Marcadores da beta-oxidação e lipogênese hepática</u>	62
4.6.4	<u>Expressão gênica: Marcadores pró-fibrogênicos e ativação das células estreladas</u>	64
4.7	Two-way ANOVA	65
5	DISCUSSÃO	69
	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética	103
	ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo de revisão como primeira autora (minor revision no European Journal of Nutrition)	104

INTRODUÇÃO

A transição nutricional, caracterizada por mudanças nos padrões dietéticos da população, propiciou um aumento do consumo domiciliar de alimentos nos últimos anos, sobretudo de frutose oriunda da inclusão de alimentos processados na rotina alimentar, independentemente da renda familiar (1, 2). A frutose, também conhecida como levulose ou açúcar da fruta é um monossacarídeo constituinte da sacarose (β -D-Fructofuranosil α -D-glicopiranosida) e de outros polímeros como a inulina (3) e está presente predominantemente nas bebidas adoçadas, sucos, refrigerantes e sob a forma de xarope de milho de alto poder adoçante e baixo custo comercial, sendo empregado em larga escala pela indústria atualmente (4, 5).

Durante seu metabolismo, há um aumento da produção de ácido lático, gliconeogênese e lipogênese *de novo* (4). Por desenvolver a curto ou a longo prazo dislipidemia, aumentos de colesterol, triacilgliceróis (6, 7), disfunção endotelial e hipertensão arterial (8), o consumo excessivo de frutose vem sendo considerado preocupante e alvo de estudos (9, 10). Pesquisas recentes já mostram que há aumento das adipocinas inflamatórias e redução da adiponectina após a ingestão de uma dieta rica em frutose, tendo ainda o aumento de MCP-1, que pode induzir à ativação e infiltração de macrófagos no tecido adiposo e está correlacionada à doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) e à resistência à insulina (RI) (11-13); as quais associadas correlacionam-se positivamente com o aumento da inflamação sistêmica (14). Estudos também observaram efeitos deletérios da ingestão de frutose na expressão de marcadores de beta-oxidação e biogênese mitocondrial no fígado (14, 15), o que compromete a homeostase de outras organelas como o retículo endoplasmático (16), produzindo efeito pró-inflamatório pelo desequilíbrio de vias reguladas por fatores de transcrição, dentre estes, destacam-se os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARS) (17).

Os PPARs atuam regulando a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipídios e carboidratos, e existem três isoformas do receptor que são expressas no fígado: PPAR-alfa, PPAR-beta e PPAR-gama (18, 19). A expressão aumentada de PPAR-gama é uma característica do fígado esteatótico, estimulando a transcrição de genes lipogênicos, aumentando a síntese e o armazenamento de lipídios (20, 21). Por outro lado, o PPAR-alfa exerce um papel fundamental na ativação da beta-oxidação, além de aumentar a densidade de mitocôndria por área de tecido hepático, sendo assim um alvo promissor para o combate da DHGNA (22, 23) e na proteção contra a progressão para a esteatohepatite não-alcoólica

(EHNA), já que a inflamação lobular hepática e a disfunção mitocondrial exercem papel ímpar (24, 25). Os agonistas PPAR, por atuarem na regulação de vias metabólicas envolvidas na gênese e na progressão da DHGNA para EHNA, têm grande potencial de atuação no tratamento de desordens do metabolismo hepático (17, 21, 26).

Nesse contexto, foram desenvolvidos alguns fármacos cujo mecanismo de ação se baseia no estímulo a PPARs, como os fibratos e as glitazonas, com eficácia no tratamento da dislipidemia e da resistência à insulina, respectivamente. No entanto, o uso prolongado destes agonistas acarreta efeitos colaterais negativos, relacionados à alta afinidade dos fármacos para PPAR-gama, como sugerido em alguns estudos (27, 28), sendo esta uma condição limitante para o uso de tais medicamentos.

O LDT409 é um agonista duo PPAR-alfa/gama, obtido por semissíntese do cardanol saturado a partir do principal resíduo industrial do beneficiamento da castanha do caju, e que apresenta ativação parcial e balanceada de ambas isoformas PPARs (alfa e gama) como diferencial, uma vez que exclui os efeitos adversos advindos da ativação total do PPAR-gama. O poder antioxidante de compostos químicos derivados do líquido da casca da castanha de caju foi relatado anteriormente, sendo atribuídos à elevada participação do cardol e cardanol presente no material utilizado (29, 30). Contudo, não há relatos dos efeitos do LDT409 sobre o tratamento da DGHNA ou sobre um possível papel protetor na progressão DHGNA-EHNA em animais alimentados com dieta rica em frutose.

1 REVISÃO DE LITERATURA

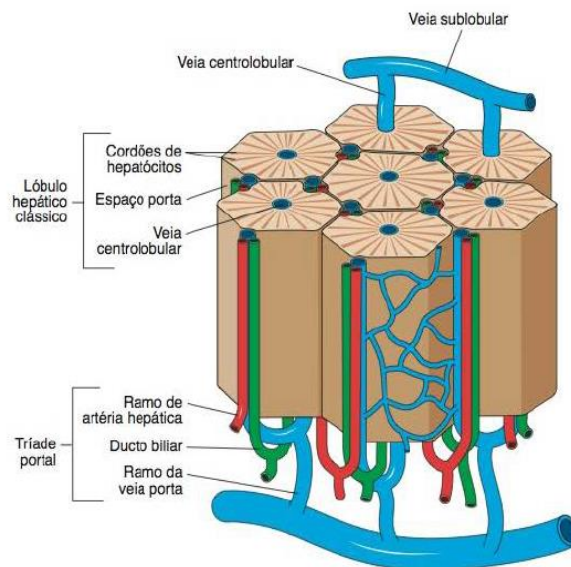
1.1 Fígado

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano (31). Tem funções endócrinas e exócrinas, peso médio de 1500g e localiza-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, sendo dividido em quatro lobos (o esquerdo, o direito, o quadrado e o caudado) que se dividem em lóbulos. É recoberto pela Cápsula de Glissom, uma camada de tecido conjuntivo (32).

Com relação à vascularização, recebe 80% de sangue rico em nutrientes e pouco oxigenado, advindo da veia porta. Os outros 20% de sangue que se caracteriza por ser arterial e rico em oxigênio, é fornecido pela artéria hepática. Deste modo todo o sangue oriundo do sistema digestório e do baço drena para o fígado, o alcançando através do hilo, também conhecido como *porta hepatis* ou fissura transversa, com origem na qual se ramificam profusamente até que o sangue arterial e venoso se misture na ampla rede capilar hepática dos lóbulos, constituída pelos sinusóides hepáticos (32).

Dos sinusoides, o sangue drena para a veia central e desta para as veias hepáticas, as quais drenam para a veia cava inferior. Uma vez nos sinusóides, o sangue entra em íntimo contato com a principal célula parenquimatosa do lóbulo hepático, o hepatócito (32)

Figura 1 – Lóbulos hepáticos



Legenda: Desenho esquemático que ilustra os lóbulos hepáticos do fígado. Cada lóbulo é composto por cordões de hepatócitos que são entremeados por capilares sinusóides (não representados nessa

ilustração), os quais desembocam em uma veia centrolobular. Na periferia do lóbulo há tecido conjuntivo, no qual se encontra o espaço porta, que contém a tríade portal (arteríola, vênula e ducto biliar). Há também vasos linfáticos e nervos (não representados). Adaptada de Bourne G: Na Introduction to Funcional Histology, Churchill, 1953.

Fonte: (33)

Os hepatócitos são as células mais importantes do fígado. Se organizam em cordões entremeados pelos sinusóides, e se estendem do limite do lóbulo, onde se localizam os espaços porta, até o vaso central nomeado veia centrolobular. Geralmente apresentam de 20 a 30 μm de diâmetro, e constituem cerca de 2/3 da massa do órgão. São células poliédricas que se relacionam com o canalículo biliar, com a membrana de hepatócitos vizinhos e com o sinusóide, sendo que nesse caso existe um espaço entre estas duas estruturas, que é denominado espaço perissinusoidal ou espaço de Disse, e nele são regularmente encontrados 4 tipos de células, dentre elas os macrófagos, os quais neste órgão são denominados células de Kupffer; e as células estreladas armazenadoras de lipídio, também conhecidas como células de Ito (32).

Por ser uma célula multifuncional, todas as organelas citoplasmáticas estão bem representadas nos hepatócitos. As mitocôndrias são numerosas, cerca de 1000 ou mais em cada célula, e de particular importância em função das variadas atividades metabólicas do hepatócito, como a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) sob a ação de enzimas mitocondriais (32).

A organização funcional e fluxo sanguíneo único do fígado permitem ao órgão controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas irão e como irão entrar na circulação sistêmica. Além disso, permitem que ele realize inúmeras atividades vitais, essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, excretoras, secretoras, de síntese e de armazenamento (33).

1.2 Metabolismo energético

O metabolismo energético compreende o conjunto de reações químicas que produzem a energia necessária para a realização das funções vitais através da quebra ou ligação das moléculas (anabolismo ou catabolismo). Para que essas reações ocorram, são necessários substratos energéticos, que são provenientes da alimentação. As principais fontes de energia utilizadas nessas reações são os carboidratos, os lipídios e as proteínas.

Em resumo, vias anabólicas necessárias para a biossíntese consumirão adenosina trifosfato (ATP) para gerar nicotinamida adenina dinucleótido (NADH); e vias catabólicas

irão gerar ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) + Pi (fosfato inorgânico) e oxidar NADH em NAD⁺ pela glicólise e ciclo de Krebs ou fosforilação oxidativa (34).

Em condições normais, a regulação do metabolismo de lipídios e de carboidratos acontece graças ao trabalho conjunto do fígado e demais órgãos chave como tecido adiposo e músculo. A eficiência dessa relação é essencial para a manutenção do metabolismo, e este controle é, em grande extensão, dependente da regulação eficiente desse ciclo, que para ocorrer precisa do funcionamento adequado destes órgãos.

Usualmente a glicose é estocada na forma de glicogênio, e seu excesso é convertido no fígado a ácidos graxos (AGs), que são usados para a síntese da principal fonte de estoque energético do organismo: os triacilgliceróis (TAG) (19); e a gordura que é absorvida pela mucosa intestinal e transportada na circulação na forma de quilomicrons, tem seus triglicérides depositados no tecido adiposo. Este, por sua vez, libera a gordura na forma de ácidos graxos livres (AGL) para serem utilizados, mediante estímulos hormonais (35). Estes AGL chegam até o fígado através de três vias: Hidrólise de TAG em glicerol e AGL (lipólise), que ocorre no interior do tecido adiposo; através de fontes alimentares; e da lipogênese *de novo* (DNL).

A DNL é caracterizada como uma via de conversão de fontes glicídicas para a síntese de AGs (36), modulada por fatores de transcrição ativadas pela insulina, um dos principais hormônios responsáveis pela regulação da expressão da proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis 1c (SREBP-1c) (37). A SREBP-1c é um membro da família SREBP que controla a regulação transcricional de genes lipogênicos (38). A sua ativação leva à conversão do piruvato em AGL no fígado e a um aumento de genes que ativam a síntese e captação de colesterol, AGs, TAG e fosfolipídios (39). Assim como a ingestão aumentada de lipídios pela dieta, o processo da DNL também provoca um estado de lipotoxicidade, predispõe à RI e ao desenvolvimento de alterações hepáticas (40, 41).

Em condições normais, após a entrada nos hepatócitos, os destinos possíveis para os AGL são: serem beta-oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP), ou serem convertidos novamente em triacilgliceróis acoplados às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e transportados ao tecido adiposo. Porém, perturbações nessas vias podem acarretar o armazenamento destes AGL no fígado (42, 43).

A beta-oxidação de AGs ocorre nas mitocôndrias, e produz Acetil-CoA a partir dos AGs. Em condições basais, para iniciar este processo, a molécula de acil-CoA de cadeia longa (LC-CoA) é transportada para a membrana mitocondrial interna (MMI) via carnitina palmitoil transferase-1a (CPT-1a), onde é beta oxidada (39, 44). Porém, na presença de concentrações

elevadas de glicose e AGL, a enzima CPT-1a é inibida em consequência do aumento de Malonil-CoA, intermediário na síntese de AGs. Com isso, ocorre aumento da ácido graxo sintase, enzima limitante na biossíntese de AGs e catalisadora do último passo desta via. Quando este processo é inibido, ocorre aumento na concentração de LC-CoA no citoplasma, o que reduz a expressão de genes que podem retardar a beta-oxidação hepática (45, 46).

Sendo assim, quando por diversos motivos os níveis de glicose ou lipídios hepáticos excedem as necessidades energéticas, sua capacidade oxidativa e/ou de exportar lipoproteínas hepáticas é excedida, lipídios são depositadas no parênquima hepático na forma de triacilgliceróis (47).

1.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica

A DHGNA, do inglês “*Non-alcoholic fatty liver disease*” (NAFLD), caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado, surge da síntese hepática e esterificação de AGL em triacilgliceróis aumentados, e decréscimo do transporte destes para fora do hepatócito, com um desvio dos mecanismos de lipólise em favor da lipogênese (48, 49). É a causa mais comum das doenças crônicas do fígado no mundo (50), com prevalência de aproximadamente 25% na população adulta e 50-70% em pacientes com obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (51), e pode ser considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM).

A DHGNA é assintomática e pode ser inicialmente identificada por alterações nas enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT) (52). É definida como um espectro patológico do fígado, que é iniciado por esteatose (gordura hepática excedendo 5% do peso total do órgão ou presença de gordura em mais de 5% dos hepatócitos quando em avaliação microscópica) e que pode progredir para EHNA, definida pela concomitância de processo inflamatório (53); além de necroinflamação e fibrose (54), podendo cursar com carcinoma hepatocelular (CHH), e em casos mais graves morte (55, 56), devido seu amplo espectro de alterações histológicas.

Os mecanismos moleculares que causam a progressão da doença no fígado para formas mais graves ainda não são totalmente compreendidos, mas um mecanismo sugerido envolve o estado inflamatório devido à superprodução de ERO, lipotoxicidade e aumento de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina β (IL1 β) e ativação das células de Kupffer (57-59). Em pacientes acometidos pela

EHNA, os níveis séricos e hepáticos das citocinas estão elevados e correlacionam-se com a severidade histológica da doença, além de promover a resistência à insulina (60-64).

Estudos sugerem ainda que a disfunção mitocondrial na EHNA pode ativar o estresse do retículo endoplasmático (ERE) com a ativação da UPR (do inglês “Unfolded Protein Response”), desencadeando assim a morte e inflamação dos hepatócitos pela via de sinalização dependente da proteína homóloga à proteína ligante estimuladora de CCAAT (CHOP) (65).

Além disso, o aumento do acúmulo de [colesterol](#) mitocondrial também está relacionado com a progressão da esteatose para a EHNA. Estudos relataram encontrar apoptose e depleção mitocondrial em camundongos que apresentaram elevação do mesmo (57, 58).

O entendimento da patogênese da DHGNA passa pelo reconhecimento da interação metabólica que o fígado mantém com os diversos tecidos corporais, além da base genética e fatores ambientais como o microbioma intestinal e a dieta, de maneira que o acúmulo de lipídios no fígado, deriva-se fundamentalmente do excesso de energia disponível no organismo (66, 67). Este excesso é frequentemente causado por ingestão energética excessiva, a qual obesidade e outros distúrbios metabólicos associados (68).

Como visto anteriormente, o fígado recebe AGL através de três vias, e estudos recentes demonstram que todas as fontes de entrada contribuem significativamente para os estoques lipídicos intra-hepáticos, sendo que ~ 59% dos triglicerídeos intra-hepáticos nos pacientes com DHGNA deriva de AGs circulantes, enquanto ~ 26% deriva do DNL e ~ 15% da gordura da dieta (69). No entanto, quando os pacientes com DHGNA foram comparados com controles pareados sem esteatose, não houve diferença significativa no fluxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado. Por outro lado, a DNL foi três vezes maior na DHGNA em comparação aos indivíduos controle (70), sugerindo que o aumento do DNL é uma característica fisiopatológica distinta do DHGNA humano.

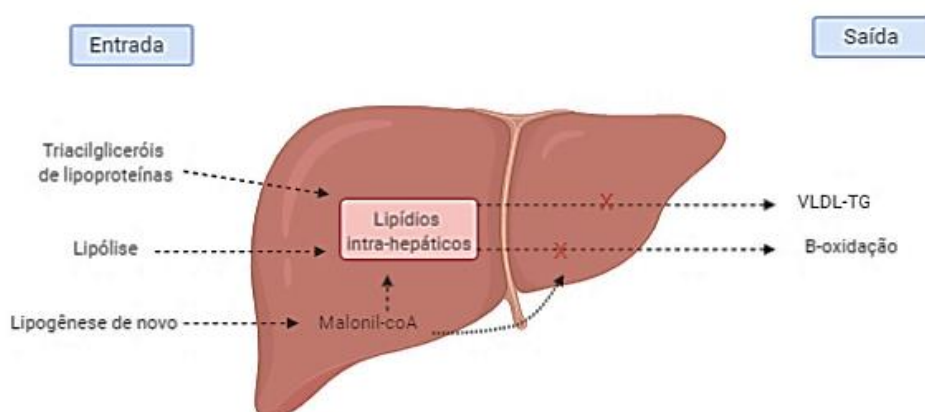
Sabe-se hoje que existem inúmeros agentes responsáveis pela progressão da DHGNA por diversas moléculas lipídicas já terem se mostrado capazes de induzir inflamação no tecido hepático: diferentes tipos de ácidos graxos, colesterol e seus metabólitos oxidados, ceramidas e diacilgliceróis (48). Além de lipídios, carboidratos também têm sido associados ao desenvolvimento de DHGNA, sendo a frutose mais citotóxica do que a glicose para este modelo. Nesse contexto, fígado com esteatose é mais susceptível às agressões em geral do que o fígado normal (48). Entretanto, as recomendações para tratar a DHGNA abrangem

mudanças no estilo de vida, e não há tratamento farmacológico que tenha sido aprovado para tratar esta condição (71).

Atualmente, vem sendo usado como alternativa medicamentos que levam à redução de massa corporal e aliviam concomitantemente a esteatose hepática (72, 73), pois reduções na adiposidade e resistência à insulina através de dieta e exercício são a base do tratamento da DHGNA (74-76).

Vários ensaios clínicos estão em andamento para desenvolver novas terapias contra a DHGNA (77), uma vez que os tratamentos atuais com foco nas modificações do estilo de vida têm sido amplamente aprovados. O objetivo final do tratamento é inibir o desenvolvimento fibrótico que pode eventualmente levar à cirrose e CHC (77).

Figura 2 – Metabolismo lipídico hepático



Nota: As três principais vias que contribuem para o acúmulo de lipídios intra-hepático: importação de triacilgliceróis pela LDL; lipólise; lipogênese de novo. As duas vias que contribuem para a saída dos lipídios são a β -oxidação e a exportação pela VLDL. A perturbação dessas vias pode resultar no acúmulo de lipídios intra-hepáticos e desenvolvimento da esteatose hepática.

Fonte: A autora, 2021.

Recentemente foi definido em consenso internacional que a nomenclatura da DHGNA (NAFLD no inglês) fosse atualizada para MAFLD (*metabolic associated fatty liver disease*, ainda sem equivalente no português). Dessa forma, é proposto que o diagnóstico da doença seja baseado na presença de alterações metabólicas, e não ausência de outras condições, como associação ao uso do álcool, apesar de considerar que em alguns casos haja uma contribuição importante do mesmo para a doença. É importante considerar ainda que outras doenças hepáticas podem coexistir em associação à MAFLD (78).

1.4 Frutose

A frutose, também conhecida como levulose ou açúcar da fruta, é um monossacarídeo presente em frutas e vegetais, constituinte da sacarose (β -D-Fructofuranosil α -D-glicopiranosida) e de outros polímeros, como a inulina (3). Suas principais fontes naturais na dieta humana são frutas, mel e a sacarose. Ela pertence ao grupo das hexoses e se assemelha à glicose pela fórmula química $C_6H_{12}O_6$, diferindo apenas pela posição do grupo carbonila. É um subproduto do xarope de milho que possui baixo custo, tem sabor agradável e longa vida útil. Por isso, é utilizado como adoçantes em alimentos e bebidas e seu uso aumentou em comparação com a sacarose nos últimos anos (49, 79).

A sacarose era utilizada como o principal adoçante pela indústria alimentícia, porém, foram desenvolvidas técnicas que permitiram a extração do amido de milho e sua conversão em frutose através da isomerização enzimática. O Xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS, da sigla em inglês “*High-fructose corn syrup*”) pode estar presente em bebidas açucaradas, pães, doces, temperos prontos, entre outros, sendo esta a principal forma de ingestão excessiva da frutose pela população (4).

No início da década de 70 nos Estados Unidos, a ingestão de HFCS era de 0,4% das calorias totais ingeridas através de adoçantes, chegando a 42% na década de 2000 (80). Embora nos últimos anos a ingestão mundial de açúcares de adição tenha estabilizado, o consumo ainda representa aproximadamente 17% (75 gramas por dia), o que ainda é bem acima do limite de 10% recomendado. Entre adolescentes e adultos jovens o consumo de açúcar é ainda maior, especialmente o proveniente de bebidas, sendo responsável por quase 25% da ingestão total (81). Esse crescente aumento no consumo de açúcares refinados em alimentos e bebidas e o uso comercial extensivo do HFSC está sendo relacionado ao aumento expressivo da prevalência de distúrbios metabólicos como DM2 hipertensão arterial sistêmica (HAS), gota, dislipidemia, SM (82), DHGNA (83, 84), mesmo sem provocar aumento significativo de massa corporal (MC) (85).

Sob ingestão alimentar normal, que de forma isolada para um adulto saudável, pode variar de menos de 5 gramas a mais de 50 gramas (86), a maior parte da frutose ingerida é metabolizada pelos enterócitos do intestino delgado, principalmente em glicose, que é então entregue à circulação sistêmica. Porém, dietas com alto teor de sacarose e frutose sobrecarregam a capacidade do intestino de metabolizar tudo e, nessas condições, uma quantidade significativa da frutose vai ser desviada para metabolização hepática e, em menor grau, por outros órgãos.

As concentrações de frutose no plasma periférico são tipicamente cerca de 0,04 mM, podendo aumentar acentuadamente 10 vezes após o consumo de frutose e retornar aos níveis de jejum dentro de 2 horas. Essa depuração rápida é mediada em grande parte pela extração eficiente realizada pelo fígado. Enquanto o fígado extrai apenas 15% a 30% da carga oral de glicose, é capaz de extrair 70% da carga oral de frutose (3).

1.4.1 Absorção da frutose

A frutose é absorvida passivamente no lúmen do intestino delgado em um processo independente de energia via transportador de glicose 5 (GLUT5), o principal transportador de frutose em mamíferos (87, 88). Esse transportador é expresso no lúmen apical voltado para a borda da mucosa intestinal e as membranas basolaterais de enterócitos (89, 90), e tem sua capacidade de absorção limitada (91). A frutose é transportada para fora dos enterócitos em direção à circulação sistêmica pelo transportador de glicose 2 (GLUT2), que acreditava-se ser o transportador primário do monossacarídeo localizado no pólo basolateral (92-94), até que fosse descoberto também o transportador de glicose 8 (GLUT8), que mais recentemente demonstrou mediar o transporte (95).

