



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

Iara Karise dos Santos Mendes

**Metformina, fígado e tecido adiposo marrom:
lições do modelo de dieta com frutose em camundongos**

Rio de Janeiro

2019

Iara Karise dos Santos Mendes

**Metformina, fígado e tecido adiposo marrom:
lições do modelo de dieta com frutose em camundongos**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2019

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

M538 Mendes, Iara Karise dos Santos.
Metformina, fígado e tecido adiposo marrom: lições do modelo de dieta com frutose em camundongos / Iara Karise dos Santos Mendes. – 2019.
88 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.

Coorientadora: Cristiane Matsuura.

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

1. Frutose – Metabolismo – Teses. 2. Esteatose hepática – Fisiopatologia – Teses. 3. Stress oxidativo – Teses. 4. Metformina – Metabolismo – Teses. 5. Fígado – Metabolismo – Teses. 6. Tecido adiposo marrom – Teses. 7. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Matsuura, Cristiane. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 547.455.633:616.36

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Iara Karise dos Santos Mendes

**Metformina, fígado e tecido adiposo marrom:
lições do modelo de dieta com frutose em camundongos**

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

Aprovada em 19 de março de 2019.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Eliete Bouskela
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Mariano del Sol
Universidad de la Frontera

Prof. Dr. Marco Aurélio Martins
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Goreti e Francisco Mendes por se absterem de muitas coisas para que eu pudesse chegar aqui. Todo o meu amor e gratidão por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. Vocês trabalharam, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus. Por tudo sou infinitamente grata. Se eu cheguei até aqui foi graças a toda essa dedicação, amo vocês!

À Ana Beatriz. Para alguns laços de parentesco, não existe denominação correta. Obrigada por acolher a minha/nossa família no seu coração.

À Manuela, Olavo e Lelinho pelo simples fato de existirem.

Aos meus amigos mais íntimos, Nathalia Pinto, Camila Scavone e Luciana Melquíades que sempre estiveram ao meu lado, independentemente de ser um momento de alegria ou tristeza. Obrigada por sempre me estenderem a mão, em especial nos últimos meses.

À Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda. Obrigada por todas as oportunidades, por entender meus erros, aceitar minhas limitações e me incentivar a melhorar sempre. Obrigada pelas conversas e por todas às vezes em que me senti acolhida. Obrigada por me ajudar a realizar o meu sonho de ser uma excelente professora.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda. Obrigada por me acolher, confiar no meu trabalho e extrair de mim o meu melhor. O tenho como um grande exemplo de pesquisador e profissional. Obrigada por me emprestar seus ombros.

À Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura pelo auxílio em todos os momentos. Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir, a pegar na minha mão e me conduzir sempre que me senti perdida.

Aos meus amados do LTM por tornarem a caminhada mais leve.

Obrigada a TODOS os meus amigos do LMMC. Obrigada pelos “cafezes” e por SEMPRE guardarem as cadeiras azuis para mim. Vocês são sensacionais.

Obrigada em especial a Aline, Thereza, Celina, Fernanda e Tamiris. Não consigo achar palavras para expressar o quanto aprendo com vocês e o quanto sou grata por me tornarem um ser humano melhor. Estou certa de que os laços só irão se estreitar ao longo da vida.

Aos que saíram da minha vida, obrigada também. É preciso abrir espaço para o novo sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O segredo do sucesso está na constância do propósito.

Benjamin Disraeli

RESUMO

MENDES, Iara Karise dos Santos. *Metformina, fígado e tecido adiposo marrom: lições do modelo de dieta com frutose em camundongos*. 2019. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O consumo contínuo de frutose causa alterações metabólicas adversas e pode levar à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Aqui, nosso objetivo foi investigar o papel do cloridrato de metformina em um modelo animal alimentado com uma dieta rica em frutose, com foco nos marcadores moleculares de lipogênese, beta-oxidação e defesas antioxidantes no fígado. Além disso, a estrutura e marcadores termogênicos do tecido adiposo marrom (TAM) foram estudados. Camundongos C57BL/6 machos, com três meses de idade, foram divididos em grupo controle (C, alimentado com dieta padrão para roedores) e frutose (F, alimentados com dieta rica em frutose) por dez semanas. Em seguida, cada grupo foi dividido, metade dos animais recebeu cloridrato de metformina (M, 250 mg/kg/dia), a outra metade recebeu veículo por mais oito semanas: controle (C), controle+metformina (CM), frutose (F) e frutose+metformina (FM). No fígado, a frutose aumentou a esteatose hepática, a resistência à insulina e diminuiu a sensibilidade à insulina, associada a elevadas expressões gênicas e proteicas relativas à lipogênese *de novo* e ao aumento da peroxidação lipídica. Além disso, a frutose diminuiu as expressões gênicas e proteicas de enzimas antioxidantes e de biogênese mitocondrial. A metformina reduziu a lipogênese *de novo* e aumentou a biogênese mitocondrial, aumentando assim a beta-oxidação e reduzindo a peroxidação lipídica. A metformina regulou positivamente a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, fornecendo uma defesa contra o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. Portanto, uma redução significativa no acúmulo de triglicérides hepáticos, esteatose e peroxidação lipídica foi observada no grupo FM. Os coxins gordurosos e a adiposidade não se alteraram significativamente nos grupos, embora o grupo F tenha apresentado redução do consumo energético, e ambos os grupos F e FM apresentaram redução do gasto energético. A metformina aumentou a massa do TAM em CM e FM, associada a uma maior proliferação e diferenciação de adipócitos, em parte pela ativação do pAMK. A metformina também aumentou os marcadores termogênicos no TAM, através de estímulos adrenérgicos e fator de crescimento de fibroblastos 21. No TAM, a metformina reforçou a biogênese mitocondrial, a lipólise e a absorção de ácidos graxos. Esses achados permitem concluir que uma dieta rica em frutose afeta o fígado e o TAM, aumentando a lipogênese *de novo*, reduzindo as defesas antioxidantes e diminuindo a biogênese mitocondrial. O tratamento com metformina, mesmo na continuação da ingestão de frutose, pode reverter, pelo menos parcialmente, a lesão hepática e impedir a progressão da DHGNA para estados mais graves. Os efeitos da metformina não estão ligados a alterações na massa corporal, mas afetam a termogênese do TAM, a biogênese mitocondrial e a absorção de ácidos graxos.

Palavras-chave: Frutose. Esteatose hepática. Estresse oxidativo. Metformina. Tecido adiposo marrom.

ABSTRACT

MENDES, Iara Karise dos Santos. *Metformin, liver and brown adipose tissue: lessons from the dietary model with fructose in mice*. 2019. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The continuous consumption of fructose causes adverse metabolic changes and might lead to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Here, we aimed to investigate the role of metformin hydrochloride in an animal model fed a fructose rich diet, focusing on the molecular markers of lipogenesis, beta-oxidation, and antioxidant defenses in the liver. Also, the structure and thermogenic markers of the brown adipose tissue (BAT) were studied. Male C57BL/6 mice, three months old were divided into a control group (C, fed a standard diet for rodents) and fructose group (F, fed a fructose rich diet) for ten weeks. Then, each group was divided, half of the animals received metformin hydrochloride (M, 250 mg/kg/day), the other half received vehicle for an additional eight weeks: control (C), control+metformin (CM), fructose (F), and fructose+metformin (FM). In the liver, fructose increased hepatic steatosis, insulin resistance and decreased insulin sensitivity in association with higher gene and protein expressions associated with *de novo* lipogenesis and increased lipid peroxidation. Also, fructose diminished gene and protein expressions of antioxidant enzymes and mitochondrial biogenesis. Metformin reduced *de novo* lipogenesis and increased mitochondrial biogenesis, thereby increasing beta-oxidation and reducing lipid peroxidation. Metformin upregulated the expression and activity of antioxidant enzymes, providing a defense against increased reactive oxygen species generation. Therefore, a significant reduction in hepatic triglyceride accumulation, steatosis and lipid peroxidation was observed in the FM group. The fat pads and adiposity did not change significantly in the groups, although the F group showed a reduction of energy intake, and both groups F and FM showed reduction of energy expenditure. Metformin led to a more massive BAT in CM and FM, associated with a higher adipocyte proliferation and differentiation, in part by activating pAMK. Metformin also enhanced thermogenic markers in the BAT through adrenergic stimuli and fibroblast growth factor 21. In the BAT, metformin might improve mitochondrial biogenesis, lipolysis, and fatty acid uptake. These findings allow us to conclude that a fructose rich diet affects the liver and BAT, increasing *de novo* lipogenesis, reducing the antioxidant defenses, and diminishing mitochondrial biogenesis. Metformin treatment, even in continuing the fructose intake, can reverse, at least partially, the liver injury and prevents NAFLD progression to more severe states. Metformin effects are not linked to body mass changes, but affect BAT thermogenesis, mitochondrial biogenesis, and fatty acid uptake.