Dados mais atuais mostraram que a alimentação rica em frutose é capaz de induzir uma via de regulação do transporte de frutose no intestino mediada por GLUT5 (96). Em consonância, foi mostrado que a proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos (ChREBP), fator de transcrição que responde a nutrientes intracelulares, também regula a expressão intestinal do transportador GLUT5, e é necessária para a tolerância sistêmica à frutose (97).

A maior parte da frutose ingerida é inicialmente metabolizada pelo próprio intestino delgado, onde mais de 90% do monossacarídeo é ativamente metabolizado em glicose e lactato, e exportada via sangue portal (98), onde é então absorvida pelo fígado, que apesar de ser considerado o local primário para o metabolismo da frutose, só então a recebe, com quantidades limitadas escapando do metabolismo hepático e entrando na circulação sistêmica.

A passagem da frutose não metabolizada através do intestino delgado para o fígado depende da dose ingerida. Baixas doses são quase totalmente eliminadas pelo intestino, mas como já mencionado, altas doses superam a capacidade intestinal de absorção e eliminação (99), e a frutose extra é digerida pelo fígado e pela microbiota colônica (98), podendo impor uma carga osmótica no intestino delgado distal e no cólon, o que pode contribuir para

sintomas gastrointestinais (99). Além disso, a frutose pode servir como substrato para a fermentação bacteriana, levando à formação de gases e outros metabólitos bacterianos, que podem afetar a motilidade intestinal e causar vários sintomas, como dor abdominal e inchaço (100).

1.4.2 Frutólise

O metabolismo da frutose difere da glicose na reação catabólica, no mecanismo regulatório e nos metabólitos, por ignorar etapas regulatórias significativas.

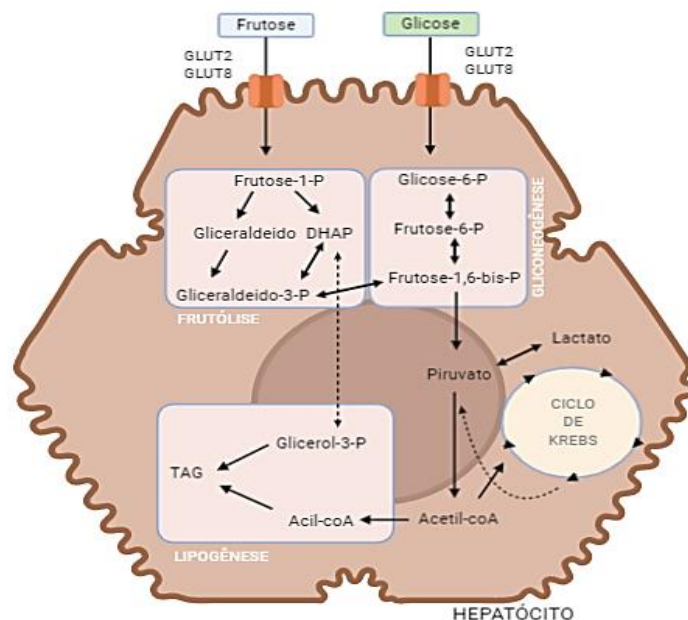
Ao entrar nas células epiteliais intestinais via GLUT5, a frutose é rapidamente fosforilada em frutose-1-fosfato (F-1-P) pela frutoquinase (KHK, cetohecoquinase). KHK é uma hexoquinase caracterizada pela ausência de inibição por *feedback*, então não é regulada pelo estado energético celular, resultando em depleção de fosfato intracelular e geração rápida de ácido úrico devido à ativação da AMP desaminase (101). Tal situação conduz a um desequilíbrio entre adenosina monofosfato (AMP) e ATP, aumentando a razão AMP/ATP, e gerando um alto nível de estresse metabólico (102). O destino deste AMP é definido por duas enzimas: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a xantina desidrogenase. Quando a xantina desidrogenase é mais ativa que a AMPK, o AMP é convertido em ácido úrico, que elevado é um bom preditor para o desenvolvimento de comorbidades (103-108).

A F-1-P, por sua vez, é diretamente clivado em unidades de três carbonos, fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) e gliceraldeído, pela aldolase B. O gliceraldeído, ao contrário dos produtos da aldolase na glicólise, deve ser fosforilado em gliceraldeído-3-fosfato pela trioquinase (TrioK). DHAP e gliceraldeído-3-fosfato são idênticos aos intermediários glicolíticos e entram na via gliconeogênica para a glicose ou são posteriormente catabolizados através da via glicolítica inferior para o lactato e liberados na circulação (109, 110).

O excesso de frutose gera ainda um aumento da produção de acetil-Coa que acaba excedendo a capacidade do ciclo tricarboxílico de metabolizá-la. Este excesso será utilizado no citoplasma como um substrato para a DNL. Essa molécula é convertida pela Acetil-Coa Carboxilase (ACC) em malonil-Coa, que inibe a β -oxidação mitocondrial por inibir a CPT1a, enzima necessária para a translocação de ácidos graxos nas mitocôndrias. Dessa forma, há ainda uma maior disponibilidade de ácidos graxos para a produção de triacilgliceróis (111, 112).

Os metabólitos primários e subprodutos da frutólise incluem glicose, lactato, AGL, ceramida, TG, VLDL, ácido úrico e metilglioxal (MG). Esses metabólitos são superproduzidos e liberados na circulação sistêmica, sendo considerados fatores perigosos diretos. Além disso, há uma subsequente produção de citocinas inflamatórias, adiponectina, leptina e endotoxinas, que são perigos indiretos da via frutolítica. Dessa forma, a frutose e seus metabólitos causam direta e/ou indiretamente hiperuricemia, resistência à insulina, inflamação crônica, secreção de endotoxinas, autofagia, distúrbio do apetite, entre outras alterações, com potencial para afetar a homeostase energética e perturbar as funções dos tecidos e órgãos extra-hepáticos (113).

Figura 3 – Bioquímica da frutose



Legenda: Metabolismo da frutose no hepatócito. Abreviações: Di-hidroxiacetona fosfato (DHAP); Triacilglicerol (TAG)

Fonte: A autora, 2021.

1.4.3 Frutose x DHGNA

Os metabólitos da via frutolítica atuam como indutores de alterações hepatotóxicas, pois além da frutólise produzir rapidamente precursores de gliconeogênese e lipogênese, seus metabólitos também atuam como reguladores dos principais fatores de transcrição que controlam essas vias. Conseqüentemente, a ingestão exagerada de frutose aumenta os níveis plasmáticos de triacilgliceróis (114, 115), promovem DNL hepática (116, 117), estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e inflamação, que que

juntos induzem o acúmulo de lipídios intra-hepáticos na DHGNA e contribuem para a progressão e gravidade da mesma (70, 108, 118-120).

A frutose atua como lipogênica por estimular o aumento da secreção de VLDL (121, 122) e suprimir agudamente a oxidação hepática de ácidos graxos (123). Esse desequilíbrio envolve três possíveis mecanismos: a diminuição na degradação de lipídios devido a uma menor expressão de PPAR-alfa, um fator transcricional importante para a oxidação de ácidos graxos que atua regulando genes como CPT1a (124, 125); Menor expressão do coativador gama-1alfa ativado por proliferador peroxissômico (PGC-1 α), uma proteína responsável pela biogênese mitocondrial (126); A diminuição na depuração lipídica devido a uma menor expressão da proteína microssômica de transferência de triacilgliceróis (MTP) (125), envolvidos na produção de VLDL por inibição da CPT1a. Com isso, há ainda mais disponibilidade de AGs para a produção de triacilgliceróis, que pode ser incorporado nas gotículas lipídicas, levando à esteatose.

Além de fornecer substrato para a lipogênese, o consumo crônico de frutose aumenta a regulação transcricional da DNL ao ativar os principais fatores de transcrição, incluindo SREBP1c e ChREBP, independentemente da sinalização da insulina hepática (127-130), ambas atuando como fator chave de transcrição implicado na progressão da NAFLD (131). O ChREBP também pode suprimir a oxidação de ácidos graxos através da regulação negativa de enzimas como o CPT1a, em parte por antagonizar o receptor ativado por PPAR-alfa, que veremos em detalhes a seguir (132, 133).

Além dos fatores acima mencionados, estudos apontam o ERE como um mecanismo que favorece a progressão da DHGNA para EHNA (134). A mitocôndria se comunica dinamicamente com outras organelas celulares, como o retículo endoplasmático (RE). Logo, a exposição prolongada a AGLs gera perturbações na mitocôndria, desencadeando estresse oxidativo e desordem na homeostase do RE (16). O consumo excessivo da frutose faz com que haja uma maior demanda do retículo endoplasmático devido a um aumento do metabolismo lipídico para a produção de VLDL, o que leva esse retículo ao estresse e à resposta à proteína mal dobrada (UPR) com o intuito de restaurar a homeostase do RE, mas que pode promover alterações da cadeia respiratória e desacoplar a fosforilação oxidativa com excesso de produção de ERO (135, 136) e apoptose (137, 138), contribuindo para a progressão da esteatose hepática e resistência à insulina.

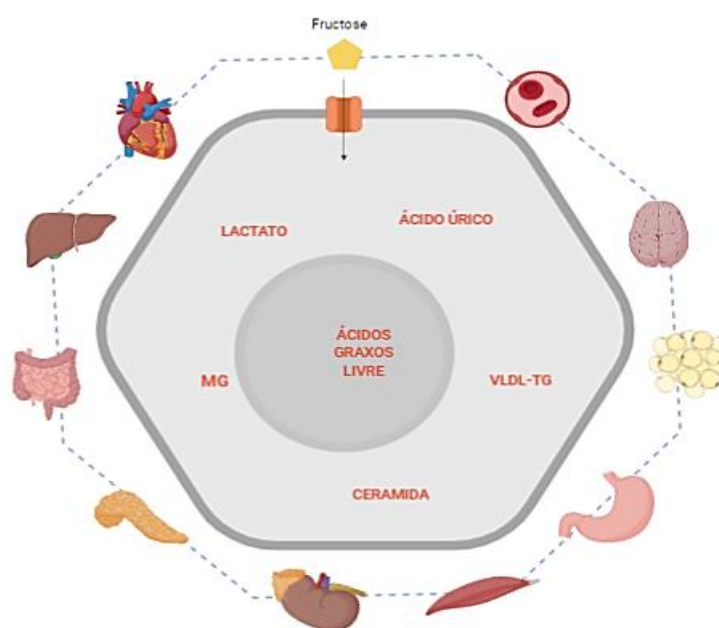
O ERE também pode influenciar negativamente no metabolismo lipídico hepático por ativar a DNL através das vias: proteína cinase ativada por RNA (PKR) (PERK) / fator de iniciação da tradução eucariótica 2 α (eIF2 α) / fator de ativação da transcrição 4 (ATF4), e

limitando a formação e secreção de VLDL, via proteína cinase dependente de inositol 1 (IRE1), induzindo ainda a resistência à insulina no tecido adiposo e hepático (139).

O acúmulo ectópico de gordura no fígado aumenta a vulnerabilidade dos hepatócitos ao estresse celular, iniciando um processo inflamatório (140). Paralelamente, o estresse celular pode ser exacerbado pela inflamação induzida pela produção de mediadores como citocinas, hepatocinas, derivados lipídicos, conhecidos coletivamente como DAMPs (padrão molecular associado a danos) que sinalizam e contribuem para alterações sistêmicas (141); e ativação do receptor toll-like 4 (TLR4) nas células Kupffer, já que foi demonstrado que a frutose promove a síntese de ácidos graxos saturados, como o palmitato, que são capazes de ativar os receptores TLR4 no fígado (142). A ativação da via TLR4 / óxido nítrico sintase indutível (iNOS) / Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NFκB) induz estresse oxidativo nos hepatócitos através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α pelas células Kupffer.

Além do ERE promover ativação de vias que produzem efeito pró-inflamatório pela ativação da via dos fatores e transcrição Janus quinase (JNK), NF-κB, ligada à resistência hepática à insulina pelo aumento dos seus genes alvo TNF-α e IL-6 (143). Tanto as enzimas envolvidas na oxidação hepática dos lipídios quanto a via NF-κB são reguladas por alguns fatores de transcrição, a partir de mecanismos de transativação ou transrepressão gênica. Dentre esses fatores de transcrição destacam-se os PPARs (17, 144).

Figura 4- Frutólise e os perigos diretos e indiretos



Nota: Os metabólitos do catabolismo da frutose e seus efeitos adversos agem nas funções dos tecidos e órgãos de forma direta e/ou indireta. A frutose é metabolizada principalmente no fígado, produzindo glicose,

lactato, triacilglicerol, ácido graxo livre, ácido úrico e MG, cujos altos níveis atuam como perigos indiretos, levando ao estresse oxidativo, inflamação crônica, disfunção endotelial, autofagia e aumento da permeabilidade intestinal, agravando ainda mais a DHGNA. Abreviações: metilglioxal (MG); lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-TG).

Fonte: A autora, 2021.

1.5 Modelo experimental

Apesar dos modelos animais apropriados serem cruciais no estudo da patogênese e terapia das doenças metabólicas, ainda não é claro que critério deve ser utilizado na definição do modelo animal “ideal”. Do ponto de vista científico e ético, a exigência mínima é a de que não apenas o fenótipo, mas também a patogênese da condição do animal se assemelhe à doença humana em estudo (145). A dieta é também um dos fatores importantes na nutrição animal experimental. A dieta rica em frutose é amplamente utilizada para avaliação de alterações metabólicas, inclusive hepáticas, em modelos animais da cepa C57Bl/6 (146-150), sendo seu uso crônico capaz de alterar o metabolismo de carboidratos, levando à hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia (85, 151), aumento da pressão arterial (152), sendo associada ao aumento da concentração sanguínea de IL-1 β , IL-6, Interleucina 18 (IL-18), TNF. Destaca-se também a diminuição das concentrações de adiponectina e a elevação de leptina plasmática (153).

1.6 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

Os PPARs fazem parte da superfamília de receptores nucleares (RNs). A maior parte das células que compõe o organismo têm a capacidade de modificar padrões de expressão de genes em resposta a alterações extracelulares, o que gera influência na síntese proteica. O primeiro passo da expressão gênica é a transcrição, sendo esta uma importante etapa regulatória, visto que nessa fase que ocorre a indução ou inibição da expressão de determinado gene. Dessa forma, a maioria dos eventos regulatórios de produção de proteínas ocorre na iniciação da transcrição, podendo esta produção ser controlada ainda em outras etapas, como no processamento e transporte de RNA, tradução, degradação de RNAm e atividade proteica. Os RNs atuam diretamente no processo de transcrição, comandando a

expressão de genes-alvo que regulam inúmeros processos biológicos como reprodução, desenvolvimento e metabolismo geral (154, 155).

Existem três diferentes isoformas de PPAR já descritas na literatura: PPAR-alfa, PPAR-beta/delta e PPAR-gama (156), codificados por genes distintos, expressos de forma diferente nos tecidos, com especificidade ligante e atividade regulatória metabólica distintas (157-160). O nome PPAR é devido ao fato da ativação de PPAR-alfa, o primeiro da classe dos receptores descoberto, promover a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores (161). Os peroxissomos são organelas responsáveis por reações de oxidação ligadas ao metabolismo energético e sua propagação resulta hepatomegalia e carcinogênese em roedores (162).

Os PPARs são considerados sensores metabólicos, que de acordo com os sinais lipídicos atuam na expressão gênica promovendo ações relacionadas à homeostase lipídica e energética, especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (163, 164). Além das ações metabólicas têm sido demonstrados ainda importantes efeitos em processos fisiológicos como desenvolvimento e diferenciação celular, processos inflamatórios, entre outros (164, 165).

Os RNs podem residir no citoplasma ou núcleo celular, e mostram diferenças com base na ausência de ligantes. Os PPARs estão localizados no citoplasma na ausência de ligante ou no núcleo, onde formam heterodímeros obrigatórios com RXR (receptor retinoico X) ligado ao DNA. Quando há presença de um ligante para PPAR, ocorre uma mudança de conformação no receptor, que causa a remoção de proteínas e recrutamento de coativadores que promovem a expressão gênica (166).

1.6.1 Estrutura dos PPARs

Do ponto de vista estrutural, os PPARs possuem organização comum representada por regiões e domínios funcionais. A estrutura dos domínios são semelhantes entre os membros da família de receptores nucleares de reguladores de transcrição, e cada PPAR possui cinco diferentes domínios:

- a) uma região N-terminal, que possui função de ativação independente do ligante, composto pela região AF-1, sendo responsável pela interação com coativadores, correpressores, e outros fatores de transcrição;
- b) um domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês “DNA Binding Domain”), que atua no reconhecimento a elementos responsivos ao PPAR;
- c) uma região de dobradiça, Hinge, que atua como uma ponte entre DBD e o próximo domínio;
- d) o domínio de interação a ligantes (LBD, do inglês “Ligand Binding Domain”), que apresenta um sítio de interação para agonistas e antagonistas, e possui também a função de transativação 2, também chamada de AF-2 (do inglês “Activation function 2”);
- e) por último tem domínio C terminal (160, 167).

Com relação ao tamanho dos receptores, o comprimento e sequência de cada domínio variam entre os diferentes tipos de receptores nucleares. Junto à variação estrutural, também ocorrem variações de função. O PPAR-gama possui 468 resíduos de aminoácidos em sua estrutura, seguido do PPAR-alfa que possui 468, e do PPAR-beta/delta que possui 441 (168). A região DBD é a mais conservada entre os receptores nucleares.

1.6.2 Mecanismo de ação

Os PPARs podem exercer seus efeitos regulatórios sobre a transcrição gênica de três formas clássicas:

- a) transativação dependente do ligante, onde os PPARs podem ativar a transcrição de maneira dependente do ligante pela ligação direta do complexo heterodimerico PPAR-RXR ao elementos responsivos ao PPAR (PPREs) nos genes alvos. Sendo este um modelo classico de ação dos PPARS (169-171);
- b) repressão independente do ligante, onde o complexo PPAR-RXR pode se ligar ao elemento responsivo em genes-alvo na ausência de ligantes e recrutar complexos correpressores que medeiam a repressão ativa de genes;

- c) transrepressão dependente do ligante, onde os PPARs reprimem a transcrição por antagonizar as ações de outros fatores de transcrição, tais como NF-kb e proteína ativadora 1 (AP-1) após a ligação do agonista (165, 172). Este mecanismo impossibilita a ativação de genes inflamatórios (173, 174).

Diversas moléculas possuem a capacidade de ativar essa superfamília de receptores, principalmente os hormônios lipofílicos, ácidos graxos e seus metabólitos, ácidos biliares, oxisteróis, e ligantes sintéticos (17, 175, 176).

Cada isotipo do PPAR possui um padrão de expressão tecidual característico e regula um subconjunto de genes em vários tecidos que comumente regulam o metabolismo energético (177, 178).

1.6.3 PPAR-alfa (α)

É altamente expresso em tecidos com altas taxas catabólicas de ácidos graxos e alta atividade peroxissomal, sendo seu principal papel o de regulação da homeostase energética (179), promovendo a expressão de genes envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos, absorção de ácidos graxos e catabolismo de triglicerídeos (179, 180). Os órgãos que possuem papel significativo no catabolismo de ácidos graxos e apresentam ampla expressão de PPAR-alfa são: tecido adiposo marrom, fígado, coração, rim e intestino (179, 181). Sua expressão também é detectada em muitas células vasculares como as células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos (182-184).

Quando há ingestão excessiva de lipídios na dieta, a expressão hepática de PPAR-alfa diminui significativamente (185, 186), concordando com um número reduzido na densidade numérica das mitocôndrias hepáticas (186, 187). Está intimamente ligado à transcrição de genes relacionados à beta-oxidação hepática, como o CPT1a (188, 189). No fígado, em especial, é responsável por estimular a gliconeogênese, a síntese de corpos cetônicos, ativar o catabolismo dos ácidos graxos, e está envolvido no controle da montagem das lipoproteínas (190, 191). Também atua estimulando a síntese do heme e o catabolismo do colesterol. Além de atenuar a resposta inflamatória também exerce atividade anti-inflamatória por meio da redução da expressão das proteínas estimuladoras de ligação CCAAT alfa (CEBP α) e beta (CEBP β) e do NF- κ B (192)

A ativação de PPAR-alfa aumenta a oxidação de ácidos graxos, além de aumentar a densidade mitocondrial por área de tecido hepático, acarretando a redução nos níveis

circulantes de triacilgliceróis, esteatose hepática e muscular, e diminuição da adiposidade. Esses desfechos promovem melhora da sensibilidade à insulina (193-195), sendo assim um alvo promissor para o combate da DHGNA (22, 23) e na proteção contra a sua progressão para a EHNA, já que a inflamação lobular hepática e a disfunção mitocondrial exercem papel ímpar (24, 25).

1.6.4 PPAR-beta/delta (β/δ)

Apesar de amplamente expresso, é o menos estudado dos PPARs, e suas funções não são completamente conhecidas. O que se sabe é que ele é necessário ao desenvolvimento normal da placenta e do intestino, e também está envolvido no controle da homeostase energética pela estimulação de genes envolvidos no catabolismo de ácidos graxos e na termogênese adaptativa (196-199). Sua expressão é relativamente maior no encéfalo, tecido adiposo e pele (178).

Também possui um papel importante no controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, assim como no reparo tecidual (200, 201). No tecido hepático, participa da regulação das células de Kupffer, atuando como uma molécula anti-inflamatória, diminuindo a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas nas vias inflamatórias; no músculo esquelético, desempenha um papel fundamental na regulação da oxidação de ácidos graxos em resposta ao exercício e na remodelação das miofibrilas, o que aumenta a capacidade oxidativa intrínseca sob treinamento físico (202, 203). No intestino, o PPAR-beta/delta demonstrou suprimir a sinalização inflamatória na doença inflamatória intestinal por meio de um mecanismo de transrepressão independente de ligante (204). O PPAR-beta/delta induz a FOXO-1 (do inglês *Forkhead box protein O1*), que pode regular a expressão de glicose 6-fosfatase (G6Pase) e PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase), e pode ser uma possível abordagem para restaurar a via da gliconeogênese (205).

1.6.5 PPAR-gama (γ)

O PPAR-gama é predominantemente expresso no tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM). Funcionalmente, é um regulador mestre da adipogênese e metabolismo

lipídico, atuando na diferenciação do tecido adiposo e na manutenção das funções específicas do adipócito, como o armazenamento de lipídios no TAB e a dissipação de energia no TAM. Além disso, ele é necessário à sobrevivência dos adipócitos diferenciados (206). Está envolvido no metabolismo da glicose através da melhora da sensibilidade à insulina (27, 179) e, assim, representa uma ligação molecular entre o metabolismo de carboidratos e lipídios (207, 208).

Sua ativação crônica resulta em aumento da adiposidade e obesidade. O PPAR-gama também aumenta o armazenamento de lipídios e esterificação de triacilgliceróis nos adipócitos, aumentando a expressão de genes relacionados à absorção de ácidos graxos (27, 209).

Em contraste com o seu papel na diferenciação do TAB, o PPAR-gama controla a expressão de genes de biogênese mitocondrial e da via termogênica na diferenciação do TAM. Curiosamente, foi demonstrado que a ativação do PPAR-gama induz o escurecimento de TAB ativando a cascata SIRT1-PPAR-gama-PRDM16, o que resulta em aumento dos efeitos metabólicos benéficos adicionais no TAB, aumentando a queima de gordura em vez de armazenamento, diminuindo a resistência à insulina (202, 210).

O PPAR-gama também estimula a secreção de adipocinas (proteínas derivadas de adipócitos, como a adiponectina) no TAB, o que contribui para aumentar a sensibilidade à insulina. Além disso, o PPAR-gama suprime a produção de citocinas (por exemplo, TNF- α e Il-1 β) que promovem inflamação de baixo grau e resistência à insulina, aumentando assim a captação de glicose no tecido adiposo e diminuindo a resistência à insulina (211). Dessa forma, o PPAR-gama é um alvo importante para regular o metabolismo lipídico e combater a resistência à insulina em pacientes com DM2.

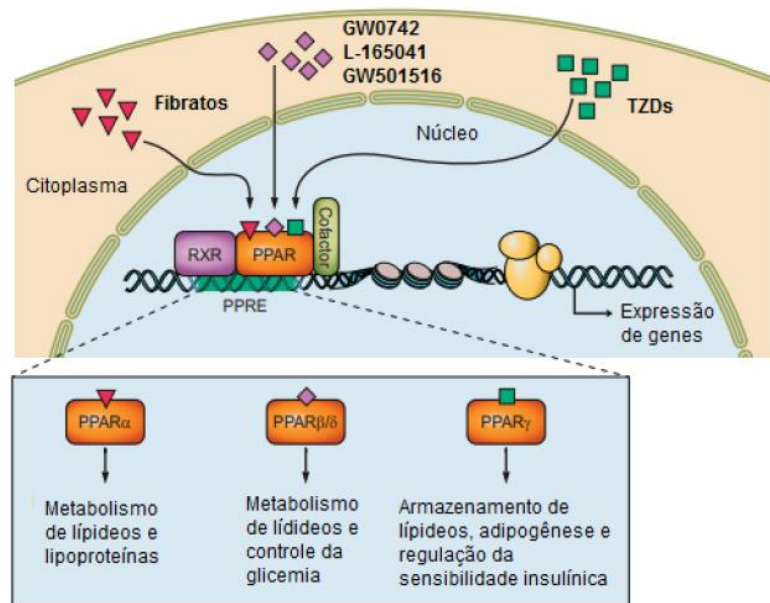
É expresso em três isoformas: PPAR-gama1 e PPAR-gama2 e PPAR-gama3 (212, 213). O PPAR-gama1 possui uma expressão ampla no intestino, encéfalo, células vasculares e tipos específicos de células imunes e inflamatórias (214, 215). O PPAR-gama2 é encontrado nos diferentes tecidos adiposos (216-218) e o PPAR-gama3 é encontrado nos macrófagos, intestino grosso e TAB (178, 213, 219).

Quando há ingestão excessiva de lipídios na dieta há um aumento expressivo de PPAR-gama. Essas observações apresentam um quadro que predispõe à NAFLD porque o PPAR-gama está ligado à lipogênese a partir da expressão do gene alvo SREBP-1c, que como já vimos anteriormente, está implicado na DNL.

Cabe mencionar que pacientes com DHGNA exibem alta expressão de PPAR-gama no fígado, o que coincide com a superexpressão de SREBP-1c e a conseqüente lipogênese

hepática favorecida (20, 220), sendo a expressão aumentada de PPAR-gama uma característica do fígado esteatótico, estimulando a transcrição de proteínas lipogênicas, aumentando a síntese e o armazenamento de lipídios (20, 21).

Figura 5- Ilustração do mecanismo de ativação de PPAR e principais efeitos fisiológicos da ativação das diferentes isoformas



Fonte: (221).

1.7 Agonistas PPARS como agentes terapêuticos

Os receptores nucleares são alvos terapêuticos importantes no campo das pesquisas metabólicas, devido ao seu potencial terapêutico para atuar em distúrbios do metabolismo de lipídios e glicose, pela ligação desses fatores com o possível tratamento de doenças como diabetes, dislipidemia, aterosclerose, SM e doenças cardiovasculares (222).

Os agonistas sintéticos de PPAR apresentam diferentes propriedades e especificidades para os receptores, com diferentes respostas. Um ponto importante é que os receptores PPAR têm uma capacidade aumentada quando comparado a outros receptores de se ligar a diferentes tipos de ligantes endógenos e sintéticos, mesmo que apresentem baixa afinidade (155, 156).

Diferentes classes de ligantes sintéticos para PPAR têm sido desenvolvidas, bem como há uma constante busca por ligantes de origem natural capazes de interagir com esta família

de receptores nucleares (223) com propriedades agonistas e que sejam seletivas e atóxicas (224).

1.7.1 Agonistas PPAR-alfa (α)

Os agonistas naturais de PPAR-alfa contemplam diferentes tipos de ácidos graxos saturados e insaturados como ácido palmítico, oléico, linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico (EPA) (156, 225), sendo os insaturados de maior afinidade do receptor (226).

Os agonistas sintéticos incluem a classe dos fibratos, que são medicamentos amplamente usados no tratamento de hiperlipidemia, promovendo redução nos níveis de triacilgliceróis e aumento nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDLc, do inglês “high density lipoprotein”); além de contribuir para a redução da progressão aterosclerótica e eventos cardiovasculares, sendo essas ações mediadas pela ativação de PPAR-alfa (222). Apesar dos efeitos benéficos, seu uso é associado ao aumento dos níveis de creatinina sérica, o que o torna limitante para pacientes com doença renal crônica (227, 228). Além disso, sua administração a longo prazo induz carcinogênese hepática em roedores (204), fenômeno não visto em humanos (229).

Os agonistas sintéticos de PPAR-alfa correspondem à genfibrozila, fenofibrato, clofibrato, ciprofibrato, sendo aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e disponíveis comercialmente para o tratamento de dislipidemia (157, 160, 230, 231). Têm demonstrado eficácia na redução de massa corporal, na resistência à insulina, nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, formação de adipócitos bege, redução significativa da esteatose hepática, e reversão do *whitening* no TAM (21, 22, 146, 232, 233). Além disso, aumento de HDLc, modificações no tamanho e na densidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês “low density lipoprotein”) (234), e atividade antiinflamatória são frequentemente atribuídas ao uso de agonistas PPAR-alfa (235).

1.7.2 Agonistas PPAR-beta/delta (β / δ)

Assim como o PPAR-alfa, o PPAR-beta/delta também tem como agonistas ácidos graxos saturados e insaturados, como o ácido dihomogama-linolênico, prostaglandina A1 (PGA1), prostaglandina D2 (PGD2), entre outros (156, 179).

Agonistas sintéticos como GW501516, GW0742 e L-1650 foram desenvolvidos e estão sendo avaliados para o tratamento de comorbidades resultantes na regulação do metabolismo de lipídios e da homeostase energética; na prevenção da hipertensão arterial; redução do remodelamento cardiovascular e da inflamação, melhora da função endotelial, redução do estresse oxidativo e da melhora da sinalização proliferativa (160, 236-238).

Outros resultados mostraram ainda esses agonistas atuando no controle de mecanismos do reparo tecidual (239), controle da progressão da lesão aterosclerótica em camundongos (240), perda de peso (196). Além disso, os agonistas PPAR-beta/delta tem sido propostos como potentes sensibilizadores de insulina, uma vez que eles melhoram a intolerância à glicose (241, 242).

Das três isoformas, o PPAR-beta é o único que não apresenta fármaco em uso clínico pela maioria dos agonistas estudados exibirem efeitos tumorigênicos (243, 244).

1.7.3 Agonistas PPAR-gama (γ)

O PPAR-gama também é ativado por ligantes endógenos, dentre eles os ácidos graxos, derivados de eicosanóides, e prostaglandinas (156, 179). O grupo químico das tiazolidinedionas (TZD) atuam como agonista PPAR-gama, como rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona e se mostraram eficazes no aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo e foram propostos clinicamente para o tratamento do DM2, que está associada à obesidade, hipertensão e dislipidemia (245, 246). A sensibilização insulínica pode ocorrer por meio de vários mecanismos, e um deles, acredita-se ser de ativação de PPAR-gama, estimulando a diferenciação de adipócitos e apoptose (247-251).

Apesar dos efeitos benéficos, as TZDs podem promover efeitos colaterais clinicamente significantes, como ganho de peso em função do papel regulador do PPAR-gama na adipogênese (27, 209), edema, aumentando a retenção renal de sódio no nível de ducto coletor e permeabilidade vascular no tecido adiposo. Isso resulta em expansão do volume plasmático ou retenção de líquidos, levando ao aumento do risco de insuficiência cardíaca congestiva em pacientes diabéticos (252); efeitos hepatotóxicos; além do prejuízo no metabolismo ósseo (28, 224, 253, 254). Embora os TZDs sejam excelentes sensibilizadores de insulina, os efeitos adversos dos TZDs foram considerados pelos médicos superiores aos benéficos, o que resultou na restrição de seu uso para o tratamento de DM2 (27, 28, 179).

1.7.4 Agonistas duo PPAR-alfa/gama (α/γ)

Os agonistas duo PPAR-alfa/gama também conhecidos como glitazares (muraglitazar, tesaglitazar, ragaglitazar) foram projetados para combinar os benefícios metabólicos da ativação do PPAR-alfa e PPAR-gama no tratamento da dislipidemia e do DM2 (235). Uma única opção que abrangesse uma ampla gama de doenças, incluindo hiperlipidemia e hiperglicemia seria bom, mas devido aos acentuados efeitos colaterais apresentados por grande parte desses fármacos que estavam sendo desenvolvidos, seus ensaios clínicos suspensos. Os principais efeitos associados a esses fármacos foram fraturas ósseas, insuficiência cardíaca, hemorragia gastrointestinal, ganho de peso e edema (255, 256).

Foi sugerido que os efeitos adversos atribuídos aos agonistas duo se devem à maior potência de ativação do receptor PPAR-gama, o que leva à sua ativação suprafisiológica em alguns tecidos e órgãos. Estão sendo desenvolvidos novos agonistas duos que apresentam os efeitos benéficos para o tratamento de diabetes (ativação parcial do PPAR-gama) e dislipidemia, prevenindo as complicações e os fatores de risco associados com ativação total do PPAR-gama.

O amorfrutina B é um agonista pan-PPAR, derivado de fontes alimentares comestíveis, que mostra uma atividade agonística nas três isoformas dos PPARs, se ligando com baixa afinidade ao receptor PPAR-gama enquanto se liga aos receptores PPAR-alfa e PPAR-beta/delta com maior eficácia. Estudos pré-clínicos demonstraram que a amorfrutina B melhora a hiperlipidemia e melhora a sensibilidade à insulina em camundongos obesos induzidos por dieta e db/db, sem apresentar os principais efeitos adversos como ganho de peso corporal, retenção de líquidos e osteoblastogênese (257, 258). Além de melhorar a RI e diminuir a hiperlipidemia em camundongos db/db (259).

Outros agonistas como o LT175 e o saroglitazar também são identificados como duo PPAR-alfa/gama. O LT175 reduziu lipídios séricos, glicose e adipogênese, bem como aumentou a sensibilidade à insulina em camundongos obesos induzidos por dieta (260), ao passo que o Saroglitazar foi aprimorado como um novo agonista duplo de PPAR-alfa/gama com maior preferência pela ativação do PPAR-alfa sobre o PPAR-gama, e é o primeiro glitazar aprovado no mercado, por enquanto somente na Índia, para o tratamento de DM2 e hiperlipidemia (261).

Os ácidos graxos, ligantes endógenos para PPARs, expressam atividades agonistas em concentrações micromolares em comparação com agonistas sintéticos como a clássica Pioglitazona. O desenvolvimento de novos ligantes com ativação equilibrada dos diferentes

isotipos, agonismo parcial, menor potência, maior eficácia e segurança, é essencial para maior conhecimento das funções fisiológicas e fisiopatológicas moduladas pelos isotipos de PPAR, seus mecanismos e características farmacodinâmicas (262, 263).

À luz do exposto, é de suma importância a descoberta de ligantes seletivos, que modulem parcialmente a ativação de PPAR-gama, com propriedades mais semelhantes a seus ácidos graxos endógenos, promovendo as atividades benéficas de sua ativação na redução da glicose e sensibilização insulínica, com redução dos efeitos secundários indesejados. Além disso, o desenvolvimento de agonistas duo (α/γ) para ativação simultânea de isotipos do receptor é de caráter promissor por possibilitar o tratamento de doenças metabólicas de maneira mais ampla, e com a vantagem dos agonistas parciais serem caracterizados como ativadores fracos, com menor potencial de ativação de curva dose-resposta, tendo o perfil de ativação balanceado e os efeitos adversos reduzidos quando comparado aos ocasionados pelo agonismo pleno e individual dos receptores (236, 237, 264).

Nesse contexto, nosso colaborador Dr Luiz Romeiro, do Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LADETER) da Universidade de Brasília, desenvolveu um estudo com derivados do cardanol saturado, com o objetivo de sintetizar e caracterizar novos compostos agonistas PPAR, visto que eles apresentaram perfil agonista parcial frente aos PPARs superior aos ácidos graxos saturados: cáprico, mirístico e esteárico. Adicionalmente, os derivados do cardanol modularam a expressão de importantes genes em hepatócitos primários e na diferenciação de pré-adipócitos com efeito reduzido comparado aos agonistas plenos.

Desta forma, novos análogos derivados do cardanol foram planejados sinteticamente com arcação estrutural complementar aos resíduos de aminoácidos contidos nos PPARs, e notavelmente, o LDT409 foi identificado como um dos compostos LDT que mostrou melhor desempenho na atividade agonística parcial e pan-PPAR com afinidade equilibrada para PPAR-alfa e PPAR-gama em diferentes tecidos, quando comparado ao veículo e aos controles positivos agonistas de cada subtipo.

1.8 *Anacardium Occidentale* (Cajueiro)

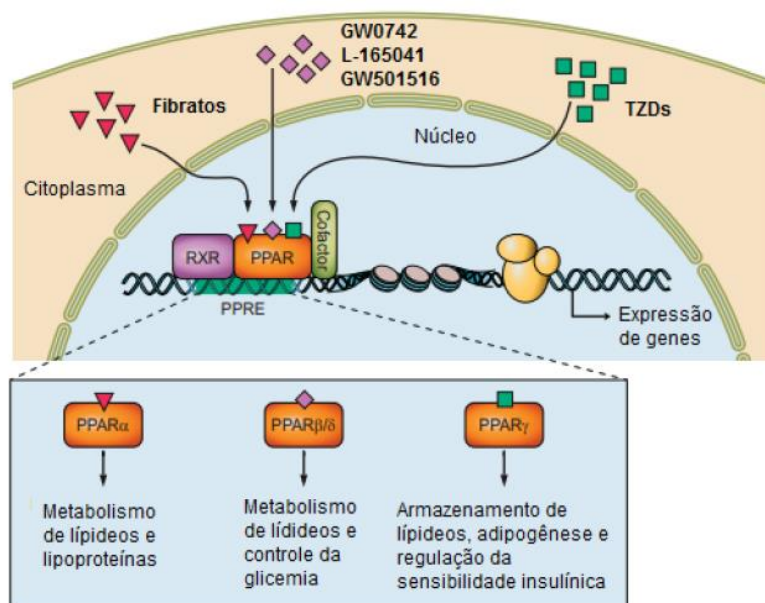
Anacardium Occidentale é o nome científico da árvore popularmente conhecida como cajueiro, espécie mais importante da família Anacardiaceae, por ser a única cultivada em escala comercial em todo o mundo (265).

A família Anacardiaceae é composta por cerca de oitenta e dois gêneros e mais de 700 espécies, mas representada principalmente por quatro gêneros, sendo um deles o *Anacardium*. Tal gênero apresenta um pequeno número de espécies dentre as em média quarenta conhecidas no Brasil, sendo quase todas elas originárias da América Central e do Sul (266).

Os gêneros da Anacardiaceae mais estudados quimicamente se destacam pelo número de investigações sobre a composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Tais famílias produzem substâncias como triterpenóides, alcaloides, flavonóides, terpenos, esteroides, xantonas, e principalmente, lipídios fenólicos presentes em sua casca (267).

O cajueiro é uma árvore historicamente nativa do Brasil, de acordo com a referência mais antiga conhecida sobre a planta (ilustração feita pelo monge naturalista francês André Thevet, em 1557). Possui troncos tortuosos, folhas glabras, flores masculinas e hermafroditas. Seu fruto, a castanha de caju, apresenta característica reniforme representando uma cultura perene. Seu pedúnculo é frequentemente confundido com o fruto, mas na verdade a parte superdesenvolvida de coloração variante entre amarelo e vermelho e muito apreciada pela suculência se trata do pseudofruto (268, 269)

Figura 6- Primeira ilustração do Cajueiro, de André Thevet, 1558

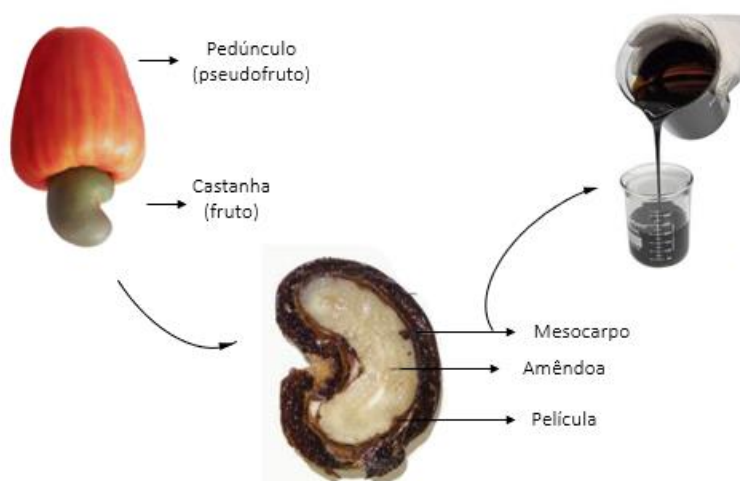


Fonte: (270)

O Brasil é um dos principais países produtores de caju, que constitui importante fonte de renda para o nordeste do País, associado tanto ao consumo de seu pseudofruto, como principalmente ao beneficiamento de seu fruto. Além do Brasil, são também produtores da castanha de caju o Vietnã, Índia e Nigéria (271, 272).

A castanha de caju é constituída de três partes: casca, película e amêndoa. A casca, que representa de 65% a 70% do peso da castanha, é constituída por um epicarpo coriáceo e mesocarpo esponjoso, cujos alvéolos são preenchidos por um líquido cáustico e inflamável, o líquido da casca da castanha (LCC) (273-275). A película, ou tegumento da amêndoa, que representa cerca de 3% do peso da castanha, é rica em taninos (276). A amêndoa, que é a parte comestível da castanha, formada por dois cotilédones de cor marfim, representa cerca de 38% a 30% do seu peso, porém no processo industrial o rendimento médio é de 50-55% (277).

Figura 7- Pseudofruto e fruto da *Anacardium Occidentale* e partes constituintes do fruto (castanha do caju)



Fonte: A autora, 2021

1.9 Líquido da casca da castanha de caju

O líquido da casca da castanha de caju (LCC ou CNSL, do inglês *Cashew nutshell liquid*), é um subproduto residual da indústria da castanha de caju e representa cerca de 18-27% do peso total da castanha. É constituído por um líquido marrom escuro, viscoso, acre e cáustico, considerado uma importante fonte de lipídios fenólicos não isoprenóides, caracterizados por apresentarem um anel aromático com pelo menos um grupo fenólico, e uma cadeia lateral com quinze carbonos, a qual pode ser saturada ou conter no máximo três insaturações, e que representam misturas de ácidos anacárdicos, caranóis, cardois e traços de metilcardois (271, 273, 278-280).

O LCC é considerado um dos subprodutos do agronegócio do caju e tem se tornado de grande interesse em diversas áreas, inclusive industriais e de saúde (271). O processo de beneficiamento da castanha do caju leva à obtenção de cerca de 45 mil toneladas de LCC técnico por ano como subproduto (273). As possibilidades de exploração desta matéria-prima são diversas, porém concentradas em segmentos de baixo valor agregado, sendo vendido a preços irrisórios (281)

Seus constituintes isolados ou derivados sintéticos têm apresentado diferentes perfis de atividades biológicas como atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante; porém demonstra alto nível de toxicidade, o que limita sua aplicação sem modificações estruturais que minimizem estes efeitos adversos (282-284).

O método de extração reflete na composição dos constituintes do LCC (285) que fornece basicamente dois extratos brutos: o LCC natural, obtido por extração à frio, solvente ou processo mecânico; e o LCC técnico, obtido em temperaturas acima de 190°C com descarboxilação da mistura de ácidos anacárdicos e conversão em mistura de cardanóis (273, 285-287).

O LCC técnico é constituído majoritariamente pelo cardanol, que por suas características físico-químicas e presença de cadeia alquílica hidrofóbica com diferentes graus de insaturação, assim como pelo anel fenólico, que permite inúmeras funcionalizações, sendo matéria prima biodegradável e renovável (273, 288).

Segundo Grygiel-Górniak (2014), existem três elementos essenciais para a ativação de PPAR, sendo eles: presença de grupo polar, região de ligação e cadeia hidrofóbica. E esses elementos estruturais são encontrados nos lipídios fenólicos isolados do LCC (289). Além

disso, os ácidos graxos de cadeia longa interagem com os três tipos de PPAR, exibindo elevada afinidade para PPAR-alfa (290, 291).

Em 2018, Ferreira utilizou uma mistura de cardanóis como matéria prima para planejamento, síntese e caracterização de candidatos a agonistas PPARs humanos planejados com arcabouço estrutural complementar aos resíduos de aminoácidos contidos nos PPARs, contendo grupo polar e da cadeia hidrofóbica junto ao grupo aromático que fornece interações adicionais, sob a hipótese e que pudessem atuar de forma similar aos ácidos graxos moduladores de PPAR, devido a sua estrutura química e com a expectativa de que apresentassem redução dos efeitos adversos. Ao longo de seus trabalhos de mestrado e doutorado *in vitro*, dos quinze compostos iniciais, ao final destacaram-se dois derivados com atividades agonistas parciais sobre PPAR-alfa e PPAR-gama, sendo um deles o LDT409, que notavelmente foi identificado como um dos compostos LDT que mostraram atividade agonística pan-PPAR com afinidade equilibrada para PPAR-alfa e PPAR-gama em diferentes tecidos, quando comparado ao veículo e aos controles positivos agonistas de cada subtipo (221).

1.10 LDT 409

Ensaio em hepatócitos primários desenvolvidos por Ferreira (2018) demonstraram a capacidade dos derivados alvo e das misturas de compostos em regular a expressão de transcritos de DNA complementar de genes responsáveis pela oxidação (*Fgf21*, *Cpt1* e *Pdk4*) e captação (*Fabp1* e *Cd36*) de ácidos graxos no fígado, os quais são efeitos mediados pela ativação de PPAR-alfa e importantes para a regulação do metabolismo lipídico. Por sua vez, ensaios em pré-adipócitos resultaram na expressão de transcritos de cDNA de marcadores da diferenciação de adipócitos (*Ap2*, *Ldp*, *Cd36* e adiponectina), evidenciando papel na adipogênese pela ativação de PPAR-gama no tecido adiposo (221).