Keywords: Fructose. Fatty liver. Oxidative stress. Metformin. Brown adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 –	Composição das dietas utilizadas no experimento.....	28
Figura 1 –	Esquema do desenho experimental utilizado no estudo.....	29
Quadro –	Sequência dos primers utilizados no experimento.....	34
Figura 2 –	Esteatose hepática quantificada através da contagem de pontos.....	40
Tabela 2 –	Dados gerais dos grupos experimentais no período pré e pós-tratamento.....	42
Figura 3 –	Evolução da massa corporal dos quatro grupos estudados ao longo do período experimental.....	44
Figura 4 –	Perfil glicídico dos grupos experimentais após o período de tratamento.....	46
Figura 5 –	Análise da esteatose hepática.....	48
Figura 6 –	Biogênese mitocondrial no fígado.....	49
Figura 7 –	Lipogênese hepática.....	51
Figura 8 –	Expressão gênica de enzimas antioxidantes no tecido hepático.....	53
Figura 9 –	Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica no tecido hepático.....	54
Figura 10 –	Expressão proteica de AMPK no tecido hepático.....	55
Figura 11 –	Estrutura do tecido adiposo subcutâneo.....	56
Figura 12 –	Análise do tecido adiposo marrom.....	57
Figura 13 –	Marcadores de proliferação e diferenciação celular no tecido adiposo marrom.....	58
Figura 14 –	Expressão proteica e gênica de marcadores termogênicos no tecido adiposo marrom.....	60
Figura 15 –	Expressão gênica de marcadores termogênicos no tecido adiposo marrom.....	61
Figura 16 –	Biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom.....	62

Figura 17 –	Expressão gênica e proteica de marcadores de absorção de lipídios no tecido adiposo marrom.....	63
Figura 18 –	Expressão gênica de marcadores de lipólise no tecido adiposo marrom.....	64
Figura 19 –	Síntese dos achados no tecido hepático.....	65
Figura 20 –	Síntese dos achados no tecido adiposo marrom.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
asc	área sob a curva
C	Controle
CAT	Catalase
CT	Colesterol total
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteato hepatite não alcoólica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F	Frutose
GPX	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona reductase
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>
M	Metformina
MC	Massa corporal
MF	Massa do fígado
QUICKI	<i>Quantitative insulin-sensitivity check index</i>
RI	Resistência à insulina
RTR	Relação de troca respiratória
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TH	Triglicérides hepáticos
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TP	Triglicérides plasmáticos
TTR	Taxa de troca respiratória

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	Cloridrato de Metformina	17
1.1.1	<u>Farmacocinética</u>	18
1.1.2	<u>Farmacodinâmica</u>	19
1.2	Frutose	20
1.3	Modelo animal	21
1.4	Esteatose hepática	21
1.5	Tecido adiposo marrom	24
2	OBJETIVO	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos sobre o fígado	26
2.3	Objetivos específicos sobre o TAM	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Animais e dieta	27
3.2	Desenho experimental	27
3.3	Métodos usados nos dois estudos	30
3.3.1	<u>Massa corporal, ingestão alimentar e consumo energético</u>	30
3.3.2	<u>Calorimetria indireta</u>	30
3.3.3	<u>Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)</u>	31
3.3.4	<u>Sacrifício e extração de tecidos</u>	31
3.3.5	<u>Análise plasmática, resistência à insulina e sensibilidade à insulina</u> ...	32
3.3.6	<u>Análises moleculares</u>	32
3.3.6.1	Western blotting.....	32
3.3.6.2	PCR em tempo real.....	33
3.3.7	<u>Análise Estatística</u>	36
3.4	Métodos usados exclusivamente no fígado	36
3.4.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)</u>	36
3.4.2	<u>Atividade das enzimas antioxidantes</u>	37
3.4.2.1	Medida da Superóxido Dismutase.....	37

3.4.2.2	Medida da Catalase.....	37
3.4.2.3	Medida da Glutathiona Peroxidase.....	38
3.4.3	<u>Estrutura do fígado</u>	39
3.5	Métodos usados exclusivamente no tecido adiposo	41
3.5.1	<u>Estudo estrutural</u>	41
3.5.2	<u>Índice de adiposidade</u>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Ingestão alimentar e energética	42
4.2	Massa corporal e ganho de massa corporal	44
4.3	Gasto energético e adiposidade	45
4.4	Perfil glicídico	45
4.5	Análises plasmáticas	46
4.6	Resultados no fígado	47
4.6.1	<u>Fígado: esteatose e bioquímica</u>	47
4.6.2	<u>β-oxidação e lipogênese hepática</u>	49
4.6.3	<u>Defesas antioxidantes hepáticas e peroxidação lipídica</u>	52
4.6.4	<u>Ativação da AMPK no fígado</u>	55
4.7	Resultados sobre o tecido adiposo	56
4.7.1	<u>Tecido adiposo inguinal (subcutâneo)</u>	56
4.7.2	<u>Tecido adiposo marrom</u>	57
4.7.2.1	Diferenciação do TAM.....	58
4.7.2.2	Marcadores termogênicos no TAM.....	59
4.7.2.3	Biogênese mitocondrial no TAM.....	61
4.7.2.4	Marcadores de utilização de substrato no TAM.....	62
5	DISCUSSAO	67
	CONCLUSAO	73
	REFERENCIAS	74
	ANEXO A - Comitê de Ética	86
	ANEXO B - Primeiro artigo	87
	ANEXO C - Segundo artigo	88

INTRODUÇÃO

O consumo de frutose pela população aumentou drasticamente nos últimos anos principalmente porque é incorporada a produtos industriais e bebidas açucaradas (o xarope de milho, rico em frutose, é a principal forma adicionada a refrigerantes e alimentos processados) (Softic et al. 2016). O efeito do consumo excessivo de frutose na saúde humana está apenas começando a ser entendido. A frutose induz várias complicações associadas à síndrome metabólica e pode induzir alterações na permeabilidade do intestino e promover a liberação de fatores inflamatórios no fígado (com implicações potenciais no aumento da inflamação hepática). Além disso, a ingestão de frutose tem sido associada ao câncer de colo, pâncreas e fígado, o que reforça a indicação de que o consumo de frutose deve ser reduzido, pois é prejudicial para a saúde humana a longo prazo (Charrez et al. 2015).

A frutose é metabolizada nos hepatócitos, enterócitos e células tubulares renais em triose-fosfato e posterior descarte desses compostos, levando ao aumento da produção de ácido láctico, gliconeogênese e lipogênese *de novo* (Stanhope 2012). Com isso, o consumo contínuo de frutose pode levar à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em humanos (Le et al. 2009) e em roedores (Schultz et al. 2013). DHGNA é uma condição altamente prevalente em humanos e estudos populacionais indicam que 10 a 50% da população mundial possui uma forma reversível de esteatose hepática (Tappy et al. 2010). No entanto, numa pequena percentagem de indivíduos, DHGNA pode progredir para inflamação hepatocelular, uma condição conhecida como esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e, nos casos mais graves, cirrose e carcinoma hepatocelular (Michelotti et al. 2013).

O aumento do estresse oxidativo é um dos principais fatores a desencadear a inflamação do fígado e a progressão DHGNA - EHNA (Tappy e Le 2012). Uma dieta rica em frutose aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Aronis et al. 2005), ao mesmo tempo em que reduz o potencial antioxidante (Schultz et al. 2015).

Os mecanismos envolvidos na continuação do insulto hepático não são completamente conhecidos, mas aceita-se que existam dois eventos distintos. O primeiro evento é o aumento do influxo lipídico e a redução da depuração lipídica no fígado, levando ao acúmulo de gordura (esteatose) (Lim et al. 2010). O segundo

evento é um processo inflamatório causado pelo aumento da ativação de EROs e de citocinas no fígado (Peeverill et al. 2014), provavelmente resultante da exposição dos hepatócitos a uma maior concentração de lipídios e/ou carboidratos.

A metformina melhora a hiperglicemia principalmente através da supressão da gliconeogênese hepática, juntamente com a melhora da sinalização da insulina. No entanto, seu mecanismo de ação é apenas compreendido parcialmente e, por isso, controverso (Aw et al. 2014). Portanto, ao estudarmos o fígado neste trabalho analisaremos três ações principais envolvidas na lesão hepática da DHGNA: lipogênese e biogênese mitocondrial, beta-oxidação e estresse oxidativo.

O tecido adiposo marrom (TAM) dissipa energia na forma de calor, promovendo a termogênese através da ação da proteína desacopladora (UCP) 1 (Cannon e Nedergaard 2004). Hoje sabemos que o TAM pode ser ativado em humanos adultos (Cypess et al. 2009, Cypess et al. 2015, Nedergaard et al. 2007) e essa ativação pode ter relevância metabólica, como visto em casos onde há perda de massa corporal (Vijgen et al. 2012). Além disso, a exposição ao frio pode melhorar a atividade do TAM (Chondronikola et al. 2014, Yoneshiro et al. 2013).

Quando há recrutamento do TAM os adipócitos marrons proliferam e iniciam a adipogênese marrom, em um processo sob controle adrenérgico envolvendo dois mediadores chave, o coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC)-1 α e domínio de PR (PRDM)-16. Adipócitos marrons diferenciados aumentam a expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico e à função mitocondrial e, em última análise, de UCP-1 (Bargut et al. 2016, Cannon e Nedergaard 2004).

A frutose além de estar associada à resistência à insulina, dislipidemia e outras doenças metabólicas (como já citado) (Stanhope 2016), também promove hipertrofia dos adipócitos brancos, com resistência à insulina local, inflamação (Bargut et al. 2017, Magliano et al. 2015), e desregulação da lipólise (Legeza et al. 2014). No entanto, quando o consumo de frutose é incluído em uma dieta isoenergética (com a dieta controle), não causa obesidade (Schultz et al. 2013). Com base nisso, estudos demonstraram que um modelo animal com alta ingestão de frutose apresenta mudanças no metabolismo de carboidratos e lipídios, bem como na função do fígado e do tecido adiposo, sem causar aumento na massa corporal (Bargut et al. 2017, Magliano et al. 2015, Schultz et al. 2013).