Os trabalhos *in vivo* com LDT409 tiveram início em 2018, dando continuidade ao trabalho anterior *in vitro*, onde os estudos biológicos haviam sido realizados englobando ensaio sobre a transcrição de PPAR em zebrafish. Sahin conduziu estudos na Universidade de Toronto utilizando um modelo de diabetes induzido por dieta hiperlipídica, onde determinou a atividade do LDT409 e seus efeitos adversos usando como controle positivo a rosiglitazona, um agonista clássico do PPAR-gama (292).

Em resumo, foi realizada uma triagem para determinar se os compostos LDTs teriam atividade em PPARs de camundongo em comparação com PPARs de humanos. Com isso, foi feito um levantamento de todos os LDTs caracterizados em relação ao PPAR humano e uma pesquisa sobre os agonistas existentes até o momento do estudo. Surpreendentemente, foi identificado que o LDT409 tinha afinidade de ligação igual entre PPAR-alfa e PPAR-gama humanos, com afinidade de ligação reduzida para PPAR-beta (292).

Após alguns testes como a capacidade para induzir genes alvo PPAR-alfa e PPAR-gama em hepatócitos primários de camundongo, o LDT409 teve um desempenho melhor que o WY14643 (agonista purificado do PPAR-alfa); e ativou genes envolvidos na sensibilização à insulina em adipócitos 3T3-L1 de camundongos de forma mais eficaz em relação à rosiglitazona (agonista PPAR-gama). Sendo assim, LDT409 foi selecionado como o composto de partida para o estudo *in vivo*, uma vez que tinha atividade agonística e afinidades balanceadas para as isoformas PPAR-alfa e PPAR-gama (292).

Neste primeiro trabalho, o tratamento com LDT409 em camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO) causou diminuição da ingestão alimentar e da massa corporal, das concentrações de triacilgliceróis e insulina plasmáticos, além de aliviar a resistência à insulina. Induziu ainda potently os níveis circulantes de FGF21, evitou a formação de grandes gotículas de lipídios e propiciou a diminuição dos níveis de triacilgliceróis e colesterol hepáticos. Com relação à expressão gênica, os genes de oxidação e absorção de ácidos graxos foram aumentados pelo LDT409; que diminuiu a expressão dos genes gliconeogênicos *Pgc1-alfa* e *Pepck* nos animais obesos tratados, inibindo também a expressão de genes inflamatórios *TNF-a*, *Il-1b* e *Cd68* (292).

O LDT409 ainda induziu o escurecimento do TAM, sendo observado um aumento na expressão de *Ucp1* em TAB com tratamento, além de aumento da expressão do indutor de *browning Prdm16* e do gene de sensibilização à insulina. Foi investigado também os efeitos do LDT409 em marcadores de função e metabolismo cardíacos, pois os agonistas PPAR-gama, PPAR-alfa, ou duo-PPAR aumentam o risco de insuficiência cardíaca em pacientes diabéticos (He et al., 2014; Motani et al., 2009), mas foi visto que *Bnp* não foi alterado com o tratamento com LDT, além de não ter sido encontrado diferença no peso do coração.

Estes achados sugerem que o LDT409 ativa os receptores PPAR-alfa e PPAR-gama em vários tecidos, incluindo tecido adiposo e fígado, contribuindo assim para o aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado e no TAM ao regular positivamente os genes de PPAR-alfa. Apesar dos estudos ainda estarem em desenvolvimento, os dados até o momento sugerem que o LDT409 seria uma terapia eficaz para tratar doenças metabólicas com

potencial menos efeitos adversos em comparação com o agonista PPAR-gama atualmente disponível, Rosiglitazona, que foi utilizado como controle positivo em todas as análises realizadas.

Mais recentemente, Sá avaliou atividade de dois compostos LDT, sendo um deles o 409, em um modelo de infecção celular *in vitro* induzido por *Plasmodium berghei* ANKA, visando identificar possíveis efeitos imunomodulador/anti-inflamatório. O LDT409 não mostrou toxicidade mesmo na maior concentração avaliada e reduziu biologicamente o estresse oxidativo provocado pelas EROS e óxido nítrico nos macrófagos J774, induzido pelo parasito (293).

Contudo, não há relatos dos efeitos do LDT409 sobre o tratamento da DGHNA ou sobre um possível papel protetor na progressão DHGNA-EHNA em animais alimentados com dieta rica em frutose. Ressalta-se o caráter inovador e o amplo potencial translacional desse projeto, uma vez que o LDT409 é extraído de uma porção que geralmente é descartada da castanha do caju, produto produzido em larga escala no país. Considerando que mudanças no estilo de vida nem sempre conseguem reverter os danos hepáticos causados pela obesidade e suas comorbidades, o uso de fármacos adjuvantes é indicado. Nesse contexto, a ativação dos PPARs emerge como uma proposta pertinente para tratar a DHGNA a partir da modulação de diversas rotas metabólicas alteradas (Evans, Barish et al. 2004, Detlef Schuppan 2013).

Sendo assim, hipotetizamos que o tratamento com LDT409 pode tratar a DHGNA e evitar a sua progressão para a EHNA em animais alimentados com dieta rica em frutose pela conjugação dos efeitos da ativação do PPAR-alfa no aumento da beta-oxidação com os benefícios da ativação parcial do PPAR-gama na redução da inflamação hepática e controle da RI.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do LDT409 sobre o remodelamento estrutural hepático, com ênfase no metabolismo energético e estresse do retículo endoplasmático hepático em camundongos alimentados com dieta rica em frutose.

2.2 Objetivos Específicos

- a) induzir DGHNA a partir do consumo crônico de dieta rica em frutose em camundongos C57BL/6;
- b) avaliar os efeitos do tratamento com agonista duo LDT409 sobre a massa corporal, ingestão alimentar e níveis plasmáticos de insulina;
- c) estudar os efeitos do tratamento agonista duo LDT409 sobre o acúmulo de gordura intra-abdominal, triacilglicerol e colesterol plasmáticos e hepáticos;
- d) determinar a expressão gênica (PCR) de fatores implicados na beta-oxidação, lipogênese, gliconeogênese, estabilidade da gotícula de gordura e ERE hepático no fígado dos animais tratados com LDT-409;
- e) determinar a expressão gênica (PCR) de fatores implicados na ativação das células estreladas hepáticas e produtos da sua ativação no fígado dos animais tratados com LDT-409

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996), além de seguirem as normas impostas a nível nacional e internacional e serem aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/042/2018.

Trinta e dois camundongos C57BL/6 machos foram obtidos do biotério central da Universidade Federal Fluminense (UFF) e mantidos no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC) em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $60 \pm 10\%$, ciclo claro-escuro 12:12h), com livre acesso à alimentação e à água, em caixas “*pathogen-free*” durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

Com três meses de idade, os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos nutricionais por 10 semanas: grupo controle (C, n=16), alimentado com dieta padrão para roedores (14% da energia advinda de proteínas, 10% de lipídios e 76% de carboidratos; energia total de 15,88 kJ/g); e grupo high frutose (HFRU, *high-fructose*, n=16, alimentado com uma dieta com excesso de frutose (14% da energia advinda de proteínas; 50% de frutose; 10% de lipídios e 26% de carboidrato; energia total de 15,88 kJ/g). As dietas foram produzidas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil) de acordo com as recomendações da AIN-93M para roedores (294).

Após as primeiras dez semanas de indução às alterações metabólicas, os animais foram subdivididos em quatro novos grupos aleatoriamente para início do tratamento que perdurou 5 semanas, sendo eles:

- a) **Grupo controle** (C, n=8, sendo 4 animais por caixa), dieta controle ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- b) **Grupo controle + LDT409 (C-LDT)**, n=8, sendo 4 animais por caixa), dieta controle, tratado com LDT409;

- c) **Grupo *high-frutose* (HFRU, n=8, sendo 4 animais por caixa), dieta rica em frutose ao longo de todo experimento, sem tratamento;**
- d) **Grupo *high-frutose* + LDT409 (HFRU-LDT, n=8, sendo 4 animais por caixa), dieta rica em frutose, tratado com LDT409.**

O LDT409 foi incorporado nas respectivas dietas na dose de 40 mg/kg de massa corporal. O agonista duo PPAR-alfa/gama LDT409 foi fornecido pelo pesquisador Luiz Antônio Soares Romeiro do departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Figura 8- Desenho experimental



Legenda: Controle (C); Controle tratado com LDT-409 (C-LDT); *High fructose* (HFRU) e *High fructose* Tratado com LDT (HFRU-LDT)

Nota: Esquema representativo dos grupos experimentais.

Fonte: A autora, 2021.

É importante ressaltar que o conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas eram idênticos e estavam de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (294) para o período de manutenção dos animais a partir dos três meses de idade. As dietas experimentais encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais

Nutrientes	Dietas	
	Controle	HFRU
Caseína	140,0	140,0
Amido de milho	620,7	146,4
Sacarose	100,0	100,0
Frutose	---	474,3
Banha de porco	---	---
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	3802,8
Carboidrato	76	26
(%, energia)		
Frutose	---	50
(%, energia)		
Proteína	14	14
(%, energia)		
Lipídios	10	10
(%, energia)		

Nota: Composição nutricional das dietas controle e *high frutose*.
 Fonte: A autora, 2021.

3.2 Massa Corporal, ingestão alimentar e ingestão energética

Durante todo o período experimental, a MC dos animais foi mensurada semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). A ingestão alimentar foi obtida diariamente durante todo o protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi realizada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em

quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias é convertido para quilojoules, medida universal.

3.3 Eutanásia

Após 15 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos a jejum de seis horas e, após administração de heparina, foram anestesiados com cetamina, 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg. Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do átrio direito; as quais foram destinadas à centrifugação (1370 g, por 15 minutos) e congelamento (-80°C) para posteriores análises bioquímicas. A glicemia de jejum foi determinada com uma gota da amostra de sangue em glicosímetro (Accu-chek Performa, Roche, Basileia, Suíça). O fígado foi cuidadosamente dissecado, pesado e fixado em formalina de Millonig (para técnica de microscopia de luz) ou congelado (-80°C, para análises moleculares).

3.4 Análises Bioquímicas e FIRI

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (1370 g por 15 minutos) e estocado em freezer -80°C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de insulina foram analisadas em duplicata com kits de ensaio imunoenzimático comercialmente disponíveis (Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. #EZRMI-13K), usando o equipamento Fluostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Alemanha). As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e triacilglicerol total (TT), foram medidas por espectrofotômetro semiautomático usando um kit de métodos enzimáticos com base nas instruções do fabricante (Biogen System, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil - K083 / K117-2 / K082). Os níveis de triacilgliceróis e colesterol hepáticos foram medidos em amostras de fígado congeladas. Resumidamente, o tecido foi colocado num processador ultrassônico com 1 mL de isopropanol e o homogeneizado centrifugado a 2000 g. O sobrenadante (5 µL) foi analisado utilizando o kit comercial disponível para colesterol e triacilglicerol (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil) (295). Os dados de glicemia e insulinemia de

jejum foram utilizados para calcular o FIRI (*Fasting Insulin Resistance index*), utilizando a fórmula: insulina de jejum (um/L) x glicemia de jejum (mmol/L) / 25 (296).

Uma semana antes do sacrifício, os animais seguiram um protocolo de 48 horas (com livre acesso à dieta e à água) no sistema de Oxylet (Panlab/ Harvard, Barcelona, Spain), sendo as primeiras 24 horas descartadas como tempo de aclimação (297). Este sistema monitora o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2) e a taxa de troca respiratória, tendo os dados coletados a cada três minutos. O quociente respiratório (QR) foi calculado pela razão entre a VCO_2 e o consumo de oxigênio VO_2 .

3.5 Microscopia de luz

Fragmentos do fígado foram fixados por imersão em formaldeído e posteriormente desidratados, diafanizados, incluídos em paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cortados com 5 μ m de espessura, e corados com hematoxilina e eosina. Diversos cortes foram obtidos de cada fragmento do órgão. As imagens digitais foram obtidas no microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus America Inc., Miami, EUA) no formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 \times 1024 pixels. As imagens obtidas foram representativas dos quatro grupos experimentais.

3.6 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão de mRNA dos genes relacionados ao metabolismo energético hepático, estresse do retículo endoplasmático e ativação das células estreladas hepáticas de camundongos. O RNA hepático total foi extraído utilizando uma solução de lise - Trizol (Invitrogen, CA, EUA) para extrair e isolar o RNAm. A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia usando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences) usando 1 μ g de RNA e DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando oligonucleótidos Oligo (dT) para RNAm e transcriptase-reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e a mistura SYBR

Green (Invitrogen, CA, EUA). Os iniciadores foram projetados usando o software on-line Primer 3web versão 4.0. O gene beta-actina foi utilizado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo. A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95° C), com 44 ciclos, cada um consistindo de 95°C para 10s e 60°C por 15s, seguido de uma curva de fusão (60 a 95°C, com aquecimento taxa de 0,1°C / s). Os controles negativos consistiam em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) do mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde ΔC_t expressou a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes alvo e o controle endógeno. As sequências de primers sensíveis e anti-sentido utilizadas para amplificação estão descritas na Tabela 2. Ao longo do texto, os genes serão descritos com a primeira letra maiúscula e em itálico e as proteínas com siglas em letras maiúsculas, conforme padronizado internacionalmente (298).

Tabela 2- Detalhamento dos primers utilizados

Primers	Forward	Reverse
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAC
<i>Beta-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCA
<i>Chop</i>	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAT TA
<i>Coll1a1</i>	TAGGCCATTGTGTATGCAGC	ACATGTTTCAGCTTTGTG GACC
<i>Cidec</i>	AGCTAGCCCTTTCCAGAAAG	TAGAGGGTTGCCTTCA CGTT
<i>Cpt1a</i>	GCAGAGCACGGCAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGA AGAC
<i>Faz</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTG GTAT
<i>G6pase</i>	AGCAGTTCCTGTACACCTGT	TGGCTTTTCTTTCTC GAA
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACAT C	GTTCGTCACCAGCACA CAGT

<i>Pdgrf-beta</i>	TGCCTCAGCCAAATGTCACC	TGCTCACCCACCTCGTAT TCC
<i>Ppar-alfa</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTT CAA
<i>Ppar-gama</i>	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAA GACA
<i>Pepck</i>	TGACAGACTCGCCCTATGTG	TGCAGGCACTTGATGA ACTC
<i>Smad3</i>	G GTCAACAAGTGGTGGCGTGT	GCAGCAAAGGCTTCTG GGATAA
<i>Srebp-1c</i>	A AGCAGCCCCTAGAACAAAC	TCTGCCTTGATGAAGTG TGG
<i>Tgf-beta</i>	ACTGGAGTTGTACGGCAGTG	GGCTGATCCCGTTGATT TCC
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAA GTGC

Fonte: A autora, 2021

3.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão e analisados por teste t com correção de Welch nas primeiras dez semanas (dois grupos: C e HF) e por ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3 no período de tratamento (quatro grupos: C, CT, HF e HFT), pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos (299). Em todos os casos, foi utilizado o índice de significância com $P < 0,05$ (GraphPadPrism, versão 8.3, CA, EUA).

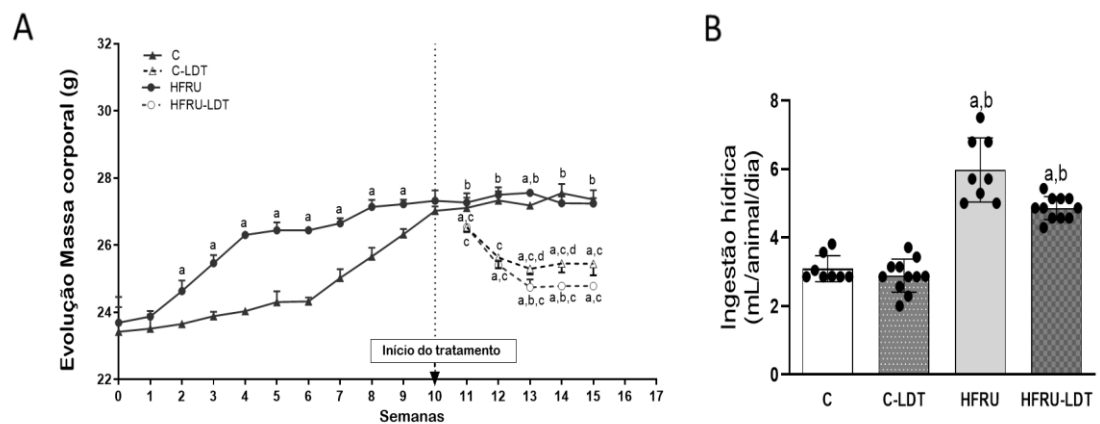
O two-way ANOVA foi utilizado para determinar a influência isolada da dieta high-frutose ou do tratamento proposto com o LDT409, bem como possíveis interações de dieta e tratamento sobre os desfechos avaliados.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento alimentar e massa corporal

O grupo C e HFRU iniciaram o experimento (semana 0) sem diferença estatística significativa de MC. Após duas semanas de ingestão de dieta rica em frutose, o grupo HFRU apresentou aumento da massa corporal quando comparado ao grupo C (+4%, $P=0,0017$, Figura 9A). Este aumento perdurou ao longo de todo experimento até a semana anterior ao início do tratamento. O tratamento começou a mostrar diferenças entre os grupos na primeira semana de administração do LDT409. A partir de então, e seguindo até o final do experimento, o grupo C-LDT e HFRU-LDT tiveram redução da massa corporal significativa em relação às suas contrapartes não tratadas (-7%, para C-LDT vs. C, $P<0,0001$; -9%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P<0,0001$, Figura 9A).

Figura 9- Evolução da massa corporal e ingestão hídrica



Nota: Evolução semanal da massa corporal (A); Ingestão hídrica (B). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 8$). As diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: a \neq C; b \neq C-LDT; c \neq HFRU.

Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT).

Fonte: A autora, 2021

Além disso, não houve diferença quanto à ingestão alimentar entre os grupos durante todo o experimento (Tabela 3). Esta observação exclui a necessidade de grupos de

alimentação *pair-feeding* para isolar os efeitos da redução do consumo de energia sobre os resultados analisados. Convertendo a gramatura ingerida para a energia que as dietas fornecem, com base em sua densidade energética (dieta padrão e rica em frutose, 15,88 kJ/g), obteve-se que os grupos não apresentaram diferença na ingestão energética quando comparado a sua contraparte, devido às dietas serem isoenergéticas. A ingestão hídrica foi maior no grupo HFRU quando comparado ao grupo C (+93%, $P=0,0001$, Figura 9B e Tabela 3), e o tratamento não foi capaz de normalizar o consumo, visto que a própria palatabilidade da dieta rica em frutose faz com que aumente a ingestão hídrica

Tabela 3 - Comportamento Alimentar

Dados	C	C-LDT	HFRU	HFRU-LDT
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2,77 $\pm 0,06$	2,78 \pm 0,04	2,79 \pm 0,06	2,77 \pm 0,03
Ingestão energética (kJ/dia/animal)	44,23 $\pm 1,02$	44,27 $\pm 0,72$	44,43 \pm 1,06	44,15 \pm 0,48
Ingestão hídrica (ml/dia/animal)	3,09 $\pm 0,38$	2,88 \pm 0,48	5,97 \pm 0,93 ^{a,b}	4,85 \pm 0,33 ^{a,b}

Nota: Valores representados como média \pm DP, n=8 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a \neq C; b \neq C-LDT; c \neq HFRU. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3.

Fonte: A autora, 2021.

4.2 Distribuição de gordura

A distribuição de gordura entre os diferentes compartimentos mostrou que o grupo HFRU apresentou maior acúmulo de gordura intra-abdominal que o grupo C (+9%, $P=0,0008$, Tabela 4), enquanto os grupos C-LDT e HFRU-LDT apresentaram-se reduzidos quando comparados a suas contrapartes não tratadas (-14%, para C-LDT vs. C, $P<0,0001$; -29%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P<0,0001$, Tabela 4). Com relação à gordura subcutânea, o grupo HFRU apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo C (+14%, $P=0,0006$, Tabela 4), enquanto o tratamento reduziu significativamente o acúmulo de gordura subcutânea no grupo HFRU-LDT quando comparado ao grupo HFRU (-17%, $P=<0,0001$, Tabela 4). A gordura marrom se mostrou maior nos grupos C-LDT e HFRU-LDT quando

comparados as suas contrapartes (+17%, para C-LDT vs. C, $P<0,0001$; +24%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P=0,0002$, Tabela 4). Estes dados mostram que o tratamento proposto foi eficaz em reduzir os depósitos adiposo intra-abdominal e subcutâneo e de aumentar a massa da gordura marrom, mesmo com a continuação da ingestão excessiva de frutose na dieta HFRU pelo grupo HFRU-LDT.

Tabela 4 – Distribuição de gordura

Dados	C	C-LDT	HFRU	HFRU-LDT
Massa do tecido adiposo branco subcutâneo (g)	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,00 ^{a,b}	0,23 ± 0,01 ^c
Massa do tecido adiposo epididimário (g)	0,73 ± 0,01	0,63 ± 0,01 ^a	0,80 ± 0,02 ^{a,b}	0,56 ± 0,01 ^{a,b,c}
Massa do tecido adiposo marrom (g)	0,74 ± 0,001	0,08 ± 0,002 ^a	0,06 ± 0,005 ^b	0,08 ± 0,003 ^{a,c}

Nota: Valores representados como média ± DP, n=8 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a ≠ C; b ≠ C-LDT; c ≠ HFRU. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3

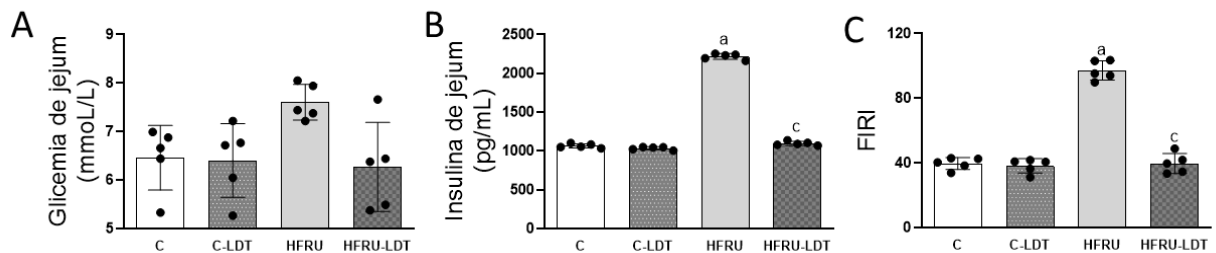
Fonte: A autora, 2021

4.3 Dosagens bioquímicas

Os grupos não apresentam diferença quanto à glicemia de jejum (Figura 10A). Contudo, o grupo HF apresentou hiperinsulinemia (+114%, $P<0,0001$, Figura 10B) quando comparado ao grupo C. O tratamento resgatou completamente as concentrações de insulina no grupo HFRU-LDT que foi marcadamente inferior ao grupo HFRU (-51%, $P<0,0001$, Figura 10B) e sem diferença significativa para o grupo C.

Em concordância com os resultados anteriores, o grupo HFRU apresentou resistência à insulina aferida pelo aumento significativo do FIRI em comparação ao grupo C (+145%, $P<0,0001$, Figura 10C). O tratamento contornou a resistência à insulina, uma vez que o grupo HFRU-LDT apresentou redução significativa do FIRI (-59%, $P<0,0001$, Figura 10C) quando comparado ao grupo HFRU e sem diferença com relação ao grupo C.

Figura 10 - Glicemia de Jejum, insulina plasmática e FIRI



Nota: Glicemia de jejum (A); Insulina de jejum (B); FIRI (C). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: $a \neq C$; $b \neq C\text{-LDT}$; $c \neq HFRU$.

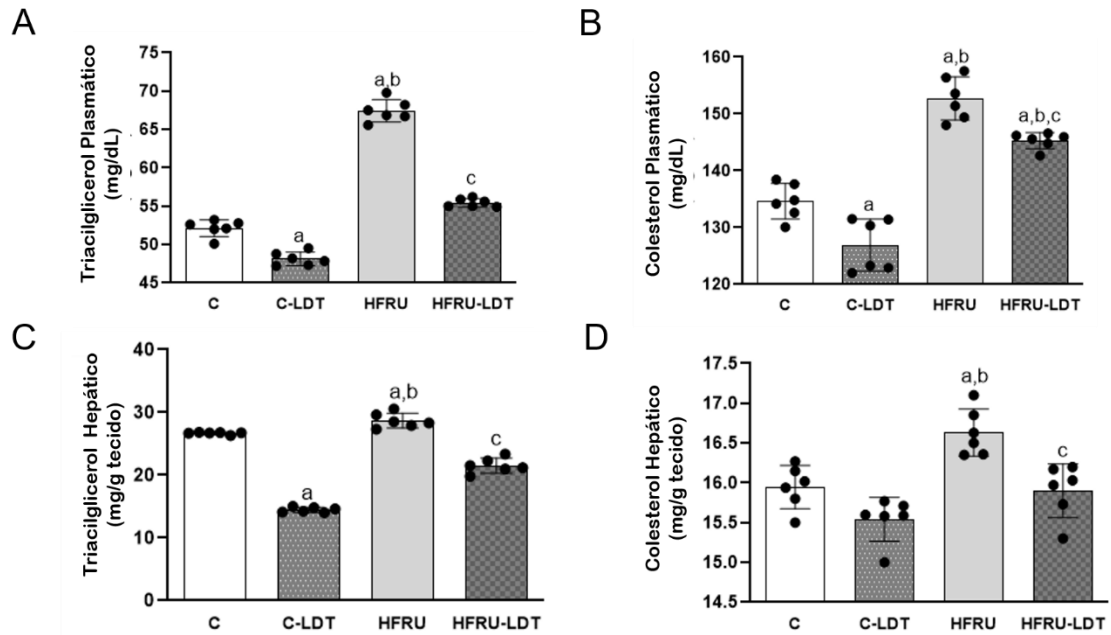
Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT); *Fasting insulin resistance index* (FIRI)

Fonte: A autora, 2011

No que diz respeito aos resultados dos triacilgliceróis e colesterol plasmáticos, o grupo HFRU apresentou aumento em relação ao grupo C (+30%, $P < 0,0001$; +13%, $P < 0,0001$, respectivamente, Figuras 10 A e 10B). No entanto, o LDT409 diminuiu eficientemente ambos os parâmetros nos grupos C-LDT e HFRU-LDT quando comparados com suas contrapartes não tratadas: triacilgliceróis (-8%, para C-LDT vs. C, $P = 0,0002$; -18%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P < 0,0001$, Figura 11A); e colesterol plasmático (-6%, para C-LDT vs. C, $P = 0,0408$; -5%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P = 0,0207$, Figura 11B).

Com relação aos triacilgliceróis hepáticos, o grupo HFRU apresentou aumento quando comparado ao grupo C (+8%, $P = 0,0402$, Figura 11C), mas o tratamento com o LDT409 foi capaz de reduzir os parâmetros nos grupos tratados C-LDT e HFRU-LDT quando comparados com suas contrapartes não tratadas (-46%, para C-LDT vs. C, $P < 0,0001$; -25%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P < 0,0001$, Figura 11C). No que se refere ao colesterol hepático, o grupo HFRU apresentou aumento quando comparado ao grupo C (+4%, $P = 0,0106$, Figura 11D), e o tratamento com o LDT409 foi capaz de reduzir esse parâmetro no grupo HFRU-LDT quando comparado ao grupo HFRU (-4%, $P = 0,0141$, Figura 11D).

Figura 11 - Triacilglicerol e colesterol (plasmáticos e hepáticos)



Nota: Triacilglicerol plasmático (A); colesterol plasmático (B); triacilglicerol hepático (C); colesterol hepático (D). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 6$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: a \neq C; b \neq C-LDT; c \neq HFRU.

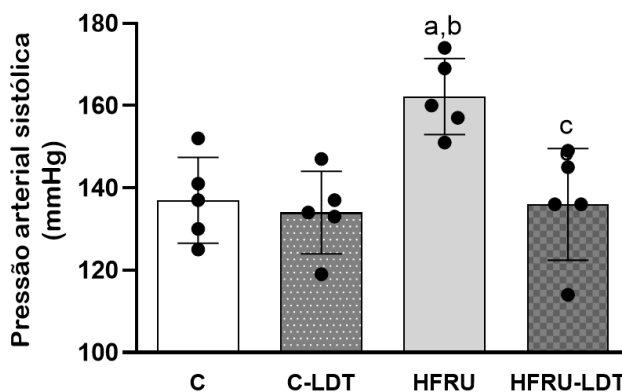
Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011

4.4 Pressão arterial sistólica

O modelo high-frutose promove ativação do sistema renina aldosterona e, nesse contexto, o grupo HFRU apresentou um aumento significativo na pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo C (+18%, $P=0,0195$, Figura 12). Esta condição foi resgatada pelo tratamento no grupo HFRU-LDT, pois esses animais apresentaram menor pressão arterial sistólica quando comparados ao grupo HFRU (-16%, $P=0,045$, Figura 12).

Figura 12 – Pressão arterial sistólica



Nota: Pressão arterial sistólica. Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: a \neq C; b \neq C-LDT; c \neq HFRU.

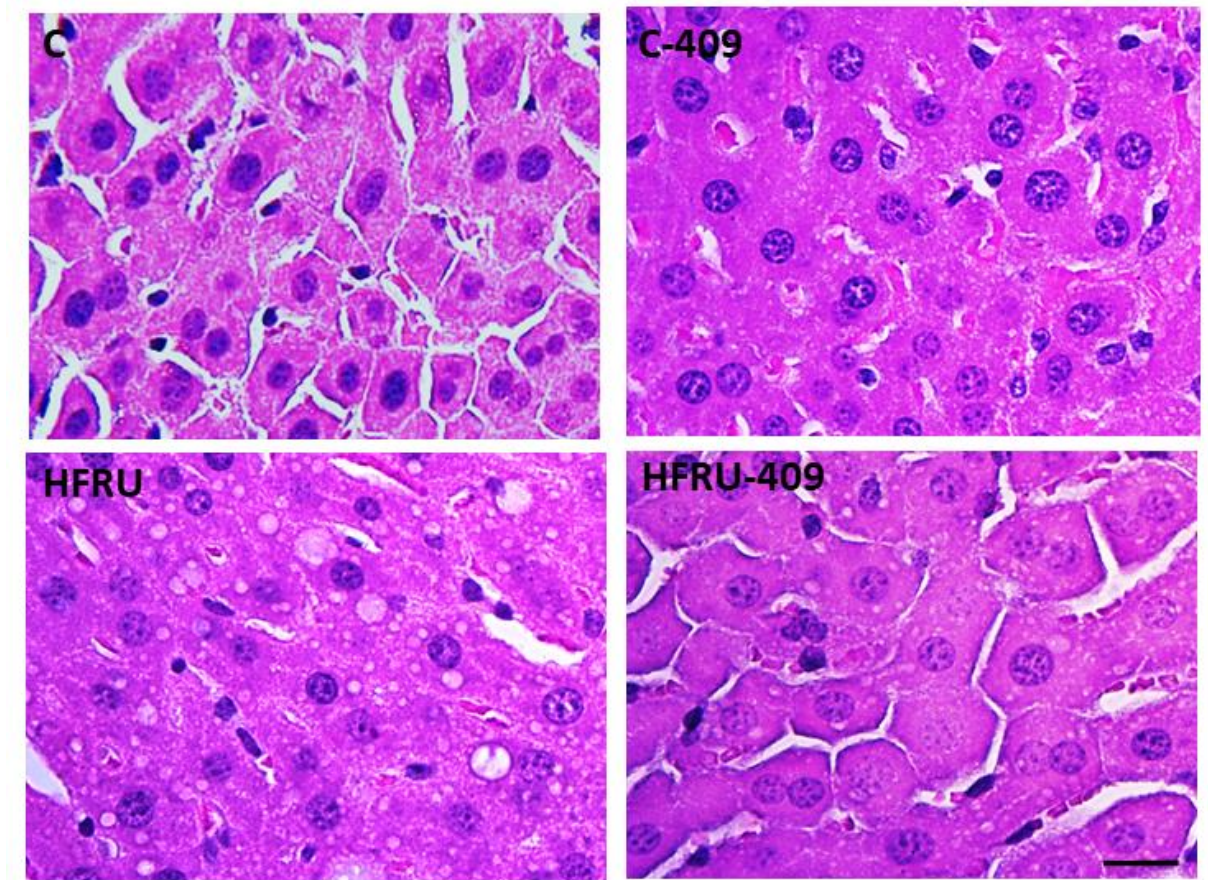
Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011.

4.5 Microscopia de luz

As fotomicrografias do tecido hepático sugerem uma importante propriedade anti-esteatótica do nutracêutico LDT409. O grupo C exibiu um parênquima hepático preservado, assim como o grupo C-LDT, no qual não houve evidências de hepatotoxicidade do LDT409. Por outro lado, o grupo HFRU demonstrou que o consumo excessivo de frutose promoveu esteatose microvesicular e macrovesicular expressivas. No entanto, o LDT409 foi capaz de mitigar a esteatose hepática, pois o grupo HFRU-LDT apresentou parênquima hepático bem preservado, lembrando o grupo controle (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias representativas da estrutura hepática ao final do experimento



Nota: Fotomicrografias do tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (HE); Fotos de mesmo aumento representativas dos grupos experimentais, barra de calibração = 30 μ m.

Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011

4.6 PCR quantitativo em tempo real

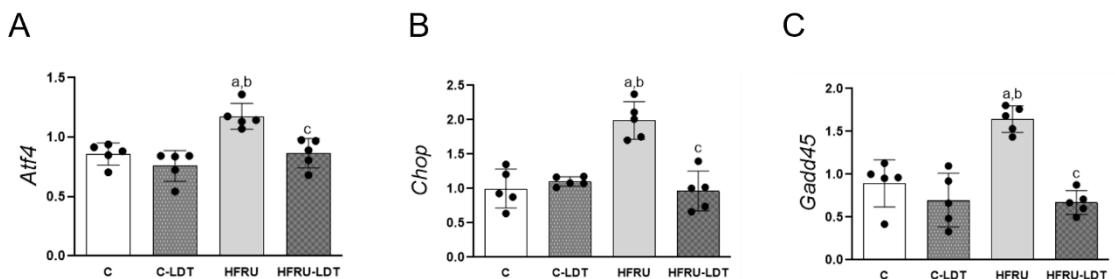
4.6.1 Expressão Gênica: Marcadores do estresse do retículo endoplasmático

A Expressão de *Atf4*, um fator de transcrição que regula vários genes envolvidos na resposta às proteínas desdobradas como resultado do estresse do RE, foi maior no grupo HFRU quando comparada ao grupo C (+37%, $P=0,0059$, Figura 14A). Em contraste, o tratamento com LDT409 foi capaz de reduzir a expressão de *Atf4* no grupo HFRU-LDT quando comparado a sua contraparte não tratada (-27%, $P=0,0152$, Figura 14A).

Chop, um fator de transcrição que está envolvido na mediação de apoptose, apresentou expressão aumentada no grupo HFRU quando comparado ao grupo C (+99%, $P=0,0027$, Figura 14B), enquanto o tratamento com LDT409 promoveu uma expressão reduzida no grupo HFRU-LDT em relação ao seu homólogo (-52%, $P=0,0023$, Figura 14B).

Como resultado do aumento de *Atf4/Chop*, o grupo HFRU teve aumento de RNAm do *Gadd45* quando comparado ao grupo C (+84%, $P=0,0090$, Figura 14C). Novamente, o tratamento com LDT409 foi capaz de reduzir a expressão de *Gadd45* no grupo HFRU-LDT quando comparado a sua contraparte não tratada (-59%, $P=0,0001$, Figura 14C). O estresse do RE observado no grupo HFRU pode preceder as alterações no metabolismo energético hepático.

Figura 14 - Genes marcadores do estresse do retículo endoplasmático



Nota: Expressão gênica de *Atf4* (A), *Chop* (B) e *Gadd45* (C). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011

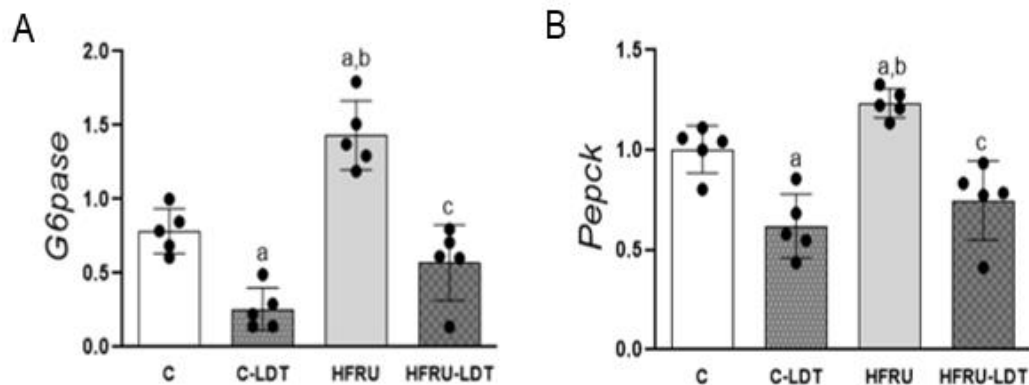
4.6.2 Expressão Gênica: Marcadores da gliconeogênese

No que se refere à produção de glicose hepática, a expressão relativa de *G6pase* aumentou no grupo HFRU quando comparado ao grupo C (+82%, $P=0,0065$, Figura 15A). No entanto, o tratamento com LDT409 provocou uma redução significativa na expressão de *G6pase* em ambos os grupos tratados quando comparados aos seus homólogos (67%, $P=0,0027$, para C-LDT vs. C; -60%, $P=0,0029$, para HFRU-LDT vs. HFRU, Figura 15A).

A expressão relativa de *Pepck*, responsável pela regulação da gliconeogênese, corrobora com os dados anteriores, tendo sua expressão aumentada no grupo HFRU quando comparada ao grupo C (+23%, $P=0,0381$, Figura 15B), e reduzida nos grupos tratados quando

comparados as suas contrapartes (-38%, para C-LDT vs. C, $P=0,0178$; e -39%, para HFRU-LDT vs. HFRU, $P=0,0166$, Figura 15B).

Figura 15 - Genes marcadores da gliconeogênese



Nota: Expressão gênica de *G6pase* (A) e *Pepck* (B). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média ± SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011.

4.6.3 Expressão Gênica: Marcadores da beta-oxidação e lipogênese hepática

Entre os genes relacionados à beta-oxidação, o gene *Ppar-alfa* apresentou maior expressão no grupo C-LDT409 em relação ao grupo C (+46%, $P=0,003$, Figura 16A). Do mesmo modo, o grupo HFRU-LDT mostrou aumento da expressão do gene *Ppar-α* quando comparado ao grupo HFRU (+130%, $P=0,0061$, Figura 16A), enquanto o grupo HFRU apresentou menor expressão do que o grupo C (-69%, $P < 0,0001$, Figura 16A).

A expressão relativa do *Cpt1a*, um transcrito do *Ppar-α* e responsável pela beta-oxidação mostrou uma redução significativa quando comparado ao grupo C (-25%, $P=0,0215$, Figura 16B). Por outro lado, o tratamento promoveu um aumento significativo na expressão nos grupos tratados quando comparado aos grupos não tratados (+124%, $P=0,0088$, para C-LDT vs. C; +202%, $P=0,0008$, para HFRU-LDT vs. HFRU, Figura 16B).

Em relação aos genes lipogênicos, o grupo HFRU apresentou maior expressão de *Ppar-gama* do que o grupo C (+405%, $P < 0,0001$, Figura 16C), enquanto os grupos C-LDT e HFRU-LDT apresentaram expressão reduzida quando comparado aos grupos C e HFRU,

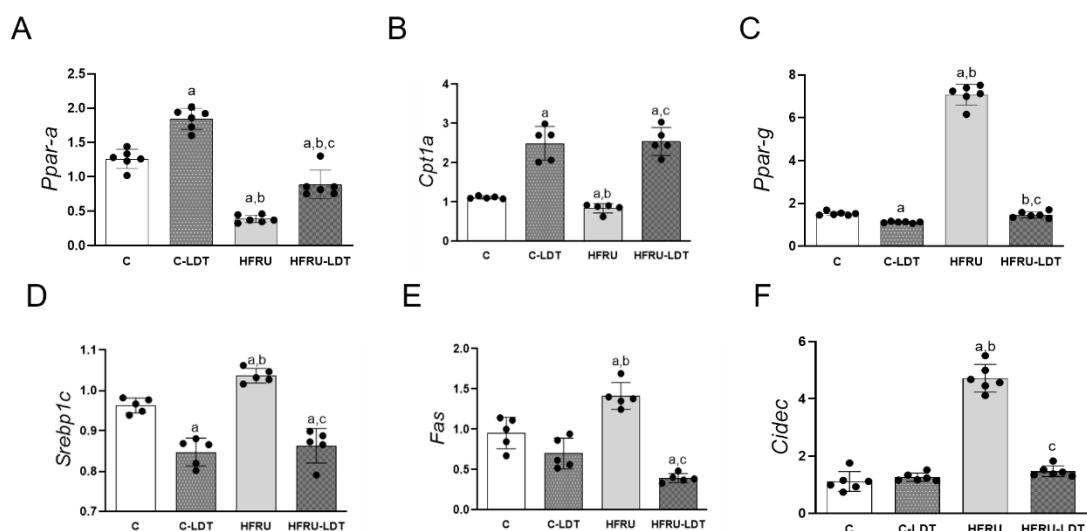
respectivamente (-26%, $P=0,0001$, para C-LDT vs. C; -81%, $<0,0001$, para HFRU-LDT vs. HFRU, Figura 16C).

O gene *Srebp-1c*, um transcrito do PPAR-gama, teve sua expressão aumentada no grupo HFRU em relação ao grupo C (+8%, $P=0,0011$, Figura 16D). Os grupos tratados tiveram uma expressão de *Srebp-1c* menor do que as suas contrapartes: C-LDT em relação a C (-12%, $P=0,0029$, Figura 16D) e HFRU-LDT em relação ao HFRU (-19%, $P=0,0019$, Figura 16D).

Do mesmo modo, o gene *Fas* mostrou um aumento significativo no grupo HFRU em comparação ao grupo C (+48%, $P=0,0208$, Figura 16E). Mais uma vez, o grupo HFRU-LDT apresentou expressão do gene *Fas* reduzida quando comparado ao grupo HFRU (-72%, $P=0,0002$, Figura 16E), reforçando o papel do LDT409 na redução da lipogênese hepática.

Cidec, cuja expressão se correlaciona com o acúmulo de gordura hepática, teve sua expressão amplamente aumentada no grupo HFRU quando comparada ao C (+322%, $<0,0001$, Figura 16F). Entretanto, o grupo HFRU-LDT apresentou uma expressão consideravelmente menor do que o HFRU (-69%, $<0,0001$, Figura 16F). Os dados são sugestivos de que o LDT409 reduz a lipogênese hepática e melhora a expressão de genes relacionados com a beta-oxidação.

Figura 16 - Genes marcadores da beta-oxidação e lipogênese hepática



Nota: Expressão gênica de *Ppar-alfa* (A), *Cpt1a* (B), *Ppar-gama* (C), *Srebp-1c* (D), *Fas* (E) e *Cidec* (F). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011

4.6.4 Expressão Gênica: Marcadores pró-fibrogênicos e ativação das células estreladas

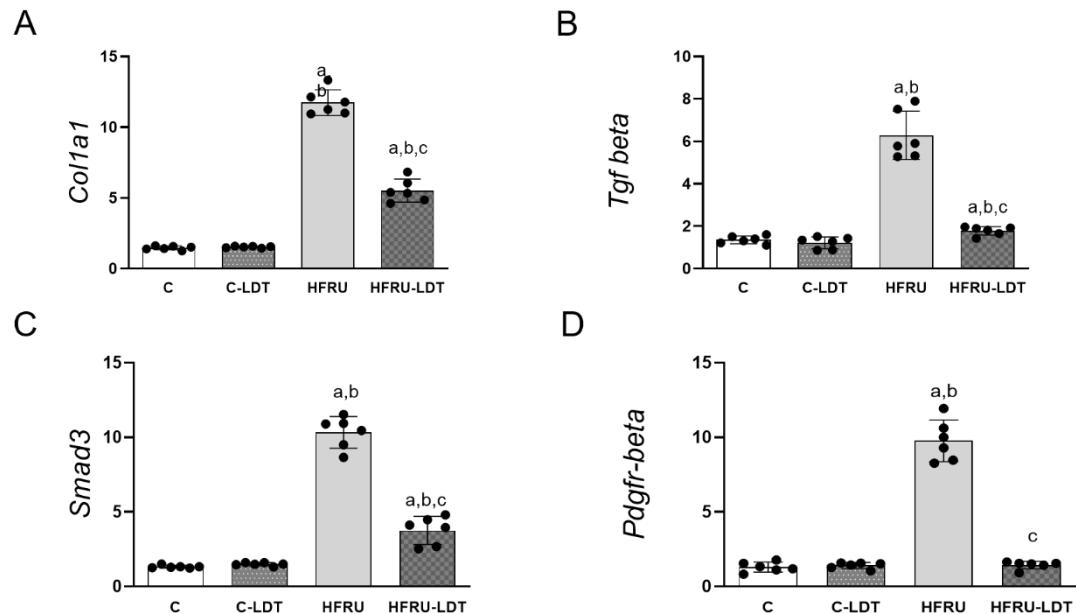
No que se refere a expressão de genes pró-fibróticos, o *Coll1a1*, responsável por codificar o principal componente do colágeno tipo 1, mostrou expressão mais alta no grupo HFRU do que no grupo C (+33%, $P < 0,0001$, Figura 17A), paralelamente a valores mais baixos no HFRU-LDT do que no grupo HFRU (-69%, $P < 0,0001$, Figura 17A).

A Expressão de *Tgf-beta*, uma potente citocina fibrogênica, apresentou um aumento acentuado no grupo HFRU quando comparado ao C (+364%, $P = 0,0007$, Figura 17B). Mais uma vez, o grupo HFRU-LDT apresentou expressão do gene *Tgf-beta* reduzida quando comparado ao grupo HFRU (-71%, $P = 0,0010$, Figura 17B).