A literatura é limitada ao avaliar os efeitos da metformina no TAM, especialmente quando se considera a associação com uma dieta rica em frutose. No

trabalho atual vamos estudar o TAM, principalmente a possível ação da metformina na proliferação, diferenciação e em marcadores termogênicos em um modelo com metabolismo alterado devido a ingestão crônica de dieta rica em frutose. Até onde sabemos, o estudo é pioneiro em investigar o TAM como alvo da metformina em um modelo de dieta rica em frutose.

Os dados mostrados nessa tese deram origem a dois artigos publicados em revistas científicas indexadas internacionais com impacto (ANEXOS B e C). Apresentamos aqui o compilado desses achados.

Nas seções “materiais e métodos” e “resultados” apresentaremos primeiro os dados comuns aos dois trabalhos e, em seguida, os dados particulares do fígado (publicados no primeiro artigo), e os dados particulares do tecido adiposo marrom (publicado em um segundo artigo):

- a) Karise I, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Matsuura C, Del Sol M, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. **Liver and Metformin: Lessons of a fructose diet in mice.** *Biochim Open* 2017; 4: 19-30;
- b) Karise I, Bargut TC, Del Sol M, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. **Metformin enhances mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipocytes of mice.** *Biomed Pharmacother* 2019; **111**;1156-1165.

1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1 Cloridrato de Metformina

O cloridrato de metformina é um derivado da guanidina, composto ativo da *Galega officinalis*. Essa planta medicinal, conhecida popularmente como *Lilac* francês, foi usada por séculos na Europa como tratamento do diabetes desde a época medieval (Bailey e Day 1989). O uso das guanidinas e de seus derivados (fenformina, buformina e metformina) como agentes terapêuticos para diabetes mellitus tipo 2 (DM2) data de meados do século 20. A metformina e a fenformina foram introduzidas em 1957, e a buformina, em 1958. Esta última foi uso limitado, enquanto a metformina e a fenformina foram amplamente usadas (Freemark e Bursey 2001, Thomas e Gregg 2017).

A metformina é o fármaco de primeira escolha para tratamento de DM2, sendo o hipoglicemiante oral mais amplamente prescrito, devido ao seu perfil de toxicidade favorável e eficácia clínica (Thomas e Gregg 2017). O fármaco reduz os níveis de glicose principalmente diminuindo a gliconeogênese hepática, o que leva a um declínio médio nos níveis de insulina, e também promove a captação de glicose no músculo (Bahrambeigi et al. 2019).

Apesar da longa história e de décadas de sucesso no uso clínico de metformina como tratamento para DM2, seu mecanismo de ação permanece parcialmente desconhecido. Contrastando com as sulfonilureias e a insulina, a metformina não está associada com risco de hipoglicemia e nem ganho de massa corporal. Além disso, quando comparada com as alternativas anteriormente citadas, a metformina está associada com um risco menor de desenvolvimento de câncer, que depois da doença cardiovascular é a segunda maior causa de morte em pacientes com diabetes (Bailey e Day 1989).

1.1.1 Farmacocinética

O cloridrato de metformina é administrado por via oral, absorvido incompleto e lentamente pela parte superior do intestino delgado tendo sua absorção retardada, mas não prejudicada, pela presença de alimentos no estômago (Kim et al. 2014; Kim et al. 2018b). No epitélio intestinal, a metformina é absorvida na borda em escova e é um importante substrato da proteína PMAT (*plasma membrane monoamine transporter*). Os transportadores de cátions orgânicos OCT1 e OCT2 estão envolvidos com a entrada da metformina no fígado e rins, respectivamente (Kim et al. 2018b).

A biodisponibilidade dos comprimidos de cloridrato de metformina é da ordem de 50-60%. A metformina não é metabolizada, circulando em forma livre (McCreight et al. 2018). A fração ligada a proteínas plasmáticas pode ser considerada como insignificante sendo distribuída rapidamente para os tecidos periféricos, mas lentamente em eritrócitos (He e Wondisford 2015). Concentrações mais elevadas do cloridrato de metformina são encontradas nas glândulas salivares, rins e fígado. O volume de distribuição aparente do cloridrato de metformina, após doses únicas orais de 850 mg é, em média, de 654 ± 358 L. Em função do tempo, o cloridrato de metformina se compartimentaliza nos eritrócitos. Nas doses clínicas e esquemas de dosagem usuais, as concentrações plasmáticas do cloridrato de metformina no estado de equilíbrio são alcançadas dentro de 24-48 horas e são geralmente <1 µg/mL. Em estudos clínicos controlados, os níveis plasmáticos máximos de cloridrato de metformina não excederam 5 µg/mL, mesmo nas doses máximas (He e Wondisford 2015, McCreight et al. 2016).

A metformina é excretada por via urinária inalterada e de forma muito rápida. Seu *clearance* é, em uma pessoa sadia, de cerca de 400 ml/min (4 a 5 vezes maior que o da creatinina), o que indica filtração glomerular seguida por secreção tubular (Kim et al. 2014, McCreight et al. 2018).

1.1.2 Farmacodinâmica

A redução glicêmica provocada pela metformina ocorre principalmente por suas ações no fígado e músculo esquelético, que têm efeito sensibilizador da insulina. No hepatócito o cloridrato de metformina causa a inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, assim como a estimulação da glicogênese, enquanto nos tecidos periféricos insulino-dependentes, principalmente na musculatura esquelética, aumenta a captação de glicose provocando rápida redução da glicemia (Wen et al. 2019). Em contraste com outros fármacos, o cloridrato de metformina não aumenta os níveis séricos de insulina, portanto não causa hipoglicemia, mesmo em doses consideráveis (Markowicz-Piasecka et al. 2017, Mazza et al. 2012).

O cloridrato de metformina também diminui a absorção gastrointestinal de glicose, aumenta a sensibilidade à insulina no músculo e no tecido adiposo e os níveis de ácidos graxos livres (AGL) (Resuli et al. 2012, Spruss et al. 2012). Nos tecidos periféricos, o cloridrato de metformina intensifica o transporte de glicose ao potencializar a atividade da tirosina quinase nos receptores de insulina. Em nível molecular, gera efeitos a partir da ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). O mecanismo pelo qual o cloridrato de metformina ativa essa enzima não foi totalmente elucidada. Entretanto, demonstrou-se que as biguanidas ativam a AMPK indiretamente (Takayama et al. 2014).

AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança da carga elétrica celular, tendo a AMPK o papel de manutenção da homeostasia energética no metabolismo celular. Todas as células necessitam manter alta relação entre ATP e ADP continuamente para realizar suas funções. Essa relação nas células geralmente permanece constante, indicando a eficiência do mecanismo que regulador, sendo a AMPK um componente chave desse equilíbrio fisiológico (Aw et al. 2014, Takayama et al. 2014). Ao ser ativada, AMPK exerce efeitos sobre a expressão gênica e síntese proteica relacionados ao metabolismo de glicose e lipídios. AMPK atua em diversos órgãos, incluindo fígado, músculo esquelético, coração, tecido adiposo e pâncreas. No fígado ocorre a inibição da transcrição das enzimas relacionadas a gliconeogênese, consequentemente reduzindo-a (Stephene et al. 2011, Zhang et al. 2012). AMPK também é responsável pela melhora do metabolismo lipídico durante o tratamento com cloridrato de metformina, pois inibe

enzimas chaves na síntese de triglicérides e colesterol. No músculo, a ativação da AMPK pelo cloridrato de metformina promove a utilização de glicose devido ao aumento da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática e aumento do conteúdo de glicogênio nas células musculares. Além disso, ocorre diminuição da síntese e aumento da oxidação de ácidos graxos (Ferreira et al. 2014, Wu et al. 2018).

1.2 Frutose

Dietas com alto teor de açúcares e/ou alto teor de gorduras, participam da gênese de diversas doenças e estão associadas a mudança no hábito alimentar em humanos, uma vez que o estilo de vida dos indivíduos nas sociedades modernas, principalmente nas ocidentais, é caracterizado pela predominância de uma alimentação rica em lipídeos e carboidratos e pobre em nutrientes (Luque et al. 2018).

A frutose é um monossacarídeo encontrado em frutas, sendo também um subproduto do xarope de milho, que tem baixo custo, e, por isso, é adicionado em alimentos e bebidas como adoçantes (Choi et al. 2017). É um açúcar simples, do grupo das hexoses, que se assemelha a glicose (diferindo apenas pela posição do grupo carbonila, que na frutose encontra-se no carbono 2 e na glicose no carbono 1).

Os alimentos que contem xarope de milho incluem refrigerantes, bebidas adoçadas, condimentos como ketchup e mostarda, pães e bolos industrializados, entre outros. O aumento na ingestão de frutose está associado com o surgimento e prevalência de diversos distúrbios metabólicos, como o DM2, hipertensão arterial sistêmica, gota, dislipidemias e DHGNA (Caliceti et al. 2017, Chen et al. 2017), mesmo sem causar significativo aumento da massa corporal (Schultz et al. 2013).

O intestino delgado desempenha um papel importante no metabolismo da frutose, convertendo frutose em glicose e outros metabólitos circulantes. Desta forma, o intestino delgado protege o fígado da exposição à frutose. Altas doses de frutose sobrecarregam essa capacidade de proteção do intestino delgado alterando o equilíbrio entre o consumo e a capacidade de eliminação da frutose intestinal, que leva à maior exposição do fígado à frutose da dieta e, portanto, à toxicidade da frutose (Jang et al. 2018).

O consumo excessivo de frutose aumenta os níveis de ácidos graxos que estão associados a alterações nas vias clássicas da sinalização insulínica, podendo causar um quadro de resistência à insulina. Os ácidos graxos desencadeiam a fosforilação dos resíduos serina dos receptores de insulina, inativando-os e diminuindo a ativação da PI3-K, o que promove a diminuição no transporte de glicose para dentro da célula estimulado pela insulina (Vos e Lavine 2013). Essa diminuição na captação de glicose estimula ainda mais a secreção de insulina na tentativa de compensar os níveis aumentados de glicose e piora a situação de “resistência” (Jang et al. 2018, Vos e Lavine 2013).

1.3 Modelo animal

Usamos camundongos de linhagens isogênicas (ou *inbred* C57BL/6) alimentados com dieta rica em frutose. Essa dieta, já amplamente testada, não altera a massa corporal do animal quando é isoenergética com a dieta controle, mas altera o metabolismo de carboidratos, levando a hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia (Schultz et al. 2013, Schultz et al. 2015) e aumento da pressão arterial (Magliano et al. 2015).

1.4 Esteatose hepática

O termo “doença gordurosa hepática não alcoólica” (DGHNA, como já mencionamos) foi utilizado pela primeira vez em 1980 para designar o achado histopatológico semelhante a esteatose hepática induzida pelo consumo de álcool, porém acometendo pacientes sem consumo significativo de álcool (Ludwig et al. 1980). Desde 1800 os patologistas descrevem a associação da esteatose e cirrose, mas considerando o álcool como desencadeante do processo. Posteriormente se observou que um grupo de indivíduos que não consumia álcool também apresentava esteatose seguida de fibrose hepática sem causa aparente. Os casos pareciam estar associados com obesidade, sexo feminino e diabetes (Moran et al. 1983).

Um aspecto importante a ser observado é o aumento na incidência de DGHNA na população, tornando-se um problema emergente de saúde pública (Michelotti et al. 2013). DGHNA inclui um amplo espectro de alterações no fígado que se iniciam com infiltração hepática de gordura (esteatose) (Brunt 2010, Musso et al. 2011), podendo evoluir com atividade inflamatória e necrose, com ou sem fibrose perissinusoidal (esteatohepatite), fibrose avançada e cirrose (Bernsmeier e Albano 2017, Brunt et al. 2011). Estudos recentes observaram que 20% dos pacientes com DGHNA desenvolvem cirrose e/ou carcinoma hepatocelular, o que ressalta a importância de haver um diagnóstico precoce (Bruzzi et al. 2018).

As tentativas de esclarecimento da patogênese da DGHNA tiveram início com a compreensão do metabolismo dos lipídeos no organismo normal de pessoas saudáveis (Neuschwander-Tetri e Bacon 1996). A gordura é absorvida pela mucosa intestinal e passa à circulação na forma de quilomícrons, que contêm triglicérides que são depositados no tecido adiposo, servindo como reserva para os gastos metabólicos quando há privação de alimentos (Bernsmeier e Albano 2017). O tecido adiposo libera a gordura na forma de AGL mediante o estímulo da adrenalina, corticosteroides e outros hormônios. AGL têm dois destinos após a entrada nos hepatócitos: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP), ou são convertidos novamente em triglicérides acoplados às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e transportados ao tecido adiposo (Tang et al. 2016, Wu et al. 2011).

DGHNA surge da disponibilidade, mobilização, síntese hepática aumentada e da esterificação de AGL em triglicérides e do decréscimo do transporte destes para fora do hepatócito, com um desvio dos mecanismos de lipólise em favor da lipogênese (Choi et al. 2017, Peverill et al. 2014). A deposição aguda ou crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação de lipídeos e o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da esteatose (Baldrige et al. 1995). O estresse oxidativo gera radicais hidroxila e superóxidos que reagem com o excesso de lipídeos para formar os peróxidos. O aumento da peroxidação de lipídeos estaria relacionado com a dieta, o meio ambiente, infecções, drogas, toxinas e com a predisposição genética (Konishi et al. 2006).

Já mencionamos que DGHNA é uma das principais doenças crônicas do fígado em todo o mundo (prevalência global de aproximadamente 25% na população adulta e 50-70% em pacientes com obesidade e DM2) (Stefanescu et al. 2016). DGHNA é um fator de risco para cirrose e carcinoma hepatocelular. Além disso, os pacientes

com DM2 e DHGNA têm pior controle glicêmico e desenvolvem doenças cardiovasculares mais prontamente do que aqueles sem DHGNA (Sorrentino et al. 2015, Stefanescu et al. 2016). Conseqüentemente, os tratamentos com foco tanto no DM2 quanto em DHGNA são indicados para esses doentes.

Até o presente momento não se conseguiu correlacionar o grau de indução de citocinas com o estágio da doença hepática, mas há crescentes evidências de que o mecanismo comum de lesão na esteatose alcoólica e na não alcoólica seria o aumento da peroxidação de lipídeos, o que explicaria os mesmos achados histopatológicos nas duas doenças (Choi et al. 2017, Miquilena-Colina et al. 2011). Sabe-se também que o fígado com esteatose é mais susceptível às agressões em geral, do que o fígado normal (daí ser muito importante avaliar a infiltração gordurosa em fígados selecionados para transplante) (Peverill et al. 2014).

Reduções na adiposidade e resistência à insulina através de dieta e exercício são a base do tratamento da DHGNA (Green et al. 2018, Motta et al. 2017, Schultz et al. 2012). Também os antidiabéticos que levam a redução de massa corporal aliviam concomitantemente a esteatose hepática (Zhuang et al. 2015, Xu et al. 2016). Entretanto, não há tratamento farmacológico que tenha sido aprovado para pacientes com DHGNA. Atualmente, as recomendações para tratar DHGNA abrange tanto mudanças no estilo de vida e uso de medicamentos inespecíficos. Os estudos que avaliam a eficácia de drogas no tratamento de DHGNA analisam marcadores da função hepática, transaminases e análise histológica de material de biópsias hepáticas, onde é possível caracterizar a estrutura do fígado (Loria et al. 2010, Woo et al. 2014, Zhuang et al. 2015).

Considerando que é forte a associação entre DHGNA e síndrome metabólica, os medicamentos mais usados para tratamento de DHGNA visam à diminuição da resistência à insulina nos pacientes (Aguila et al. 2010). Entretanto, não se sabe bem os mecanismos envolvidos na resistência à insulina que facilitam o acúmulo de gordura nos hepatócitos (Malin e Kashyap 2014). Com isso, os medicamentos utilizados no tratamento da DHGNA são principalmente antidiabéticos orais dos grupos das tiazolidinedionas e das biguanidas. No primeiro grupo se enquadra a pioglitazona e no segundo o cloridrato de metformina, droga que é o foco desse estudo.

1.5 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo é o principal regulador da homeostase energética, porém o acúmulo de gordura corporal, geralmente causado pelo consumo excessivo de calorias acima do valor gasto nas atividades do organismo, pode levar a um desequilíbrio. Isso acontece quando a ingestão alimentar é maior que o gasto energético correspondente (Chang et al. 2016, Seidell e Halberstadt 2015).

O tecido adiposo branco (TAB) é capaz de secretar diferentes adipocinas, as quais desempenham um papel na resistência à insulina devido ao perfil pró-inflamatório observado na obesidade (van Baak e Mariman 2019). Inversamente, como já descrevemos antes, o TAM realiza a termogênese adaptativa que consiste na liberação da energia na forma de calor através da ação da UCP-1, induzida pela exposição ao frio, tendo como fonte principal os AGL do próprio tecido ou provenientes da lipólise do TAB (Chondronikola et al. 2014, Khedoe et al. 2015).

O TAM foi descrito no século 16 por Conrad Gesner como sendo “nem gordura nem carne” (*nec pinguitudo nec caro*). A constatação de que TAM está presente em todos os mamíferos só ocorreu no século 20, por isso, apenas estudos relativamente recentes têm o TAM como alvo. De fato, importantes descobertas sobre TAM (identificação da UCP-1) só aconteceram nos últimos anos (Cannon e Nedergaard 2004, Richard et al. 2010).

A parte predominante do TAM em roedores tem localização interescapular e está organizado em dois lóbulos (Martins et al. 2017). É densamente innervado para garantir a oferta suficiente de oxigênio e substratos, além de redistribuir rapidamente o calor produzido para o corpo (Bhanu Prakash et al. 2016).

O adipócito marrom (diferente do adipócito branco) tem aparência poligonal e contém inúmeros vacúolos de gordura (por isso é chamado multilocular), cercado por citoplasma rico em mitocôndrias (Cannon e Nedergaard 2004, Oelkrug et al. 2015). Apesar da quantidade de TAB superar em muito a quantidade de TAM no organismo (principalmente humano), ambos os tecidos podem ser considerados essenciais na divisão e utilização dos nutrientes, bem como na regulação da massa corporal (Cypess et al. 2009).

O TAM apresenta duas funções distintas: a termogênese obrigatória (decorrente da energia liberada das reações exotérmicas que ocorrem em todos os

órgãos), e a termogênese adaptativa ou facultativa (desenvolvida como uma resposta de adaptação à exposição ao frio ou a alterações na dieta, sendo o TAM o principal órgão responsável por esse tipo de termogênese, ao menos em roedores) (Cypess et al. 2012, Whittle et al. 2012).