O *Smad3*, um gene que promove a transcrição de colágeno tipo I e tipo III durante a ativação das células estreladas, teve sua expressão aumentada acentuadamente no grupo HFRU quando comparado ao C (+678%, $P < 0,0001$, Figura 17C). Por outro lado, o tratamento com LDT409 promoveu uma redução significativa no HFRU-LDT com relação ao HFRU (-64%, $P < 0,0001$, Figura 17C).

Da mesma forma, o *Pdgrf-beta*, um mitógeno crítico hepático, mostrou um aumento significativo na sua expressão no grupo HFRU quando comparado ao C (+649%, $P < 0,0001$, Figura 17D). Em contraste, o grupo HFRU-LDT apresentou uma expressão reduzida de *Pdgrf-beta* quando comparado ao HFRU (-85%, $P = 0,0001$, Figura 17D). Esses dados indicam que o tratamento com LDT409 pode mitigar a fibrose hepática por ativação das células estreladas mesmo com a continuação da ingestão excessiva de frutose na dieta HFRU pelo grupo HFRU-LDT.

Figura 17 - Genes marcadores pró-fibrogênicos e ativação das células esteladas



Nota: Expressão gênica de *Col1a1* (A), *Tgf-beta* (B), *Smad3* (C) e *Pdgfr-beta* (D). Dados testados pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média \pm SD, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Legenda: Dieta de controle (C); dieta de controle tratado com LDT409 (C-LDT); dieta rica em frutose (HFRU); dieta rica em frutose tratado com LDT409 (HFRU-LDT);

Fonte: A autora, 2011

4.7 Two-way ANOVA

A dieta e o tratamento interagiram significativamente para determinar massa corporal ($P = 0,0031$), ingestão hídrica ($P = 0,0363$), TAB subcutâneo ($P < 0,0001$), TAM ($P < 0,0001$), insulina ($P < 0,0001$), FIRI ($P < 0,0001$), TAG plasmático ($P < 0,0001$), TAG hepático ($P < 0,0001$), *Chop* ($P < 0,0001$), *Gadd45* ($P = 0,0018$), *Ppar-gama* ($P < 0,0001$), *Srbp1c* ($P = 0,0462$), *Fas*, *Cidec*, *Col1a1*, *Tgf-beta*, *Smad3* e *Pdgfr-beta* ($P < 0,0001$).

A dieta, como fator isolado, exerceu o efeito mais potente sobre a ingestão hídrica ($P < 0,0001$, representando 77% da variação total), insulina ($P < 0,0001$, representando 37% da variação total), FIRI ($P < 0,0001$, representando 33% da variação total), TAG plasmático ($P < 0,0001$, representando 61% da variação total), colesterol plasmático ($P < 0,0001$, representando 78% da variação total), *Atf4* ($P = 0,0008$, respondendo por 32% da variação

total), *Ppar-alfa* ($P < 0,0001$, responsável por 69% da variação total), *Cidec* ($P < 0,0001$, responsável por 39% da variação total), *Coll1a1* ($P < 0,0001$, responsável por 72% da variação total), *Tgf-beta* ($P < 0,0001$, responsável por 40% da variação total), *Smad3* ($P < 0,0001$, responsável por 58% da variação total) e *Pdgrf-beta* ($P < 0,0001$, responsável por 33% da variação total).

O tratamento com LDT409, como fator isolado, exerceu o efeito mais potente sobre a massa corporal ($P < 0,0001$, responsável por 92% da variação total), TABs ($P < 0,0001$, responsável por 63% da variação total), TABe ($P < 0,0001$, responsável por 84% da variação), glicemia ($P = 0,043$, responsável por 18% da variação total), TAG e colesterol hepáticos ($P < 0,0001$, responsável por 76% e 35% da variação total), pressão arterial sistólica ($P = 0,0088$, responsável por 23% da variação total), *Gadd45* ($P < 0,0001$, responsável por 43% da variação), marcadores de gliconeogênese (*G6pase*, $P < 0,0001$, responsável por 55% da variância total e *Pepck*, $P < 0,0001$, representou 65% da variância total), *Cpt1a* ($P < 0,0001$, responsável por 89% da variação) e marcadores lipogênicos (*PPAR-gama*, $P < 0,0001$, responsável por 36% da variância total; *Srebp1c*, $P < 0,0001$, representou 78% da variância total e *Fas*, $P < 0,0001$, representou 63% da variância total). Todos os resultados seguem detalhados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados do ANOVA de duas vias

PARAMETROS	INTERAÇÃO		TRATAMENTO		DIETA	
	% total da variância	Valor de P	% total da variância	Valor de P	% total da variância	Valor de P
Massa corporal final	1.398	0.0031	91.95	<0.0001	2.916	<0.0001
Pressão arterial sistólica	14.69	0.0307	23.28	0.0088	20.20	0.0134
Ingestão hídrica	2.681	0.0363	5.654	0.0035	76.14	<0.0001
Colesterol plasmático	0.005238	0.916	13.27	<0.0001	77.53	<0.0001
Colesterol hepático	2.798	0.2019	35.51	0.0001	29.55	0.0004
Triacilglicerol plasmático	7.612	<0.0001	30.22	<0.0001	60.45	<0.0001
Triacilglicerol hepático	5.109	<0.0001	76.14	<0.0001	16.71	<0.0001
TABs	11.61	<0.0001	63.23	<0.0001	11.61	<0.0001
TABe	14.24	<0.0001	83.98	<0.0001	0.000	<0.9999
TAM	34.65	<0.0001	30.69	<0.0001	34.65	<0.0001
Glicemia	14.95	0.596	17.58	0.0430	9.280	<0.1297
Insulina	29.70	<0.0001	33.18	<0.0001	36.85	<0.0001
FIRI	30.08	<0.0001	33.25	<0.0001	33.39	<0.0001
Expressão gênica						
<i>Atf4</i>	7.972	0.0559	30.11	0.0010	31.89	0.0008
<i>Chop</i>	35.09	0.0001	23.53	0.0007	19.97	0.0014
<i>Gadd45</i>	19.07	0.0018	42.76	0.0001	16.35	0.0032
<i>G6pase</i>	3.173	0.0844	55.30	<0.0001	26.53	<0.0001
<i>Pepck</i>	0.9258	0.4344	65.01	<0.0001	11.03	0.0137
<i>Ppar-alfa</i>	0.1330	0.5579	24.51	<0.0001	69.41	<0.0001
<i>Cpt1a</i>	0.9432	0.2319	88.79	<0.0001	0.4929	0.3823
<i>Ppar-gama</i>	27.42	<0.0001	36.55	<0.0001	35.16	<0.0001
<i>Srebp1c</i>	3.199	0.0462	78.24	<0.0001	7.599	0.0042
<i>Faz</i>	22.76	<0.0001	63.20	<0.0001	0.9133	0.3070
<i>Cidec</i>	31.16	<0.0001	26.00	<0.0001	39.30	0.0001
<i>Coll1a1</i>	13.86	<0.0001	13.29	<0.0001	71.17	<0.0001
<i>Tgf-beta</i>	25.30	<0.0001	28.57	<0.0001	39.99	<0.0001
<i>Smad3</i>	20.69	<0.0001	18.61	<0.0001	57.74	<0.0001
<i>Pdgrf-beta</i>	32.71	<0.0001	31.04	<0.0001	33.09	<0.0001

Nota: O fator mais poderoso que influencia a variância total de cada parâmetro está em negrito.

Legenda: Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs), Tecido adiposo branco epididimário (TABe), Tecido adiposo marrom (TAM), Índice de resistência à insulina em jejum (FIRI), Fator de transcrição ativadora 4 (Atf4), Proteína homóloga da proteína de ligação a intensificador de CCAAT (Chop), Parada de crescimento e gene induzível por danos no DNA 45 (Gadd45), Glicose 6 fosfatase (G6pase), Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pepck), Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo alfa (Ppar-alfa), carnitina palmitoil transferase IA (Cpt1a), Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo gama (Ppar-gama), Proteína de ligação a elementos reguladores de

esterol 1c (Srebp1c), Ácido graxo sintase (Fas), Indutor de morte celular DFFA como efector c (Cidec), Colágeno alfa 1 tipo 1 (Col1a1), Fator de crescimento transformador beta (Tgf-beta), Mães contra homólogo decapentaplégico 3 (Smad3) e Receptor beta de fator de crescimento derivado de plaquetas (Pdgrf-beta).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que a ingestão crônica da dieta rica em frutose propiciou maior velocidade no ganho ponderal nas primeiras semanas de administração, maior compartimento de gordura subcutânea e epididimária, bem como esteatose microvesicular e macrovesicular expressivas, corroborando com os níveis aumentados de TG hepático, contribuindo para o favorecimento da lipogênese hepática e ERE, redução da beta-oxidação, e pior prognóstico da DHGNA. Em contrapartida, o tratamento com LDT409 promoveu redução significativa da massa corporal, aumento do compartimento de gordura marrom, redução dos níveis de TG e colesterol plasmático e hepático, mitigou a esteatose, visto que o grupo tratado apresentou o parênquima hepático preservado, além de demonstrar efeitos benéficos na expressão gênica.

Após 2 semanas de ingestão da dieta rica em frutose, o grupo HFRU apresentou aumento de massa corporal. Os resultados envolvendo os efeitos da frutose no ganho de peso ainda são conflitantes, mas este achado corrobora com os resultados de outros trabalhos que utilizaram a dieta HFRU (300-303). Na décima semana a massa corporal dos animais se igualaram devido os animais controles terem apresentado um aumento de peso gradual e constante e os animais frutose estabilizado o peso em um determinado momento. Tais resultados sugerem uma adaptação, que costuma ocorrer quando há uma exposição constante ao consumo da frutose, acarretando uma tolerância maior a esse monossacarídeo a nível intestinal, como um mecanismo de adaptação (98).

Apesar dos grupos HFRU e C terem igualado a MC ao final do período de indução, houve aumento nos compartimentos de gordura no grupo que recebeu a dieta rica em frutose, a qual provoca resistência à insulina pela indução da via lipogênica e ação pró-inflamatória, o que corrobora para que haja hipertrofia de adipócitos, como visto anteriormente (75, 152, 304). Um estudo recente afirma que um longo período de ingestão de dieta HFRU causa expansão dos depósitos de gordura e disfunção dos adipócitos brancos por polarização de macrófagos para o estado M1 (305).

O tratamento com o LDT409 ocasionou a redução significativa da massa corporal dos grupos tratados, assim como visto anteriormente após tratamento com agonista do PPAR-alfa (148), bem como redução dos compartimentos de gordura subcutânea e epididimária concomitante ao aumento do compartimento de gordura marrom (292). Apesar de atribuir este efeito ao tratamento, uma vez que a ingestão de alimentos dos grupos tratados não diferiu de

suas contrapartes, ainda não temos dados suficientes que determinem como o nutracêutico regula os hábitos alimentares. Apesar dos agonistas PPAR-gama total estarem relacionados a aumento de peso corporal e adipogênese (306), agonistas parciais já demonstraram reduzir a massa corporal *in vivo* (307, 308).

Como já demonstrado anteriormente, os animais HFRU não apresentam aumento de ingestão alimentar, mas sim de ingestão hídrica (148). Anteriormente já foi descrito uma hiperativação do sistema renina angiotensina após o consumo crônico de frutose em animais C57BL/6, corroborando com o aumento na pressão arterial sistólica, característico desse modelo dietético (309-311). O tratamento com o LDT 409 foi incapaz de normalizar a ingestão hídrica, contudo trouxe a pressão arterial sistólica para níveis comparáveis ao grupo controle.

Com relação às dosagens bioquímicas, os animais HFRU apresentaram um aumento das concentrações de triacilglicerol e colesterol plasmáticos como já evidenciado anteriormente (85), bem como colesterol e TG hepático. O aumento do colesterol hepático é um preditor importante da inflamação hepática e EHNA (312), enquanto o nível elevado de TG hepático corrobora com as alterações estruturais vistas na microscopia de luz, refletindo de forma fidedigna a estimativa do percentual de esteatose hepática (295). Esta condição torna o fígado mais susceptível a outros danos hepáticos, incluindo fibrose, cirrose e câncer de fígado (59, 312). Todos esses parâmetros foram revertidos nos animais HFRU tratados com o LDT, assim como visto no trabalho realizado utilizando o agonista duo-PPAR LDT409 em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (292) e também evidenciado em estudo com agonista pan-PPAR Lanifibronor (313), além de associação de pioglitazona com fenofibrato (agonistas PPAR-gama e PPAR-alfa) (301).

Os animais HFRU apresentam ainda aumento de insulina plasmática, como já demonstrado anteriormente (85), o que justifica sua resistência à insulina vista pelo índice FIRI, onde os animais neste modelo não tiveram sua glicemia de jejum alterada às custas da hiperinsulinemia compensatória. A frutose é um carboidrato simples com baixo índice glicêmico. No entanto, parece que seu consumo a longo prazo é capaz de interromper a via de sinalização da insulina, levando à hiperinsulinemia compensatória, e esses animais possivelmente desenvolveriam também a hiperglicemia a longo prazo. Tal fenômeno ocorre porque a frutose no fígado suprime a captação de glicose, levando ao aumento dos níveis de glicose no sangue e o aumento concomitante da secreção de insulina (112). O tratamento com LDT contornou a resistência à insulina. Anteriormente, o uso de um agonista PPAR-alfa reverteu a intolerância oral à glicose (148). Em outro estudo, o IVA337, também conhecido

como lanifibranor, que atua como um agonista pan-PPAR de forma moderada e equilibrada nas três isoformas PPAR se mostrou eficaz na melhora da insulinemia (314). Achados estes também foram encontrados na utilização do LDT 409 no modelo animal alimentado com dieta hiperlipídica (292).

No presente estudo, o consumo excessivo de frutose apresentou efeito sobre a expressão gênica de marcadores da beta-oxidação, lipogênese hepática, gliconeogênese, pró-fibrogênicos e de ativação das células estreladas, contribuindo para o aumento da inflamação hepática e evolução da NAFLD, como relatado em estudos anteriores (85, 315).

No grupo HFRU foi visto um efeito inibidor sobre *Ppar-alfa* e *Cpt1-a*, corroborando para o acúmulo de lipídios intra-hepáticos e esteatose, já que a beta-oxidação é uma das principais vias pelas quais os lipídios são metabolizados (75). A CPT1a, que regula a entrada de ácidos graxos no mitocôndrias (316-318), é inibida pelo acúmulo de malonil-CoA, gerado na lipogênese *de novo* (112, 319). Num estudo anterior do grupo, o agonista PPAR-alfa WY14643 desencadeou uma melhora mitocondrial por permitir a entrada de ácidos graxos para beta-oxidação e supressão da lipogênese em animais alimentados com dieta HFRU (148). Tais benefícios também podem ser atribuídos ao LDT409, uma vez que houve aumento na expressão desses dois genes (*Ppar-alfa* e *Cpt1-a*) após o tratamento.

A lipogênese *de novo*, por sua vez, foi responsável por ativar fatores de transcrição como *Srebp1c* (127) e suas enzimas lipogênicas alvo, como a *Fas* (125, 320), que favorece o acúmulo lipídico levando à NAFLD no grupo HFRU (85, 112). O tratamento com o agonista duo-PPAR foi capaz de promover redução significativa na expressão dos genes, como visto por (301), onde tratamento de fenobibrato associado com pioglitazona melhorou a expressão de ambos os genes.

O gene lipogênico *Ppar-gama* também se mostrou aumentado no grupo HFRU, como visto anteriormente (85), sendo ele um receptor chave na homeostase da glicose e o metabolismo lipídico. Porém, sua super expressão está diretamente relacionada ao fígado com esteatose (321, 322). Tanto *Ppar-gama* quanto *Srebp-1c* são essenciais para desencadear a lipogênese hepática (323, 324). Os grupos tratados mostraram redução na expressão desses genes lipogênicos quando comparados as suas contrapartes não tratadas. Além disso, o *Cidec*, gene alvo do PPAR-gama, também se mostrou aumentado no grupo HFRU e é responsável por aumentar TG hepático, sobretudo pelo aumento da transcrição de genes relacionados à lipogênese e formação de gotículas lipídicas (325, 326). O tratamento com o LDT409 foi capaz de regularizar a expressão dos genes lipogênicos nos animais HFRU tratados, como

previamente relatado após utilização de agonista do PPAR-alfa e parcial do PPAR-gama (22, 186).

O consumo excessivo de frutose aumentou a expressão de *Pepck* e *G6Pase*, o que sugere resistência hepática à insulina e aumento da gliconeogênese, condição comum à etiologia do DM2 (151, 327, 328). O LDT409 apresentou efeito supressor à gliconeogênese, conforme previamente relatado em modelo animal alimentado com excesso em lipídios (292).

Estudos mostraram que algumas condições fisiológicas tais como obesidade, RI, DM2 e lipotoxicidade hepática, podem produzir um desequilíbrio entre a demanda celular, o dobramento das proteínas e a capacidade do RE para promover a maturação dessas proteínas (329). Quando as células sintetizam proteínas secretoras em quantidades que excedem a capacidade do dobramento e da maquinaria do sistema de degradação associado ao RE (ERAD), as proteínas desdobradas são acumuladas no RE. Essa condição é denominada ERE (330, 331), podendo desencadear uma resposta adaptativa conhecida como UPR.

O objetivo da ativação da UPR é reestabelecer a homeostase do RE em resposta a uma grande quantidade de proteínas imaturas no RE (332). Nesse sentido, houve aumento de *Atf4*, fator de transcrição que regula a região promotora de vários genes relacionados à UPR (333) como o *Chop* (334), que também se mostrou aumentado. Ele participa de várias funções corretivas durante o ERE, sendo um indutor chave de apoptose por reter o ciclo celular, o que resultará na morte celular com o objetivo de proteger as células dos efeitos tóxicos desencadeados pela ação das proteínas desdobradas (65, 329, 335). Dessa mesma forma, houve aumento da expressão gênica de *Gadd45*, que participa da regulação do ciclo celular (65). Estudos anteriores utilizando dieta hiperlipídica demonstraram os mesmos achados (336). O tratamento com LDT foi capaz de normalizar a expressão de todos os genes envolvidos no ERE nos animais HFRU concordando com o alívio da resistência à insulina, uma vez que o RE utiliza glicose como combustível preferencial e a resistência à insulina contribui para estresse dessa organela celular (333).

Sobre os marcadores pró-fibrogenicos *Colla1* e *Tgf-beta*, ambos se mostraram aumentados no grupo HFRU, assim como *Smad 3* e *Pdgrf-beta*, envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática, que é caracterizada pela deposição excessiva de elementos de matriz extracelular produzida pelas células estreladas ativas (337). Na presença lesão hepática, as células estreladas hepáticas (HSCs) recebem sinais que causam sua transdiferenciação em células semelhantes a fibroblastos (338). HSCs ativadas causam fibrose hepática se o estímulo desencadeador de sua ativação for prolongado (339). O tratamento com o LDT409 foi capaz de normalizar a expressão desses genes, bem como o tratamento *in vitro*

com saroglitazar, um agonista duo PPAR-alfa/gama (340). Um estudo anterior com Lanifibranor demonstrou proliferação e contratilidade reduzidas das HSCs, sugerindo que a ativação do *Ppar-gama* foi associada à desativação do HSC, provavelmente através da modulação de vias-chave, como *Tgf-β* e *Pdgfr-β* (341). O receptor *beta* do fator de crescimento derivado de plaquetas (*Pdgfr-beta*) não é encontrado em células estreladas quiescentes, apenas em um estágio inicial de lesão hepática, sendo sua indução transcricional estimulada por genes como *Tgf-beta-1* (342). Esse gene é responsável por favorecer a proliferação de migração das células estreladas (343), e também se mostrou notavelmente maior nos animais ob/ob no estudo referenciado.

O fator de transformação do crescimento beta (*Tgf-beta*) é considerado a citocina fibrogênica mais potente e é liberada pela forma latente de várias células no fígado (344). Sua ativação induz a fosforilação de proteínas *Smad*, predominantemente *Smad3*. A ativação de *Smad3* durante a ativação de HSC, promove a transcrição de colágeno tipo I e tipo III. (345). Estudos têm mostrado a sinalização *Tgf-beta-Smad* aumentada na fibrose hepática (346, 347). Dados ainda não publicados do nosso grupo mostram as expressões gênicas desses fatores maiores no fígado de animais ob/ob. O tratamento com o LDT 409 foi capaz de reduzir a expressão desses genes, como visto em outros estudos (301, 313, 314). Tais resultados podem contribuir para a compreensão da progressão da esteatose hepática para EHNA e fibrose, visto que estudos apontam como gatilho anormalidades metabólicas, inflamação e lesão hepática (348, 349).

Tivemos como limitação do presente estudo a impossibilidade de finalizar algumas técnicas que estavam em andamento devido à pandemia da Covid 19, que teve início no segundo ano de realização deste trabalho. Tais análises, como o processamento para a estereologia hepática, onde teríamos os dados de densidade de volume da esteatose e binucleação; técnica de imuno-histoquímica onde conseguiríamos apresentar dados mais concretos sobre as células estreladas, estímulos apoptóticos e proliferação celular; e microscopia eletrônica para avaliar a ultraestrutura hepática, ficarão como perspectivas futuras do estudo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o excesso de frutose na dieta causou lipotoxicidade, observada pelo aumento da adiposidade nos compartimentos subcutâneo e intra-abdominal, dislipidemia e acúmulo ectópico de lipídios no fígado, caracterizando a DHGNA. O tratamento com LDT409 por cinco semanas foi capaz de reduzir a adiposidade, controlar a dislipidemia e normalizar os níveis de triacilgliceróis e colesterol hepáticos, indicando controle da lipotoxicidade e da inflamação hepática respectivamente. O ERE, promovido pelo excesso de frutose, parece deflagrar a lipotoxicidade no fígado por estímulo da lipogênese e gliconeogênese. O LDT409 aliviou o estresse do retículo e exerceu efeitos anti-esteatóticos nesse modelo experimental por supressão da lipogênese e gliconeogênese e indução da beta-oxidação secundários à sua ação como agonista do PPAR-alfa/gama, o que pode representar um potencial nutracêutico para controle da DHGNA.