A termogênese adaptativa é totalmente dependente de UCP, situadas na membrana mitocondrial interna, como a UCP-1 (Song et al. 2018). Estas proteínas funcionam como um canal alternativo que permite que prótons retornem à matriz mitocondrial a partir do espaço intermembranas, sem produzir energia sob a forma de ATP (ou seja, desacoplados), liberando calor (Richard et al. 2010). A termogênese adaptativa ocorre após a exposição ao frio com a liberação de noradrenalina, que ativa receptores adrenérgicos localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons. Entre os subtipos existentes, o receptor adrenérgico do tipo 3 (RA β 3) é o mais relevante para a ativação aguda da termogênese (Moreno-Fernandez et al. 2018).

Para que a termogênese ocorra no TAM é necessária a presença do substrato que será utilizado no processo. O TAM pode utilizar tanto ácidos graxos (provenientes de triglicérides captados da corrente sanguínea através do receptor CD36 ou previamente estocados no tecido), quanto glicose (captada da corrente sanguínea através do transportador de glicose-4, GLUT-4) (Hibi et al. 2016b, Keipert et al. 2015).

A termogênese adaptativa leva a queima do excesso de energia ingerida (termogênese induzida por dieta ou termogênese metabolorregulatória), que é pouco estudada e tem mecanismos ainda pouco esclarecidos (Chouchani et al. 2019, Zhang et al. 2018). No final da década de 70 do século 20 a primeira grande descoberta nesse sentido demonstrou que a dieta '*tipo cafeteria*' (rica em gordura saturada e açúcares simples), que favorece o desenvolvimento de obesidade, está associada ao recrutamento do TAM (Bolsoni-Lopes et al. 2015). Embora não faça sentido evolutivo que a termogênese induzida por dieta tenha se desenvolvido para 'queimar' o excesso de calorias, mantendo a homeostase energética, estudos atuais apontam para um possível dispêndio de energia com o objetivo de manter a ingestão de proteínas e o aporte de aminoácidos constantes (Hibi et al. 2016a, Moreno-Fernandez et al. 2018).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos adversos de uma dieta rica em frutose sobre o fígado e tecido adiposo marrom, estudando os mecanismos envolvidos no uso da metformina administrada a camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos no fígado:

- a) implementar um modelo de resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática com base em dieta rica em frutose;
- b) quantificar e classificar o nível de lesão histopatológica, sem e com tratamento com metformina;
- c) quantificar a lipogênese, biogênese mitocondrial, beta- oxidação hepática (expressão de proteínas e expressão gênica);
- d) quantificar a expressão gênica e a atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático.

2.3 Objetivos específicos no TAM:

- a) observar possíveis alterações devido à oferta de uma dieta rica em frutose e/ou sua associação com metformina;
- b) estudar o efeito da metformina sobre biogênese mitocondrial, diferenciação e marcadores termogênicos;
- c) analisar os principais marcadores das vias de proliferação, diferenciação e marcadores termogênicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA / 022/2015) (ANEXO A). O experimento foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996).

Foram utilizados camundongos machos não consanguíneos (C57BL/6) com três meses de idade pesando $24\text{g} \pm 3\text{g}$. Os animais foram mantidos em caixas ventiladas sob condições controladas (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA, 20 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade e 12h/12h ciclo invertido escuro / claro - claro de 01:00h às 13:00h), com livre acesso a comida e água.

3.2 Desenho experimental

Quarenta camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos ($n=20/\text{grupo}$), metade sendo alimentados com dieta controle (C) e a outra metade com dieta rica em frutose (F, 47% frutose), durante dez semanas. As dietas foram isoenergéticas, tinham a mesma quantidade de carboidratos totais, mas na dieta rica em frutose, parte do amido foi substituído por frutose pura (fabricadas pela PragSolucoes, Jaú, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores (AIN93M) (Reeves et al. 1993) (detalhes na Tabela 1). A dieta rica em frutose conteve 47,37 g de frutose por 100 g de ração (50% do conteúdo energético total dos alimentos), já testado por nosso grupo na indução de alterações no metabolismo (Bargut et al. 2017, Schultz et al. 2015).

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas no experimento

Ingredientes (g)	Dietas	
	C	F
Caseína	140	140
Amido de milho	620.7	146.4
Sacarose	100	100
Frutose	-	474.3
Óleo de soja	40	40
Fibers	50	50
Mistura de vitaminas*	10	10
Mistura de minerais*	35	35
Cistina	1.8	1.8
Colina	2.5	2.5
Antioxidante	0.008	0.008
Total	1000	1000
Energia (kJ)	15916	15916
Carboidratos (% energia)	76	76
Proteínas (% energia)	14	14
Lipídios (% energia)	10	10

Legenda: dieta padrão para roedores, C; dieta rica em frutose, F. * Vitaminas e Minerais presentes na mistura estão de acordo com a AIN93M (Reeves et al. 1993).

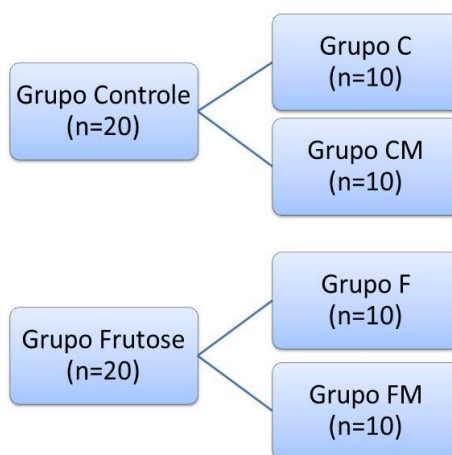
Fonte: Adaptação de REEVES et al. 1993.

Após as dez semanas iniciais os grupos foram redivididos, separados de cada grupo original, com a formação de dois novos grupos para incluir o tratamento com cloridrato de metformina (Pharmanostra, GO, Brasil), ou veículo (solução salina) e estudados por oito semanas adicionais.

O cloridrato de metformina foi diluído em salina e administrada por via oral (250 mg/kg/dia) através de gavagem orogástrica, bem como a solução salina no grupo controle (Ikeda et al. 2000). Assim, os grupos (n=10/grupo) foram (Figura 1):

- a) grupo C (dieta controle por dez semanas e dieta controle mais veículo por oito semanas adicionais);
- b) grupo CM (dieta controle por dez semanas e dieta controle mais metformina por oito semanas adicionais);
- c) grupo F (dieta com frutose por dez semanas e dieta com frutose mais veículo por oito semanas adicionais);
- d) grupo FM (dieta com frutose por dez semanas e dieta com frutose mais metformina por oito semanas adicionais).

Figura 1 – Esquema do desenho experimental utilizado no estudo



10 semanas iniciais + 8 semanas adicionais

Legenda: grupo Controle, C; grupo Frutose, F; grupo controle + cloridrato de metformina, CM; grupo frutose + cloridrato de metformina, FM.

Nota: Aos três meses de idade os camundongos machos foram divididos em dois grandes grupos: Um grupo que recebeu dieta padrão (C) e outro que recebeu dieta rica em frutose (F). Após dez semanas de administração da dieta, esses grupos foram redivididos e receberam cloridrato de metformina (M) ou solução salina, perfazendo quatro grupos: grupo C, grupo CM, grupo F e grupo FM que perdurou por mais oito semanas.

Fonte: A autora, 2019.

3.3 Métodos usados nos dois estudos

3.3.1 Massa corporal, ingestão alimentar e consumo energético

A massa corporal dos animais foi medida semanalmente sempre no mesmo horário. O ganho da massa corporal foi determinado como a diferença da massa corporal entre a 10^a semana (o momento em que os grupos foram estabelecidos) e a última semana.

As dietas foram renovadas diariamente e os pellets restantes foram descartados. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente, determinada como a diferença entre a quantidade de alimento fornecido e a quantidade de alimentos deixada na caixa. O consumo de energia foi estimado como o produto da ingestão de alimentos e o conteúdo de energia da dieta.

3.3.2 Calorimetria indireta

Na semana anterior ao sacrifício os animais foram colocados em caixas metabólicas conectadas a um sistema de módulos de calorimetria durante três dias, com livre acesso a comida dieta e água (Apparatus Oxylet system, Panlab/Harvard, Barcelona, Espanha). Este sistema monitorou o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2) e a taxa de troca respiratória (TTR).

O gasto energético e a razão de troca respiratória (produção de CO_2 / absorção de O_2) foram avaliados ao final por calorimetria indireta ao final do período (Livesey e Elia 1988). Os dados foram coletados a cada 3 minutos durante 72 horas (mas as primeiras 24 horas foram descartadas por corresponderem ao período de adaptação dos animais). O consumo de oxigênio foi calculado por grama de massa corporal metabólico (massa corporal)^{0,75}.

3.3.3 Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose foi realizado um dia antes da administração de cloridrato de metformina e dois dias antes do sacrifício. Os animais estavam em jejum de 6 horas e receberam 1g de glicose/kg (25% em estéril 0.9% NaCl) por gavagem orogástrica.

O sangue foi coletado na veia da cauda e os níveis de glicose no sangue foram medidas pelo método da glicose-oxidase (glicômetro Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) em jejum (tempo 0) e nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de solução de glicose. Os resultados geraram curvas glicêmicas, que foram avaliadas posteriormente através de um gráfico com o cálculo da 'área sob a curva' utilizando o software GraphPad Prism v.7.05 (para Windows; La Jolla, CA, EUA).

3.3.4 Sacrifício e extração de tecidos

Ao final do estudo os animais em jejum de 6 horas foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico, 150 mg/kg intraperitoneal), o tórax foi aberto e sangue foi coletado (átrio direito), centrifugado (120g, 15 min) para a obtenção do plasma e seguiu para análise bioquímica.

O fígado e os coxins de gordura (branca e marrom) foram dissecados e pesados. Fragmentos de todos os lobos do fígado e dos coxins gordurosos foram preparados para estudo microscópico de luz (fixados durante 48 h em formaldeído a 4% w/v em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 e depois incluídos em Paraplast plus -- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA -- seccionados com 5 µm de espessura e os cortes corados com hematoxilina e eosina) ou os fragmentos foram congelados para posterior análise com técnicas de biologia molecular (Western blotting e qPCR).¹

¹ A terminologia de genes e proteínas foi padronizada conforme a convenção internacional para roedores: os símbolos dos genes estão em itálico, com a primeira letra em maiúscula; os símbolos das proteínas são os mesmos que os dos genes, mas não estão em itálico, e todos estão em maiúsculas (Davisson 1994).

No momento do sacrifício o comprimento da tíbia direita foi aferido para corrigir as medidas dos órgãos (no caso de envelhecimento ou obesidade) (Yin et al. 1982).

3.3.5 Análise plasmática, resistência à insulina e sensibilidade à insulina

Colesterol total (CT) e triglicérides plasmáticos (TP) foram medidos com espectrofotômetro automático (kit comercial, Sistema Bioclin II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). A concentração plasmática de insulina foi medida com o kit Single Plex (EZRMI-13K Insulina Rato / Rato ELISA, Millipore Merck, Darmstadt, Alemanha).

O modelo de avaliação da homeostase e da resistência à insulina (HOMA-IR, *homeostasis model assessment-insulin resistance*) foi calculado com a glicemia de jejum (mmol/L) multiplicado pelo nível de insulina em jejum (mIU/mL), dividido por 22,5 (Matthews et al. 1985).

O índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKi) foi calculado como $[1/\log(\text{insulina de jejum } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{glicose de jejum mg/dL})]$ (Katz et al. 2000).

3.3.6 Análises moleculares

3.3.6.1 Western blotting

O tecido alvo (fígado ou TAM, 100 mg) foi adicionado ao tampão de lise RIPA (radioimunoprecipitação) com inibidor de protease, homogeneizados e centrifugados (1200g, 20 min à 4 °C) para posterior quantificação da concentração proteica. Após desnaturação (cinco minutos a 100 °C), quantidades iguais de proteínas (~100 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas do gel para a membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência. A membrana foi então bloqueada por incubação em 6% (w/v) de

albumina, diluída em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl]) em temperatura ambiente, durante uma hora para evitar ligações inespecíficas. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário de interesse *overnight*, a 4 °C: **AMPK α 1/2** (SC-25792) e **pAMPK α 1/2thr172** (SC-33524); **HSL** (SC-25843) e **UCP-1** (33 kDa; SC-6529) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), assim como **pHSLser660** (orb335694; Biorbyt, Cambridge, RU). No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para sua origem. (anti-rabbit: SC2357; anti-goat: SC2354; e anti-mouse: SC2005; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Usamos ECL para o sistema de detecção de nível de proteína e o Sistema Molecular de Imagem ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada usando o software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA). A expressão da proteína estrutural β -actina foi usada para corrigir os dados de blot.

3.3.6.2 PCR em tempo real (qPCR)

Amostras do fígado e TAM (30 mg) tiveram seu RNA total extraído em 700 μ L de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Em seguida, se adicionou 100 μ L de clorofórmio e centrifugação (12000g, 10 min, 4 °C) o RNA foi retirado da fase aquosa do sobrenadante, precipitado pela adição de 250 μ L de isopropanol, centrifugação e formação de pellet de RNA. Então, se retirou o isopropanol, ressuspendendo com 500 μ L de etanol 70% e nova centrifugação. O etanol foi retirado e o *pellet* ressuspendido em 40 μ L de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia (*Nanovue*, GE Life Sciences) e 1 μ g de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando *primers* Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA). O PCR em tempo real usou o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, USA). Os controles endógenos beta-actina e TBP foram utilizados para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95 °C), 44 ciclos e cada ciclo

consistindo em 95°C durante 10 s e 60 °C, 15 s, seguidos por uma curva de *melting* (60 a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,1 °C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que ΔCt expressa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos (Bustin et al. 2009). As sequências de *sense* e *antisense* dos primers usados para amplificação estão detalhados no Quadro abaixo.

Quadro - Sequência dos *primers* utilizados no experimento (continua)

Primer	5'-3'	Anti-sense
<i>Ap2</i>	TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA	AATCCCCATTACGCTGATG
<i>Atg1L</i>	ACAGTGTCCCCATTCTCAGG	GAAGTGGATGCTGGTGTGG
<i>β1ar</i>	GATCTGGTCATGGGATTGCT	AAGTCCAGAGCTCGCAGAAG
<i>β3ar</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG
<i>β actina</i>	CTCCGGCATGTGCAA	CCCACCATCACACCCT
<i>Bmp7</i>	TCTCTGTGGAGACCCTGGAT	CCGGATACTACGGAGATGGA
<i>Bmp8</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Catalase</i>	TTGACAGAGAGCGGATTCCT	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
<i>Cd36</i>	TACGCTGTGTTCCGGATCTGA	ATTCTGGAGGGGTGATGCAA
<i>ChREBP</i>	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
<i>Cpt1β</i>	AAGGAATGCAGGTCCACATC	CCAGGCTACAGTGGGACATT
<i>Fgf21</i>	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	ATCCTCCCTGATCTCCAGGT
<i>GPx</i>	CCCGTGCGCAGGTACAG	CAGCAGGGTTTCTATGTCAGGTT
<i>GR</i>	GGGATTGGCTGTGATGAGAT	GGTGACCAGCTCCTCTGAAG
<i>Hsl</i>	GACAGAGGCAGAGGACCATT	TGAGGAACAGCGAAGTGTCT
<i>Lpl</i>	TTCAACCACAGCAGCAAGAC	TTCTCTTTGTACAGGGCGG
<i>Nrf1</i>	GTTGGTACAGGGGCAACAGT	GTAACGTGGCCCAGTTTTGT
<i>Pcna</i>	TAGCCACATTGGAGATGCTG	GGTTACCGCCTCCTCTTCTT
<i>Pgc1α</i>	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT	GTCAACAGCAAAGCCACAA

Quadro - Sequência dos *primers* utilizados no experimento (conclusão)

<i>Plin1</i>	ACGACCAGACAGACACAGAG	GGCTGTAACCTCTCTGAGCA
<i>Plin2</i>	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
<i>PPARα</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>PPARγ</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
<i>Prdm16</i>	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA
<i>Sirt1</i>	AACGTCACACGCCAGCTCTA	TCGGTGCCAATCATGAGATG
<i>SOD2</i>	CAGGACCCATTGCAAGGAA	GTGCTCCCACACGTCAATCC
<i>SREBP1c</i>	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
<i>Tfam</i>	GAAGAACGCATGGAGGAGAG	TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>Vegf</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG

Legenda: Proteína adipócito 2, *Ap2*; receptor adrenérgico, *ar*; lipase de triacilglicerol do adipócito, *Atg*; proteína óssea morfogênica, *Bmp*; cluster de diferenciação 36, *Cd36*; proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos, *ChREBP*; carnitina palmitoiltransferase -1, *Cpt1 β* ; fator de crescimento de fibroblasto 21, *Fgf21*; glutaciona peroxidase, *GPx*; glutaciona redutase, *GR*; lipase sensível ao hormônio, *Hsl*; lipoproteína lipase, *Lpl*; fator respiratório nuclear 1, *Nrf1*; antígeno nuclear celular em proliferação, *Pcna*; coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama 1 α , *Pgc1 α* ; perilipina, *Plin*; receptor do ativador proliferador de peroxissoma, *PPAR*; PR contendo domínio 16, *Prdm16*; sirtrulina 1, *Sirt1*; superóxido dismutase, *SOD*; proteína de ligação ao elemento regulador de esterol, *SREBP-1c*; fator de transcrição mitocondrial α , *Tfam*; proteína desacopladora tipo 1, *Ucp1*; fator de crescimento endotelial vascular, *Vegf*.

Fonte: A autora, 2019.

3.3.7 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias e expressos como média e desvio padrão. Testamos as diferenças entre os grupos no período pré-tratamento com o teste *t* de Student (grupos C e F). Testamos a contribuição da dieta e metformina nas alterações do fígado no período pós-tratamento com análise de variância (ANOVA) de dois fatores e pós-teste de Holm-Šídák. As diferenças no TAM entre os grupos foram testadas com ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Šídák. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, GraphPad Prism versão 7.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.4 **Métodos usados exclusivamente no fígado**

3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é recomendado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana foi determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (Draper et al. 1993).

Foram adicionados 200 µl do homogenado de fígado para 400 µl de ácido tricloroacético. As amostras foram centrifugadas por 1200g por 10 min a 4 °C. Separou-se 500 µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500 µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100 °C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Genesys 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA). A concentração de TBARS foi expressa como nM/g de proteína.

3.4.2 Atividade de enzimas antioxidantes

A medida da atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) foi realizada em homogenado de fígado preparado com tampão fosfato. Para cada enzima seguiu-se o protocolo específico. O teor de proteína total de cada amostra foi determinado pelo kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.4.2.1 Medida da Superóxido Dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ em O_2 e H_2O_2 . A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo $\bullet\text{O}_2^-$ (Sun e Zigman 1978).