REFERÊNCIAS

1. Abd El-Haleim EA, Bahgat AK, Saleh S. Effects of combined PPAR- γ and PPAR- α agonist therapy on fructose induced NASH in rats: Modulation of gene expression. *Eur J Pharmacol* 2016; 773: 59-70 (doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.011)
2. Abdelmalek MF, Lazo M, Horska A, Bonekamp S, Lipkin EW, Balasubramanyam A et al. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology* 2012; 56: 952-960 (doi: 10.1002/hep.25741)
3. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 1961-1971 (doi: 10.1002/hep.23535)
4. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013; 19: 557-566 (doi: 10.1038/nm.3159)
5. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 2007; 262: 184-198 (doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01825.x)
6. Aibara D, Matsuo K, Yamano S, Matsusue K. Fat-specific protein 27b is regulated by hepatic peroxisome proliferator-activated receptor γ in hepatic steatosis. *Endocr J* 2020; 67: 37-44 (doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0296)
7. Alemán-González-Duhart D, Tamay-Cach F, Álvarez-Almazán S, Mendieta-Wejebe JE. Current Advances in the Biochemical and Physiological Aspects of the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus with Thiazolidinediones. *PPAR Res* 2016; 2016: 7614270 (doi: 10.1155/2016/7614270)
8. Alves LFJRvdQ. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. 2013; 5: 450-513
9. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014; 63: 895-902 (doi: 10.1016/j.metabol.2014.04.003)
10. Ament Z, West JA, Stanley E, Ashmore T, Roberts LD, Wright J et al. PPAR-pan activation induces hepatic oxidative stress and lipidomic remodelling. *Free Radic Biol Med* 2016; 95: 357-368 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.033)
11. Anderson WR. 1982. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. In: JSTOR.
12. Andrade Neto Jcd. 2006. Competitividade na pequena produção agroindustrial: estudo na agroindústria da castanha de caju. In: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

13. Andrade TJAS, Araújo BQ, Citó AMGL, Silva J, Saffi J, Ritcher MF et al. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). *Food Chemistry* 2010; 126: 1044-1048 (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.122)
14. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231 (doi: 10.1056/NEJMra011775)
15. Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev* 2007; 65: S57-6.
16. Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Alegre F, Funes HA, Victor VM, Barrachina MD et al. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *J Hepatol* 2013; 59: 780-789 (doi: S0168-8278(13)00415-7 [pii]10.1016/j.jhep.2013.06.005)
17. Aragno M, Tomasinelli CE, Vercellinatto I, Catalano MG, Collino M, Fantozzi R et al. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1067-1074 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.016)
18. Arden C, Tudhope SJ, Petrie JL, Al-Oanzi ZH, Cullen KS, Lange AJ et al. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J* 2012; 443: 111-123 (doi: 10.1042/bj20111280)
19. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 2009; 51: 212-223 (doi: 10.1016/j.jhep.2009.03.008)
20. Balachandran VS, Jadhav SR, Vemula PK, John G. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2013a; 42: 427-438 (doi: 10.1039/c2cs35344j)
21. Balachandran VS, Jadhav SR, Vemula PK, John G. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. 2013b; 42: 427-438
22. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, Marinho Tde S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. *Life Sci* 2015; 127: 73-81 (doi: S0024-3205(15)00096-X [pii]10.1016/j.lfs.2015.02.003)
23. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 590-597 (doi: 10.1172/jci27955)
24. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2: 5 (doi: 10.1186/1743-7075-2-5)
25. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 463-478 (doi: 10.1210/jc.2003-030723)

26. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-28 (doi: S1567-7249(05)00136-4 [pii]10.1016/j.mito.2005.10.004)
27. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012; 122: 2176-2194 (doi: 10.1172/jci41636)
28. Berberoglu Z, Gursoy A, Bayraktar N, Yazici AC, Bascil Tutuncu N, Guvener Demirag N. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3523-3530 (doi: 10.1210/jc.2007-0431)
29. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-435 (doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018)
30. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 244-251 (doi: 10.1016/j.tips.2005.03.003)
31. Bernsmeier C, Albano E. Liver dendritic cells and NAFLD evolution: A remaining open issue. *J Hepatol* 2017; 66: 1120-1122 (doi: 10.1016/j.jhep.2017.02.018)
32. Blakemore SJ, Aledo JC, James J, Campbell FC, Lucocq JM, Hundal HS. The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 1): 7-12 (doi: 10.1042/bj3090007)
33. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 97: 101-106 (doi: 10.1016/j.pbb.2010.02.012)
34. Boergesen M, Poulsen L, Schmidt SF, Frigerio F, Maechler P, Mandrup S. ChREBP mediates glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 13214-13225 (doi: 10.1074/jbc.M110.215467)
35. Borges CC, Salles AF, Brighenti I, Mandarim DELCA, Aguila MB. Vitamin D Deficiency Increases Lipogenesis and Reduces Beta-Oxidation in the Liver of Diet-Induced Obese Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2018; 64: 106-115 (doi: 10.3177/jnsv.64.106)
36. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori CR, Mitro N, Ruscica MJJoms. PPAR agonists and metabolic syndrome: an established role? 2018; 19: 1197
37. Boyer-Diaz Z, Aristu-Zabalza P, Andrés-Rozas M, Robert C, Ortega-Ribera M, Fernández-Iglesias A et al. Pan-PPAR agonist lanifibranor improves portal hypertension and hepatic fibrosis in experimental advanced chronic liver disease. *J Hepatol* 2020; (em impressão, doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.045): (doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.045)
38. 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 (doi: 10.1042/bj2600093)

39. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça 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 (doi: 10.1210/endo.137.1.8536636)
40. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-543 (doi: 10.1093/ajcn/79.4.537)
41. Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66 (doi: 10.1055/s-2005-858989)
42. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15: 798-808 (doi: 10.1038/oby.2007.608)
43. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 1992; 267: 14523-14526
44. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190 (doi: 10.1038/nm1166)
45. Caliceti C, Calabria D, Roda A, Cicero AFG. Fructose Intake, Serum Uric Acid, and Cardiometabolic Disorders: A Critical Review. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9040395)
46. Cao M, Tong Y, Lv Q, Chen X, Long Y, Jiang L et al. PPARdelta Activation Rescues Pancreatic beta-Cell Line INS-1E from Palmitate-Induced Endoplasmic Reticulum Stress through Enhanced Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res* 2012; 2012: 680684 (doi: 10.1155/2012/680684)
47. Capelli D, Cerchia C, Montanari R, Loiodice F, Tortorella P, Laghezza A et al. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci Rep* 2016; 6: 34792 (doi: 10.1038/srep34792)
48. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 205-215 (doi: 10.1016/j.tem.2012.03.001)
49. Castelló A, Gumá A, Sevilla L, Furriols M, Testar X, Palacín M et al. Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 1): 271-277 (doi: 10.1042/bj3090271)
50. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459: 477-485 (doi: 10.1007/s00428-011-1147-1)
51. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burriss TP et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008; 456: 350-356 (doi: 10.1038/nature07413)

52. Chatterjee S, Majumder A, Ray S. Observational study of effects of Saroglitazar on glycaemic and lipid parameters on Indian patients with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2015; 5: 7706 (doi: 10.1038/srep07706)
53. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994; 135: 798-800 (doi: 10.1210/endo.135.2.8033830)
54. Chen L, Yang G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Res* 2014; 2014: 653017 (doi: 10.1155/2014/653017)
55. Chen Q, Wang T, Li J, Wang S, Qiu F, Yu H et al. Effects of Natural Products on Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9020096)
56. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-25580 (doi: 10.1074/jbc.273.40.25573)
57. Choi Y, Abdelmegeed MA, Song BJ. Diet high in fructose promotes liver steatosis and hepatocyte apoptosis in C57BL/6J female mice: Role of disturbed lipid homeostasis and increased oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2017; 103: 111-121 (doi: 10.1016/j.fct.2017.02.039)
58. Cholankeril G, Patel R, Khurana S, Satapathy SK. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. *World J Hepatol* 2017; 9: 533-543 (doi: 10.4254/wjh.v9.i11.533)
59. Chou CJ, Haluzik M, Gregory C, Dietz KR, Vinson C, Gavrilova O et al. WY14,643, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist, improves hepatic and muscle steatosis and reverses insulin resistance in lipoatrophic A-ZIP/F-1 mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 24484-24489 (doi: 10.1074/jbc.M202449200)
60. Cioffi F, Senese R, Lasala P, Ziello A, Mazzoli A, Crescenzo R et al. Fructose-Rich Diet Affects Mitochondrial DNA Damage and Repair in Rats. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9040323)
61. Citó AMdGL, da Silva J, Saffi J, Richter MF, Ferraz AdBFJFC. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). 2011; 126: 1044-1048
62. Clemenz M, Frost N, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Bohm C et al. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes* 2008; 57: 1405-1413 (doi: db07-0839 [pii]10.2337/db07-0839)
63. Coelho MS, de Lima CL, Royer C, Silva JB, Oliveira FC, Christ CG et al. GQ-16, a TZD-derived partial PPAR γ agonist, induces the expression of thermogenesis-related genes in

brown fat and visceral white fat and decreases visceral adiposity in obese and hyperglycemic mice. 2016; 11: e0154310

64. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 2014; 156: 304-316 (doi: S0092-8674(13)01590-0 [pii]10.1016/j.cell.2013.12.021)
65. Corpe CP, Burant CF, Hoekstra JH. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 364-374 (doi: 10.1097/00005176-199904000-00004)
66. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163 (doi: 10.1053/jhep.2001.29628)
67. Cui Y, Bu H, Ma X, Zhao S, Li X, Lu S. The Relation between Serum Uric Acid and HbA1c Is Dependent upon Hyperinsulinemia in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 7184123 (doi: 10.1155/2016/7184123)
68. D'Angelo CM, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MBE. 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. 2015; 50: 355-367
69. Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA. Safety considerations with fibrate therapy. *Am J Cardiol* 2007; 99: 3c-18c (doi: 10.1016/j.amjcard.2006.11.016)
70. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene* 1994; 147: 157-160 (doi: 10.1016/0378-1119(94)90060-4)
71. de LIMA ED. Estudo de despeliculamento da amêndoa da castanha de caju com aplicação de baixas temperaturas e ultra-som, 2009: p.
72. De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 5239-5249 (doi: CPD-EPUB-20130204-12 [pii])
73. DeBosch BJ, Chen Z, Saben JL, Finck BN, Moley KH. Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem* 2014; 289: 10989-10998 (doi: 10.1074/jbc.M113.527002)
74. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Fougelle F, Ferre P, Fauveau V et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 20314-20326 (doi: 10.1074/jbc.M312475200)

75. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 2006; 86: 465-514 (doi: 10.1152/physrev.00025.2005)
76. Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000; 36: 851-855 (doi: 10.1161/01.hyp.36.5.851)
77. Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* 2018; 10: (doi: 10.3390/nu10060761)
78. Dong B, Kan CF, Singh AB, Liu J. High-fructose diet downregulates long-chain acyl-CoA synthetase 3 expression in liver of hamsters via impairing LXR/RXR signaling pathway. *J Lipid Res* 2013; 54: 1241-1254 (doi: 10.1194/jlr.M032599)
79. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-1351 (doi: 10.1172/JCI23621)
80. Dotimas JR, Lee AW, Schmider AB, Carroll SH, Shah A, Bilen J et al. Diabetes regulates fructose absorption through thioredoxin-interacting protein. *Elife* 2016; 5: (doi: 10.7554/eLife.18313)
81. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E227-237 (doi: 10.1152/ajpendo.90245.2008)
82. Douard V, Ferraris RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J Physiol* 2013; 591: 401-414 (doi: 10.1113/jphysiol.2011.215731)
83. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992; 68: 879-887 (doi: 10.1016/0092-8674(92)90031-7)
84. Dubois V, Eeckhoute J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest* 2017; 127: 1202-1214 (doi: 10.1172/jci88894)
85. Duhart JM, Brocardo L, Mul Fedele ML, Guglielmotti A, Golombek DA. CCL2 mediates the circadian response to low dose endotoxin. *Neuropharmacology* 2016; 108: 373-381 (doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.005)
86. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alagband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet* 1995; 346: 120-121 (doi: 10.1016/s0140-6736(95)92143-5)
87. Dunnett CWJotASA. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. 1980; 75: 796-800

88. Dushay JR, Toschi E, Mitten EK, Fisher FM, Herman MA, Maratos-Flier E. Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol Metab* 2015; 4: 51-57 (doi: 10.1016/j.molmet.2014.09.008)
89. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86: 839-848 (doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018)
90. Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus P. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2020; 158: 1999-2014 e1991 (doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312)
91. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004; 10: 355-361 (doi: 10.1038/nm1025)
92. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* 2005; 54: 1907-1913 (doi: 10.2337/diabetes.54.7.1907)
93. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 18779-18789 (doi: 10.1074/jbc.272.30.18779)
94. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 1998; 438: 55-60 (doi: 10.1016/s0014-5793(98)01273-3)
95. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 120-159 (doi: 10.1016/j.plipres.2005.12.002)
96. Feng L, Luo H, Xu Z, Yang Z, Du G, Zhang Y et al. Bavachinin, as a novel natural pan-PPAR agonist, exhibits unique synergistic effects with synthetic PPAR- γ and PPAR- α agonists on carbohydrate and lipid metabolism in db/db and diet-induced obese mice. *Diabetologia* 2016; 59: 1276-1286 (doi: 10.1007/s00125-016-3912-9)
97. Fernández-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, Cucarella C, Muntané J, Casado M. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 2011; 286: 21466-21477 (doi: 10.1074/jbc.M110.209973)
98. Ferreira TdAM. Síntese de derivados do cardanol e avaliação sobre receptores ativados por proliferadores peroxissomais. 2018;
99. Foufelle F, Ferré P. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 291-296 (doi: 10.1051/medsci/2007233291)
100. Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty

liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123: 259-270 (doi: 10.1042/cs20110373)

101. Frederico MJ, Vitto MF, Cesconetto PA, Engelmann J, De Souza DR, Luz G et al. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. 2011; 46: 1381-1388

102. Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 873s-880s (doi: 10.1093/ajcn/78.4.873S)

103. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. 2008; 88: 125-172

104. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab* 2012; 15: 623-634 (doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.007)

105. Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell* 2016; 27: 1536-1551 (doi: 10.1091/mbc.E16-01-0039)

106. Galligan JJ, Smathers RL, Shearn CT, Fritz KS, Backos DS, Jiang H et al. Oxidative Stress and the ER Stress Response in a Murine Model for Early-Stage Alcoholic Liver Disease. *J Toxicol* 2012; 2012: 207594 (doi: 10.1155/2012/207594)

107. Gambaro SE, Zubiría MG, Portales AE, Rey MA, Rumbo M, Giovambattista AJTJoNB. M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. 2018; 61: 173-182

108. Gandhi CR. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *J Hepatol* 2017; 67: 1104-1105 (doi: 10.1016/j.jhep.2017.06.001)

109. Garcia AF. 2009. Análises filogenéticas no gênero *Anacardium*. In: Universidade de São Paulo.

110. Ghaemi A, Taleban FA, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z et al. How Much Weight Loss is Effective on Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Hepat Mon* 2013; 13: e15227 (doi: 10.5812/hepatmon.15227)

111. Ghonem NS, Assis DN, Boyer JL. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* 2015; 62: 635-643 (doi: 10.1002/hep.27744)

112. Gilardi F, Giudici M, Mitro N, Maschi O, Guerrini U, Rando G et al. LT175 is a novel PPAR α/γ ligand with potent insulin-sensitizing effects and reduced adipogenic properties. *J Biol Chem* 2014; 289: 6908-6920 (doi: 10.1074/jbc.M113.506394)

113. Gonzaga WA. Preparação e avaliação farmacológica de derivados dos lipídios fenólicos do líquido da casca da castanha de caju. 2008;

114. Green CJ, Marjot T, Tomlinson JW, Hodson L. Of mice and men: Is there a future for metformin in the treatment of hepatic steatosis? *Diabetes Obes Metab* 2019; 21: 749-760 (doi: 10.1111/dom.13592)
115. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 36-49 (doi: 10.1038/nrendo.2016.135)
116. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 2014a; 13: 17 (doi: 10.1186/1475-2891-13-17)
117. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. 2014b; 13: 17
118. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspé E, Madsen L, Poulain P, Derudas B et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 2000; 275: 16638-16642 (doi: 10.1074/jbc.275.22.16638)
119. Guimarães J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2019a; 140: 64-71 (doi: 10.1016/j.plefa.2018.11.005)
120. Guimarães J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Leukotrienes, Acids EF. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. 2019b; 140: 64-71
121. Haas JT, Miao J, Chanda D, Wang Y, Zhao E, Haas ME et al. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab* 2012; 15: 873-884 (doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.002)
122. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *Faseb j* 1990; 4: 2652-2660 (doi: 10.1096/fasebj.4.9.2189777)
123. Hamad FB, Mubofu EB. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *Int J Mol Sci* 2015a; 16: 8569-8590 (doi: 10.3390/ijms16048569)
124. Hamad FB, Mubofu EB, JIJMS. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. 2015b; 16: 8569-8590
125. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest* 2018; 128: 545-555 (doi: 10.1172/jci96702)
126. Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 724s-732s (doi: 10.1093/ajcn/58.5.724S)
127. Hashimoto H, Yamamoto M, Sugiura E, Abe H, Kagawa T, Goto M et al. Adiponectin deficiency-induced diabetes increases TNF α and FFA via downregulation of PPAR α . *J Vet Med Sci* 2018; 80: 662-666 (doi: 10.1292/jvms.17-0641)

128. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999; 30: 77-87 (doi: 10.1016/s0168-8278(99)80010-5)
129. Henke BR. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 2004; 47: 4118-4127 (doi: 10.1021/jm030631e)
130. Herman MA, Samuel VT. The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27: 719-730 (doi: 10.1016/j.tem.2016.06.005)
131. Hong F, Xu P, Zhai Y. The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. *Int J Mol Sci* 2018; 19: (doi: 10.3390/ijms19082189)
132. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-917 (doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034)
133. Hu Y, Semova I, Sun X, Kang H, Chahar S, Hollenberg AN et al. Fructose and glucose can regulate mammalian target of rapamycin complex 1 and lipogenic gene expression via distinct pathways. *J Biol Chem* 2018; 293: 2006-2014 (doi: 10.1074/jbc.M117.782557)
134. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, Hellerstein MK. A dual sugar challenge test for lipogenic sensitivity to dietary fructose. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 861-868 (doi: 10.1210/jc.2010-2007)
135. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54 (doi: 10.1002/hep.20280)
136. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 2010; 107: 579-591 (doi: 10.1161/circresaha.110.225698)
137. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4543-4547 (doi: 10.1073/pnas.0400356101)
138. Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 370-374 (doi: 10.1006/bbrc.1998.8622)
139. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R et al. Dual PPAR α/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int* 2018; 38: 1084-1094 (doi: 10.1111/liv.13634)
140. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 2018; 27: 351-361.e353 (doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.016)

141. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, Nubret E, Sarfati G, Bergheim I et al. Citrulline and Nonessential Amino Acids Prevent Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *J Nutr* 2015; 145: 2273-2279 (doi: 10.3945/jn.115.218982)
142. Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9030230)
143. Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 747-753 (doi: 10.1016/j.bbali.2011.09.017)
144. Jia Z, Sun Y, Yang G, Zhang A, Huang S, Heiney KM et al. New Insights into the PPAR γ Agonists for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *PPAR Res* 2014; 2014: 818530 (doi: 10.1155/2014/818530)
145. Jones HF, Butler RN, Brooks DA. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G202-206 (doi: 10.1152/ajpgi.00457.2010)
146. Jun M, Zhu B, Tonelli M, Jardine MJ, Patel A, Neal B et al. Effects of fibrates in kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 2061-2071 (doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.049)
147. Junqueira LC, Carneiro JJRdJG. *Histologia Básica*. Ed. 2013;
148. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 2006; 281: 26602-26614 (doi: 10.1074/jbc.M601284200)
149. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494-1505 (doi: 10.1172/jci26498)
150. Kendall DM, Rubin CJ, Mohideen P, Ledezine JM, Belder R, Gross J et al. Improvement of glycemic control, triglycerides, and HDL cholesterol levels with muraglitazar, a dual (alpha/gamma) peroxisome proliferator-activated receptor activator, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy: A double-blind, randomized, pioglitazone-comparative study. *Diabetes Care* 2006; 29: 1016-1023 (doi: 10.2337/diacare.2951016)
151. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421-424 (doi: 10.1038/35013000)
152. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-1498 (doi: 10.1172/jci6223)
153. Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2

diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 2003; 52: 1770-1778 (doi: 10.2337/diabetes.52.7.1770)

154. Kim M, Astapova II, Flier SN, Hannou SA, Doridot L, Sargsyan A et al. Intestinal, but not hepatic, ChREBP is required for fructose tolerance. *JCI Insight* 2017; 2: (doi: 10.1172/jci.insight.96703)

155. Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY et al. Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem* 2009; 284: 15071-15083 (doi: 10.1074/jbc.M109.006742)

156. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7355-7359 (doi: 10.1073/pnas.91.15.7355)

157. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 3417-3427 (doi: 10.1210/en.2004-1468)

158. 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 (doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.109)

159. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19: 210-215 (doi: 10.3350/cmh.2013.19.3.210)

160. Kostadinova R, Wahli W, Michalik L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2995-3009 (doi: 10.2174/092986705774462905)

161. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; 51: 85-94 (doi: 10.1016/j.phrs.2004.07.012)

162. Laganà AS, Vitale SG, Nigro A, Sofo V, Salmeri FM, Rossetti P et al. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Dysregulated Metabolic Homeostasis, Inflammation and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2016; 17: (doi: 10.3390/ijms17070999)

163. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014; 146: 726-735 (doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.049)

164. Lê KA, Faeh D, Stettler R, Debard C, Loizon E, Vidal H et al. Effects of four-week high-fructose diet on gene expression in skeletal muscle of healthy men. *Diabetes Metab* 2008; 34: 82-85 (doi: 10.1016/j.diabet.2007.08.004)

165. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 2003; 302: 453-457 (doi: 10.1126/science.1087344)

166. Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3444-3449 (doi: 10.1073/pnas.0511253103)
167. Lee HJ, Cha JY. Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism. *BMB Rep* 2018; 51: 429-436 (doi:10.5483/BMBRep.2018.51.9.197)
168. Lee UE, Friedman SLJBp, gastroenterology rC. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. 2011; 25: 195-206
169. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116: 571-580 (doi: 10.1172/jci27989)
170. Lefere S, Puengel T, Hundertmark J, Penners C, Frank AK, Guillot A et al. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages(☆). *J Hepatol* 2020; 73: 757-770 (doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.025)
171. Letavernier E, Perez J, Joye E, Bellocq A, Fouqueray B, Haymann JP et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2395-2402 (doi: 10.1681/asn.2004090802)
172. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M, Stolarczyk E, Tobin V. The role of GLUT2 in dietary sugar handling. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 529-537 (doi: 10.1007/bf03168378)
173. Li MV, Chen W, Harmancey RN, Nuotio-Antar AM, Imamura M, Saha P et al. Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395: 395-400 (doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.028)
174. 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 (doi: 10.1038/nrgastro.2010.41)
175. Liss KH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* 2017; 136: 65-74 (doi: 10.1016/j.biochi.2016.11.009)
176. Liu X, Green RMJLr. Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. 2019; 3: 55-64
177. Lomonaco D, Mele G, Mazzetto SE. 2017. Cashew nutshell liquid (CNSL): from an agro-industrial waste to a sustainable alternative to petrochemical resources. In: *Cashew Nut Shell Liquid*: Springer. p 19-38.
178. Luo Y, Burrington CM, Graff EC, Zhang J, Judd RL, Suksaranjit P et al. Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310: E418-439 (doi: 10.1152/ajpendo.00319.2015)