Foram utilizados 20, 40 e 60 μl de cada amostra em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 μl tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20 μl da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o H_2O_2 formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida em espectrofotômetro (480 nm; Genesys™ 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA) em um intervalo de 180 segundos.

3.4.2.2 Medida da Catalase

A catalase é uma heme proteína que catalisa a degradação do H_2O_2 , formando oxigênio molecular e H_2O . A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de H_2O_2 pela reação.

Foram utilizados 200 μl de homogenado de fígado em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2

(0,16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos por espectrofotometria (240 nm; Genesys™ 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA) em um intervalo de 60 segundos (Aebi 1984).

3.4.2.3 Medida da Glutathione Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da fosfato de dinucleotídeo de adenine (NADPH), determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm (Genesys™ 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA).

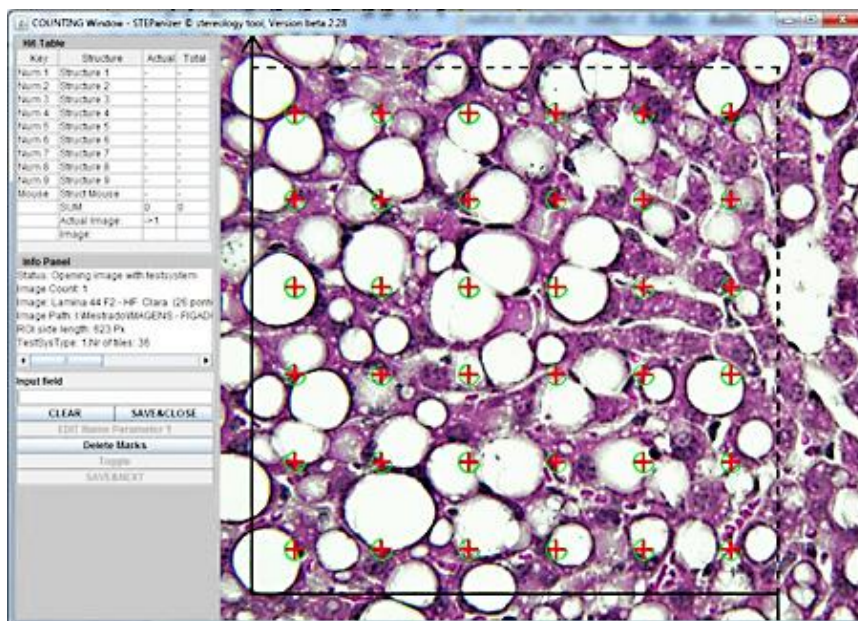
Foram utilizados 200 μ l de homogenado de fígado, incubados com 1800 μ l de tampão fosfato (PBS), glutathione reduzida (2 mM), glutathione redutase (0,11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H_2O_2 (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Genesys™ 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA) (Flohe e Gunzler 1984).

3.4.3 Estrutura do fígado

Detalharemos um pouco mais a obtenção e preparação de material do fígado. Fragmentos aleatórios de todos os lobos hepáticos foram retirados, congelados à -80 °C ou fixados por 48 horas (formaldeído 4% w/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2). Quando fixados, foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e seccionados com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As observações microscópicas e fotomicrografias digitais foram obtidas em microscópio Nikon (modelo 80i e câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

No mínimo dez imagens digitais por animal (10 imagens x 10 animais/grupo = 100 imagens/grupo) obtidas com objetiva Nikon planacromática NA 0.95 foram analisadas para a estimativa da esteatose hepática (Mandarim-de-Lacerda e Del Sol 2017). As imagens foram mescladas com um sistema-teste com 36 pontos (P_T) produzido pela aplicação Web STEPanizer (Figura 2) de modo que se estimou a densidade de volume de esteatose hepática por contagem de pontos: V_v [esteatose, fígado]: = P_p [esteatose, fígado]/ P_T , onde P_p representa o número de pontos do sistema-teste contados nas gotículas de gordura nos hepatócitos (Aguila et al. 2003, Catta-Preta et al. 2011).

Figura 2 - Esteatose hepática quantificada através da contagem de pontos



Nota: Imagens digitais foram adquiridas e a esteatose hepática foi quantificada através da contagem dos pontos que tocavam as gotas de gordura, sendo desconsiderados aqueles que tocavam a linha proibida, utilizando o software STEPanizer.

Fonte: A autora, 2019.

3.5 Métodos usados exclusivamente no tecido adiposo

3.5.1 Estudo estrutural

Os coxins gordurosos genital (epididimário), retroperitoneal, e inguinal (subcutâneo) no TAB, e o TAM interescapular foram cuidadosamente dissecados e tiveram suas massas aferidas. As amostras foram rapidamente congeladas e armazenadas a -80 °C ou foram fixadas (formaldeído a 4% w/v, tampão fosfato 0,1M, pH7,2) para microscopia de luz e seguiram o protocolo que já descrevemos para o fígado.

A gordura inguinal (localizada entre a parte inferior da caixa torácica e o meio do membro posterior) foi considerada gordura subcutânea. A gordura retroperitoneal (conectada à parede abdominal posterior perto dos rins e a porção abdominal dos ureteres), e a gordura epididimária (localizada na parte inferior do abdome e ligado ao epidídimo) foram consideradas gordura intra-abdominal. O TAM foi dissecado, como informamos, na região interescapular.

3.5.2 Índice de adiposidade

A razão entre a soma da massa dos coxins gordurosos e a massa corporal foi definida como índice de adiposidade.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar e energética

Não foi observada diferença na ingestão alimentar entre os grupos em nenhum momento do protocolo experimental. Conseqüentemente, a ingestão energética não mostrou diferença entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados gerais dos grupos experimentais no período pré e pós-tratamento (continua)

Dados	Pré-tratamento			
	C	F		
MC inicial (g)	25.8±1.34	25.7±1.32		
MC final (g)	29.7±1.12	29.6±1.30		
Glicemia em jejum (mmol/L)	6.4±0.26	8.6±0.39†		
TOTG (asc, mmol/L/min)	710.8±11.41	1012.0±47.68†		
	Pós-tratamento			
	C	CM	F	FM
MC final (g)	31.9±0.44	31.3±1.34	31.4±0.88	31.1±1.77
Ganho de MC (g)	6.43±0.67	5.78±0.76	6.28±0.48	5.95±0.78
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2.8±0.33	2.9±0.66	2.6±0.28	2.8±0.37
Consumo de energia (kJ/day)	45.04±5.2	45.52±10,5	42.34±7.64	43.61±5.89
Gasto de energia (kJ/day)	12.62±0.2	12.90±0.0	11.02±0.28	11.56±0.58§
RTR	0.995±0.0	1.053±0.0	1.015±0.01	1.07±0.032
Fígado/tíbia (g/cm)	0.5±0.01	0.5±0.01	0.6±0.02†	0.6±0.01§‡

Tabela 2 - Dados gerais dos grupos experimentais no período pré e pós-tratamento (conclusão)

TA epididimário (g)	0.233±0.00 6	0.235±0.0 06	0.234±0.004	0.231±0.008
TA inguinal (g)	0.194±0.01 3	0.193±0.0 07	0.191±0.013	0.195±0.015
Índice de adiposidade (%)	1.716±0.03 9	1.764±0.0 93	1.760±0.092	1.741±0.076
Glicemia em jejum (mmol/L)	7.5±0.79	7.3±0.61	9.5±0.13†	8.2±0.20§‡
Insulina (pmol/L)	89.2±9.25	89.6±4.86	187.9±9.41†	95.2±4.54§
HOMA-IR	4.37±0.65	4.25±0.29	11.59±0.51†	5.02±0.19§‡
QUICKi	0.195±0.00 3	0.194±0.0 01	0.179±0.001 †	0.192±0.001 §‡
Colesterol (plasma, mmol/L)	2.9±0.09	2.8±0.12†	3.5±0.07†	3.1±0.16§‡
Triglicéride (plasma, mmol/L)	4.65±0.11	4.59±0.20	5.05±0.31†	4.50±0.05§
Triglicéride (fígado, mmol/g)	0.72±0.10	0.75±0.12	1.91±0.13†	1.36±0.07§‡

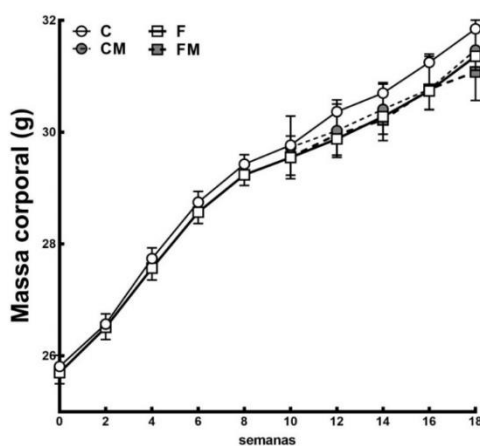
Legenda: Os dados são expressos como média e DP (n = 10 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (Teste t período pré-tratamento e ANOVA de dois fatores e post hoc test of Holm–Sidak no período pós tratamento). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: área sob a curva, asc; massa corporal, MC; teste oral de tolerância a glicose, TOTG; relação de troca respiratória, RTR; tecido adiposo, TA.

Fonte: A autora, 2019.

4.2 Massa corporal e ganho de massa corporal

Os grupos C e F iniciaram o tratamento sem diferença em sua massa corporal ($P=0,345$). Depois do tratamento a massa corporal permanece sem diferença significativa entre os grupos ($P=0,625$). Dessa forma, o ganho de massa corporal não mostrou diferenças significativas entre os grupos no período analisado (Figura 3).

Figura 3 – Evolução da massa corporal dos quatro grupos estudados ao longo do período experimental



Legenda: Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. (n = 10 por grupo).
Fonte: A autora, 2019.

4.3 Gasto energético e adiposidade

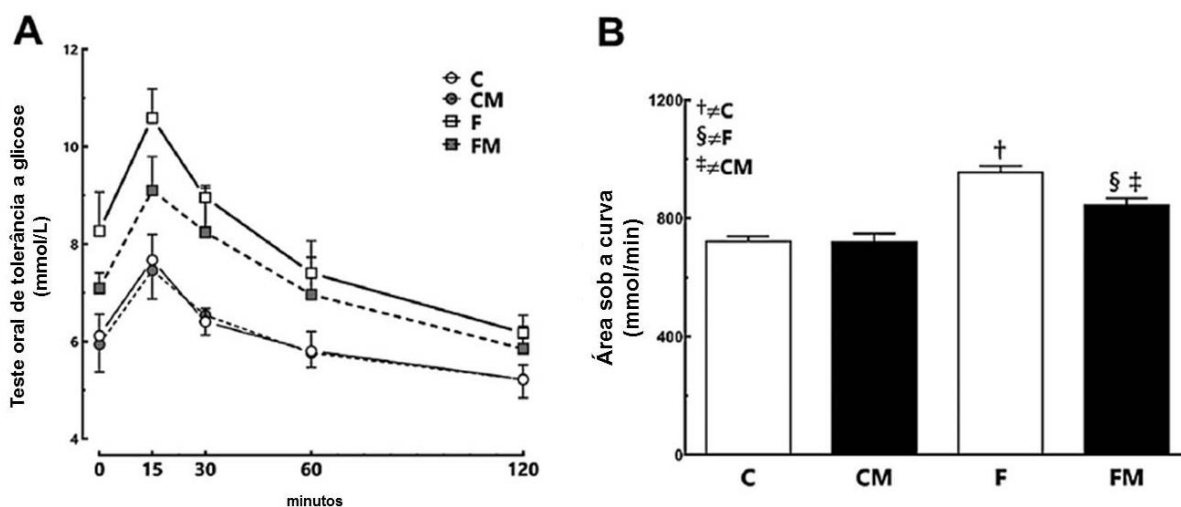
O gasto energético foi menor no grupo F comparado ao grupo C (-13%, $P<0,0001$), e o grupo FM comparado ao grupo CM (-10%, $P<0,0001$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na razão de troca respiratória, no depósito de tecido adiposo epididimário, no depósito de tecido adiposo inguinal e no índice de adiposidade (conforme Tabela 2, f. 42-43).

4.4 Perfil glicídico

No período de pré-tratamento, o grupo F se mostrou hiperglicêmico (+33% quando comparado com o grupo C; $P=0,002$), e apresentou uma maior área sob a curva no TOTG (+42% em comparação com o grupo C; $P=0,0003$, conforme Tabela 2, f. 43-44). No período pós-tratamento, o grupo F manteve-se hiperglicêmico (+27% do que o grupo C; $P=0,005$, conforme Tabela 2, f. 42-43), com maior área sob a curva do TOTG (+32% em comparação com o C grupo; $P<0,0001$, conforme Figura 4). A metformina diminuiu a glicemia e a área sob a curva do TOTG no grupo FM (-12% do que o grupo F, $P<0,0001$, conforme Tabela 2, f. 42-43 e Figura 4). No entanto, a glicemia foi ainda maior no grupo FM (+13% em comparação com o grupo CM; $P<0,0001$, conforme Figura 4). Dieta e metformina tiveram interação afetando os níveis de glicose (ANOVA de dois fatores; $P=0,029$).

A frutose aumentou o HOMA-IR e reduziu o QUICKi no grupo F (HOMA-IR +165%, $P<0,0001$; QUICKi -10% comparado ao grupo C, $P<0,0001$). A metformina diminuiu o HOMA-IR e aumentou QUICKi no grupo FM (HOMA-IR, -57%, $P<0,0001$; QUICKi, +10% do que o grupo F, $P<0,0001$). O HOMA-IR ainda era alto no grupo FM (+18% em relação ao grupo CM, $P=0,0446$).

Figura 4 – Perfil glicídico dos grupos experimentais após o período de tratamento



Legenda: Teste oral de tolerância à glicose (A) e área sob a curva (B) no período pós-tratamento. Os dados são expressos como média e DP ($n=10$ cada grupo). $P<0.05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šidák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M.

Fonte: A autora, 2019.

4.5 Análises plasmáticas

A frutose elevou os níveis de CT no grupo F (+19% em comparação com o grupo C; $P<0,0001$, conforme Tabela 2, f. 42-43). A metformina reduziu o CT no grupo FM (-12% comparado ao grupo F; $P<0,0001$). O grupo FM teve o nível de CT ainda maior que o grupo CM (+12%; $P=0,0006$, conforme Tabela 2, f.42-43). Dieta e Metformina tiveram interação afetando os níveis de CT (ANOVA de dois fatores; $P=0,022$).

A frutose aumentou a concentração de TP no grupo F (+8% em comparação com o grupo C; $P=0,001$, conforme Tabela 2, f. 42-43). A metformina diminuiu o nível de TP no grupo FM (-10% do que o grupo F; $P<0,0001$, conforme Tabela 2, f.42-43). Dieta e Metformina tiveram interação afetando os níveis de TP (ANOVA de dois fatores; $P=0,038$).

A frutose aumentou a insulina plasmática no grupo F (+47% em comparação com o grupo C; $P<0,0001$). A metformina diminuiu a insulina plasmática no grupo FM (-11% em relação ao grupo F; $P<0,0001$). Dieta e Metformina tiveram interação nos níveis de insulina plasmática (ANOVA de dois fatores; $P<0,0001$).

4.6 Resultados no fígado

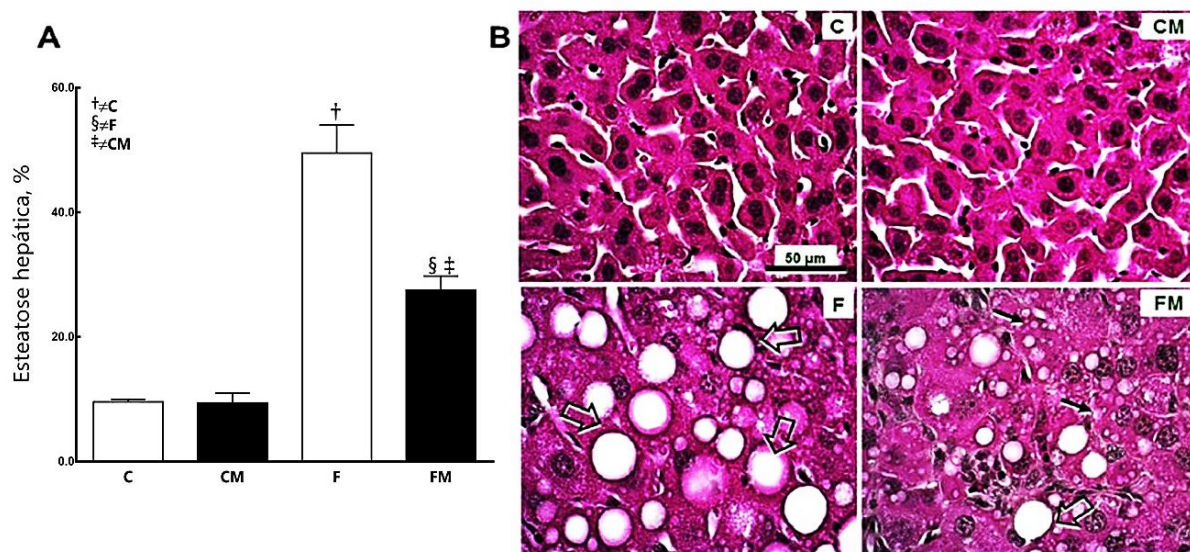
4.6.1 Fígado: esteatose e bioquímica

A frutose aumentou a massa hepática no grupo F (+18% em comparação com o grupo C, $P<0,0001$). A metformina reduziu a massa hepática no grupo FM (-10% quando comparado ao grupo F, $P=0,0002$), mas a massa hepática foi ainda maior no grupo FM (+8% em comparação ao grupo CM; $P=0,0024$, conforme Tabela 2, f.42-43). Dieta e metformina tiveram uma interação afetando a massa do fígado (ANOVA de dois fatores; $P=0,0006$).

A frutose aumentou triglicérides hepáticos (TH) no grupo F (+165% em comparação com o grupo C; $P<0,0001$). A metformina reduziu o TH no grupo FM (-29% quando comparado ao grupo F; $P<0,0001$, conforme Tabela 2, f.42-43), mas permaneceu mais alto no grupo FM (+80% quando comparado ao grupo CM; $P<0,0001$). Dieta e Metformina mostraram uma interação afetando TH (ANOVA de dois fatores; $P<0,0001$).

A frutose piorou a esteatose no grupo F (+532% em comparação com o grupo C; $P<0,0001$, Figura 5). A metformina reduziu a esteatose no grupo FM (-55% quando comparado ao grupo F; $P<0,0001$). No entanto, a esteatose foi ainda maior no grupo FM (+187% do que no grupo CM; $P<0,0001$). Dieta e Metformina mostraram interação, mas também afetaram a esteatose hepática independentemente (ANOVA de dois fatores; $P<0,0001$).