179. Lustig RH, Schmidt LA, Brindis CD. Public health: The toxic truth about sugar. *Nature* 2012; 482: 27-29 (doi: 10.1038/482027a)
180. Ma J, Fox CS, Jacques PF, Speliotes EK, Hoffmann U, Smith CE et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol* 2015; 63: 462-469 (doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.032)
181. Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 2013; 8: e64258 (doi: 10.1371/journal.pone.0064258)
182. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. 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. *Endocrine* 2015; 50: 355-367 (doi: 10.1007/s12020-015-0590-1)
183. Mahata D, Mandal SM, Bharti R, Gupta VK, Mandal M, Nag A et al. Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. 2014; 69: 5-11
184. Maia-Ceciliano TC, Dutra RR, Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: Lessons of chronic fructose-rich diet in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 192: 105399 (doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105399)
185. Maia FJN, Ribeiro FWP, Rangel JHG, Lomonaco D, Luna FMT, de Lima-Neto P et al. Evaluation of antioxidant action by electrochemical and accelerated oxidation experiments of phenolic compounds derived from cashew nut shell liquid. 2015; 67: 281-286
186. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011; 54: 795-809 (doi: 10.1016/j.jhep.2010.11.005)
187. Mannaerts I, Leite SB, Verhulst S, Claerhout S, Eysackers N, Thoen LF et al. The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J Hepatol* 2015; 63: 679-688 (doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.011)
188. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003; 111: 737-747 (doi: 10.1172/jci17223)
189. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 797-802 (doi: 10.2337/diabetes.51.3.797)
190. Mazzetto SE, Lomonaco D, Mele GJQN. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. 2009; 32: 732-741 (doi:

191. McEwan IJ. Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol* 2009; 505: 3-18 (doi: 10.1007/978-1-60327-575-0_1)
192. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 7-18 (doi: 10.2337/diabetes.51.1.7)
193. McKenna NJ, O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 2002; 143: 2461-2465 (doi: 10.1210/endo.143.7.8892)
194. Meyers AM, Mourra D, Beeler JA. High fructose corn syrup induces metabolic dysregulation and altered dopamine signaling in the absence of obesity. *PLoS One* 2017; 12: e0190206 (doi: 10.1371/journal.pone.0190206)
195. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 726-741 (doi: 10.1124/pr.58.4.5)
196. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* 2006; 116: 598-606 (doi: 10.1172/jci27958)
197. Michalik L, Wahli W. PPARs Mediate Lipid Signaling in Inflammation and Cancer. *PPAR Res* 2008; 2008: 134059 (doi: 10.1155/2008/134059)
198. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition* 2020a; 78: 110791 (doi: 10.1016/j.nut.2020.110791)
199. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello VJN. PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat and high-fructose-fed mice. 2020b; (em impressão, doi: 110791)
200. Mitra S, Sangle G, Tandon R, Sharma S, Roy S, Khanna V et al. Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPAR α /gamma agonist, in db/db mice: adipogenesis/or oedema? *Br J Pharmacol* 2007; 150: 480-487 (doi: 10.1038/sj.bjp.0707000)
201. Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A et al. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *Faseb j* 2011; 25: 2538-2550 (doi: 10.1096/fj.10-173716)
202. Mosca A, Nobili V, De Vito R, Crudele A, Scorletti E, Villani A et al. Serum uric acid concentrations and fructose consumption are independently associated with NASH in children and adolescents. *J Hepatol* 2017; 66: 1031-1036 (doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.025)
203. Motani A, Wang Z, Weiszmann J, McGee LR, Lee G, Liu Q et al. INT131: a selective modulator of PPAR γ . 2009; 386: 1301-1311

204. Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2017; 123: 699-709 (doi: 10.1152/jappphysiol.00154.2017)
205. Moulin S, Seematter G, Seyssel K. Fructose use in clinical nutrition: metabolic effects and potential consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2017; 20: 272-278 (doi: 10.1097/mco.0000000000000376)
206. Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 469-474 (doi: 10.1016/s0165-6147(00)01559-5)
207. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3266-3281 (doi: 10.1128/mcb.26.8.3266-3281.2006)
208. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K et al. 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 (doi: S0014-2999(06)00199-3 [pii]10.1016/j.ejphar.2006.02.028)
209. Nagato AC, Silva MAdS, Trajano ETL, Alves JN, Bandeira ACB, Ferreira TA et al. Quantitative and morphological analyses of different types of human liver. 2011; 28: 275-279
210. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 317-324 (doi: 10.1016/j.tibs.2004.04.006)
211. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2014; 53: 124-144 (doi: 10.1016/j.plipres.2013.12.001)
212. Neto-Ferreira R, Rocha VN, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Pleiotropic effects of rosuvastatin on the glucose metabolism and the subcutaneous and visceral adipose tissue behavior in C57Bl/6 mice. *Diabetol Metab Syndr* 2013; 5: 32 (doi: 10.1186/1758-5996-5-32)
213. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; 356: 2457-2471 (doi: 10.1056/NEJMoa072761)
214. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 203-208 (doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.09.006)
215. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 503-522 (doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03752.x)

216. Oliveira MSC, de Moraes SM, Magalhães DV, Batista WP, Vieira ÍGP, Craveiro AA et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. 2011; 117: 165-170
217. Oriá RB, Brito GdCJSPB. Sistema digestório: integração básico-clínica. 2016;
218. Ornellas F, Carapeto PV, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Sex-linked changes and high cardiovascular risk markers in the mature progeny of father, mother, or both father and mother consuming a high-fructose diet. *Nutrition* 2020; 71: 110612 (doi: 10.1016/j.nut.2019.110612)
219. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389 (doi: 10.1038/sj.cdd.4401373)
220. Paiva FdA, Garrutti DdS, da SILVA NETO RJEAT-D. Aproveitamento industrial do caju. 2000;
221. PAIVA FDAG, D.D.S.; SILVA NETO, R.D. . Aproveitamento industrial do caju. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 2000; 38:
222. Pan DS, Wang W, Liu NS, Yang QJ, Zhang K, Zhu JZ et al. Chiglitazar Preferentially Regulates Gene Expression via Configuration-Restricted Binding and Phosphorylation Inhibition of PPAR γ . *PPAR Res* 2017; 2017: 4313561 (doi: 10.1155/2017/4313561)
223. Panasevich MR, Meers GM, Linden MA, Booth FW, Perfield JW, 2nd, Fritsche KL et al. High-fat, high-fructose, high-cholesterol feeding causes severe NASH and cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018; 314: E78-e92 (doi: 10.1152/ajpendo.00015.2017)
224. Peeters A, Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Baes M. Hepatosteatosis in peroxisome deficient liver despite increased beta-oxidation capacity and impaired lipogenesis. *Biochimie* 2011; 93: 1828-1838 (doi: 10.1016/j.biochi.2011.06.034)
225. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007 (doi: 10.1053/jhep.2003.50398)
226. Peters JM, Hollingshead HE, Gonzalez FJ. Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115: 107-127 (doi: 10.1042/cs20080022)
227. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5119-5128 (doi: 10.1128/mcb.20.14.5119-5128.2000)
228. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 1080-1086 (doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.015)

229. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1424-1430 (doi: 10.1210/jc.2010-2129)
230. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 8591-8638 (doi: 10.3390/ijms15058591)
231. Phani Kumar P, Paramashivappa R, Vithayathil P, Subba Rao P, Srinivasa Rao AJJoA, Chemistry F. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. 2002; 50: 4705-4708
232. Poulsen L, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23: 631-639 (doi: 10.1016/j.semcd.2012.01.003)
233. Powell ES, Smith-Taillie LP, Popkin BM. Added Sugars Intake Across the Distribution of US Children and Adult Consumers: 1977-2012. *J Acad Nutr Diet* 2016; 116: 1543-1550.e1541 (doi: 10.1016/j.jand.2016.06.003)
234. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 402: 86-94 (doi: 10.1016/j.mce.2014.12.027)
235. Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential actions of PPAR- α and PPAR- β/δ on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. *PLoS One* 2018; 13: e0191365 (doi: 10.1371/journal.pone.0191365)
236. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res* 2010; 2010: (doi: 10.1155/2010/612089)
237. Raminelli RJJI. Escritos, imagens e artefatos: ou a viagem de Thevet à França Antártica. *História* [online]. 2008, vol. 27, n. 1. 1980; 4369: 195-212
238. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 193-230 (doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.193)
239. 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 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)
240. Rendeiro C, Masnik AM, Mun JG, Du K, Clark D, Dilger RN et al. Fructose decreases physical activity and increases body fat without affecting hippocampal neurogenesis and learning relative to an isocaloric glucose diet. *Sci Rep* 2015; 5: 9589 (doi: 10.1038/srep09589)

241. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 926-935 (doi: 10.1016/j.bbaliip.2007.02.013)
242. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7614-7619 (doi: 10.1073/pnas.95.13.7614)
243. Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E et al. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2628-2644 (doi: 10.1210/me.2002-0036)
244. Rigano D, Sirignano C, Tagliatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharm Sin B* 2017; 7: 427-438 (doi: 10.1016/j.apsb.2017.05.005)
245. Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, Ransac S, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2020; 1861: 148276 (doi: 10.1016/j.bbabiio.2020.148276)
246. Rios J, Recio M, Escandell J, Andujar IJCpd. Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. 2009; 15: 1212-1237
247. Rodrigues A, Costa ABP, Campos DL, Silva MPS, Cândido AL, Santos LCD et al. Low validity of predictive equations for calculating resting energy expenditure in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *J Hum Nutr Diet* 2018; 31: 266-275 (doi: 10.1111/jhn.12498)
248. Rodrigues FHA, Feitosa J, Ricardo NM, França FCFd, Carioca JOBJJotBCS. Antioxidant activity of cashew nut shell liquid (CNSL) derivatives on the thermal oxidation of synthetic cis-1, 4-polyisoprene. 2006; 17: 265-271
249. Rosenson RS. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2007; 99: 96b-104b (doi: 10.1016/j.amjcard.2006.11.010)
250. Rumessen JJ. Fructose and related food carbohydrates. Sources, intake, absorption, and clinical implications. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 819-828 (doi: 10.3109/00365529209000148)
251. Rumessen JJ, Gudmand-Høyer E. Absorption capacity of fructose in healthy adults. Comparison with sucrose and its constituent monosaccharides. *Gut* 1986; 27: 1161-1168 (doi: 10.1136/gut.27.10.1161)
252. Sá FdO. Avaliação do efeito imunomodulador in vitro dos derivados LDT409 e LDT540A, planejados a partir do cardanol, em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA. 2019;

253. Sadowska J, Bruszkowska M. Comparing the effects of sucrose and high-fructose corn syrup on lipid metabolism and the risk of cardiovascular disease in male rats. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2017; 16: 231-240 (doi: 10.17306/j.Afs.0482)
254. Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opin Pharmacother* 2014; 15: 493-503 (doi: 10.1517/14656566.2014.876992)
255. Sahin C. 2017. Characterizing Novel PPAR Agonists Derived from Cashew Nut Shell Liquid for Treatment of Metabolic Disease. In: University of Toronto (Canada).
256. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H et al. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2014; 44: 460-473 (doi: 10.1111/hepr.12140)
257. Sakai J. [Activation of "fat burning sensor" peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome]. *Seikagaku* 2004; 76: 517-524
258. Salvado L, Barroso E, Gomez-Foix AM, Palomer X, Michalik L, Wahli W et al. PPARbeta/delta prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 2014; 57: 2126-2135 (doi: 10.1007/s00125-014-3331-8)
259. Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S et al. Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *Eur J Nutr* 2010; 49: 1-9 (doi: 10.1007/s00394-009-0042-x)
260. Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, Fu X, He TT, Méndez-Lucas A et al. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res* 2012; 53: 1080-1092 (doi: 10.1194/jlr.M023382)
261. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 2003; 52: 910-917 (doi: 10.2337/diabetes.52.4.910)
262. 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 (doi: 10.1152/ajpendo.00513.2004)
263. 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 (doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x)
264. Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food Funct* 2015; 6: 1684-1691 (doi: 10.1039/c5fo00251f)

265. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64: 273-282 (doi: 10.1016/j.etp.2010.08.019)
266. 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 (doi: 10.3390/ijms141121873)
267. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2020; 158: 1913-1928 (doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.311)
268. Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a016709 (doi: 10.1101/cshperspect.a016709)
269. Sferra R, Vetuschi A, Pompili S, Gaudio E, Specca S, Latella G. Expression of pro-fibrotic and anti-fibrotic molecules in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *Pathol Res Pract* 2017; 213: 58-65 (doi: 10.1016/j.prp.2016.11.004)
270. SHARMA SKA, M. Phytochemical investigation of stem bark of *Mangifera indica*. *Journal of Indian Chemical Society* 1995; v.72: p. 339-342
271. Shearer BG, Billin AN. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1082-1093 (doi: 10.1016/j.bbali.2007.05.005)
272. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Martins FF, Daleprane JB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linagliptin. *J Endocrinol* 2020; 247: 11-24 (doi: 10.1530/JOE-20-0139)
273. Simoes ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 95: 93-99 (doi: 10.1016/j.biocel.2017.12.019)
274. Skoog SM, Bharucha AE. Dietary fructose and gastrointestinal symptoms: a review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2046-2050 (doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.40266.x)
275. Sobrecases H, Lê KA, Bortolotti M, Schneiter P, Ith M, Kreis R et al. Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men. *Diabetes Metab* 2010; 36: 244-246 (doi: 10.1016/j.diabet.2010.03.003)
276. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1282-1293 (doi: 10.1007/s10620-016-4054-0)
277. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* 2015a; 7: 1012-1019

278. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015b; 7: 1012-1019 (doi: 10.4254/wjh.v7.i8.1012)
279. Souza-Mello V, Gregório BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 239-250 (doi: 10.1042/cs20100061)
280. Sritharan A. 2017. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), phthalates and reproduction in the female zebrafish (*Danio rerio*).
281. Stack AG, Hanley A, Casserly LF, Cronin CJ, Abdalla AA, Kiernan TJ et al. Independent and conjoint associations of gout and hyperuricaemia with total and cardiovascular mortality. *Qjm* 2013; 106: 647-658 (doi: 10.1093/qjmed/hct083)
282. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1322-1334 (doi: 10.1172/jci37385)
283. Stefanescu H, Lupsor-Platon M, Badea RI. The devil's triangle of steatosis, obesity, and liver stiffness. *Hepatology* 2016; 63: 1392-1393 (doi: 10.1002/hep.27948)
284. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007; 2007: 95974 (doi: 10.1155/2007/95974)
285. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2007; 28: 551-558 (doi: 10.1016/j.it.2007.09.003)
286. Suk KT, Kim DJ. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 13: 193-204 (doi: 10.1080/17474124.2019.1569513)
287. Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9: 89 (doi: 10.1186/1743-7075-9-89)
288. Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, He X, Sidiqi AM, Tolosa MF et al. YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF- β -Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 3117-3128 (doi: 10.1681/asn.2015050499)
289. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 2010; 107: 839-850 (doi: 10.1161/circresaha.110.224766)
290. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 809-818 (doi: S1388-1981(11)00220-4 [pii])
291. 10.1016/j.bbaliip.2011.10.016)

292. Tain YL, Hsu CN, Chan JY. PPARs Link Early Life Nutritional Insults to Later Programmed Hypertension and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci* 2015; 17: (doi: 10.3390/ijms17010020)
293. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15539-15548 (doi: 10.3748/wjg.v20.i42.15539)
294. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20704-20728 (doi: 10.3390/ijms141020704)
295. Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X et al. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol* 2016; 230: 227-237 (doi: 10.1530/joe-16-0142)
296. Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 2010; 90: 23-46 (doi: 10.1152/physrev.00019.2009)
297. Tappy L, Lê KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 2010; 26: 1044-1049 (doi: 10.1016/j.nut.2010.02.014)
298. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4: 14 (doi: 10.1186/1475-2840-4-14)
299. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9090981)
300. Theytaz F, de Giorgi S, Hodson L, Stefanoni N, Rey V, Schneiter P et al. Metabolic fate of fructose ingested with and without glucose in a mixed meal. *Nutrients* 2014; 6: 2632-2649 (doi: 10.3390/nu6072632)
301. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E141-145 (doi: 10.1152/ajpendo.00712.2009)
302. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 145-171 (doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102132)
303. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 1994a; 22: 5628-5634 (doi: 10.1093/nar/22.25.5628)
304. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994b; 8: 1224-1234 (doi: 10.1101/gad.8.10.1224)

305. Topping DL, Mayes PA. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism. *Biochem J* 1972; 126: 295-311 (doi: 10.1042/bj1260295)
306. Toral M, Romero M, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017; 312: H189-h200 (doi: 10.1152/ajpheart.00155.2016)
307. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-355 (doi: 10.1079/bjn20041213)
308. Trovato FM, Castrogiovanni P, Szychlinska MA, Purrello F, Musumeci G. Early effects of high-fat diet, extra-virgin olive oil and vitamin D in a sedentary rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Histol Histopathol* 2018; 33: 1201-1213 (doi: 10.14670/hh-18-008)
309. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 397-411 (doi: 10.1038/nrgastro.2017.38)
310. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354: 141-148 (doi: 10.1016/s0140-6736(98)10364-1)
311. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444: 875-880 (doi: 10.1038/nature05487)
312. Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, Boucard N, Corthésy-Theulaz I, Wahli W et al. PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology* 2006; 131: 538-553 (doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.004)
313. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie* 2017; 140: 106-116 (doi: 10.1016/j.biochi.2017.07.003)
314. Velickovic N, Teofilovic A, Ilic D, Djordjevic A, Vojnovic Milutinovic D, Petrovic S et al. Modulation of hepatic inflammation and energy-sensing pathways in the rat liver by high-fructose diet and chronic stress. *Eur J Nutr* 2018; (em impressão, doi: 10.1007/s00394-018-1730-1)
315. 10.1007/s00394-018-1730-1 [pii]: (doi: 10.1007/s00394-018-1730-1)
316. 10.1007/s00394-018-1730-1 [pii])
317. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285 (doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x)

318. Wagner KD, Wagner N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther* 2010; 125: 423-435 (doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.12.001)
319. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 351-363 (doi: S1043-2760(12)00070-7 [pii] 10.1016/j.tem.2012.05.001)
320. Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res* 2010; 20: 124-137 (doi: 10.1038/cr.2010.13)
321. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170 (doi: 10.1016/s0092-8674(03)00269-1)
322. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004; 2: e294 (doi: 10.1371/journal.pbio.0020294)
323. Watson L, Dallwitz MJ. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval: University of New Orleans New Orleans, LA, 1999: p.
324. Weidner C, de Groot JC, Prasad A, Freiwald A, Quedenau C, Kliem M et al. Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 7257-7262 (doi: 10.1073/pnas.1116971109)
325. Weidner C, Wowro SJ, Freiwald A, Kawamoto K, Witzke A, Kliem M et al. Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonist with potent glucose-lowering properties. *Diabetologia* 2013; 56: 1802-1812 (doi: 10.1007/s00125-013-2920-2)
326. Wettstein G, Luccarini JM, Poekes L, Faye P, Kupkowski F, Adarbes V et al. The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatol Commun* 2017; 1: 524-537 (doi: 10.1002/hep4.1057)
327. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 386-395 (doi: 10.1055/s-0028-1091983)
328. Wiernsperger N, Geloën A, Rapin JR. Fructose and cardiometabolic disorders: the controversy will, and must, continue. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65: 729-738 (doi: 10.1590/s1807-59322010000700013)
329. Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 44-54 (doi: 10.1055/s-2006-960170)
330. Wong VW, Singal AK. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2019; 4: 53 (doi: 10.21037/tgh.2019.06.06)

331. Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lütjohann D, Kerksiek A et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett* 2010; 584: 1001-1005 (doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.046)
332. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; 48: 474-486 (doi: 10.1002/hep.22363)
333. Wu TC, Chen LK, Tsai SH, Liaw YH, Hwang B. Hepatic steatosis: an experimental model for quantification. *Arch Gerontol Geriatr* 2011; 52: 164-166 (doi: 10.1016/j.archger.2010.03.009)
334. Xu C, Lu A, Lu X, Zhang L, Fang H, Zhou L et al. Activation of renal (pro) renin receptor contributes to high fructose-induced salt sensitivity. 2017; 69: 339-348
335. Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F et al. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol* 2016; 229: 133-144 (doi: 10.1530/joe-15-0409)
336. Yamada H, Kikuchi S, Hakozaiki M, Motodate K, Nagahora N, Hirose MJ. 8-hydroxyeicosapentaenoic acid decreases plasma and hepatic triglycerides via activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in high-fat diet-induced obese mice. 2016; 2016
337. Yang T, Soodvilai S. Renal and vascular mechanisms of thiazolidinedione-induced fluid retention. *PPAR Res* 2008; 2008: 943614 (doi: 10.1155/2008/943614)
338. Ye J. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 405-408 (doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.068)
339. Yoshida H. ER stress and diseases. *Febs j* 2007; 274: 630-658 (doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x)
340. Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 68-82 (doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01383.x)
341. Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 936-951 (doi: 10.1016/j.bbalip.2007.01.008)
342. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293: 1673-1677 (doi: 10.1126/science.1061620)
343. Yuliana M, Nguyen-Thi BT, Faika S, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ju Y-H. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography. 2014; 45: 2187-2193 (doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.046)

344. Zámbo V, Simon-Szabó L, Szelényi P, Kereszturi E, Bánhegyi G, Csala M. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol* 2013; 5: 550-557 (doi: 10.4254/wjh.v5.i10.550)
345. Zamudio-Cuevas Y, Hernández-Díaz C, Pineda C, Reginato AM, Cerna-Cortés JF, Ventura-Ríos L et al. Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy. *Clin Rheumatol* 2015; 34: 1667-1672 (doi: 10.1007/s10067-015-2933-y)
346. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9040335)
347. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014a; 20: 1768-1776 (doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1768)
348. Zhang Y, Yu L, Cai W, Fan S, Feng L, Ji G et al. Protopanaxatriol, a novel PPAR γ antagonist from *Panax ginseng*, alleviates steatosis in mice. *Sci Rep* 2014b; 4: 7375 (doi: 10.1038/srep07375)
349. Zhao M, Zang B, Cheng M, Ma Y, Yang Y, Yang N. Differential responses of hepatic endoplasmic reticulum stress and inflammation in diet-induced obese rats with high-fat diet rich in lard oil or soybean oil. *PLoS One* 2013; 8: e78620 (doi: 10.1371/journal.pone.0078620)
350. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS et al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7921-7925 (doi: 10.1073/pnas.92.17.7921)
351. Zhuang X, Sun F, Li L, Jiang D, Li X, Sun A et al. Therapeutic Effect of Metformin on Chemerin in Non-Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Clin Lab* 2015; 61: 1409-1414 (doi: 10.7754/clin.lab.2015.150211)

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do derivado LDT409 - agonista PPAR planejado a partir do líquido da casca da castanha de caju para tratamento da obesidade induzida por dieta rica em frutose**", registrada com o nº 042/2018, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 31/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	60
Peso/Idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Submissão do artigo de revisão (Minor revision European Journal of Nutrition)

Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

EJON: Submission Confirmation for EJON-D-20-00853R1

2 mensagens

Editorial Office (EJON) <em@editorialmanager.com>
Responder a: "Editorial Office (EJON)" <eurjnutr@gmail.com>
Para: Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

16 de janeiro de 2021 20:54

Ref.: Ms. No. EJON-D-20-00853R1
Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas

Dear Prof. Souza-Mello,

European Journal of Nutrition has received your revised submission.

You may check the status of your manuscript by accessing the Journal's website.

Your username is: souza-mellov

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/ejon/>.

Thank you very much.

Kind regards,
Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition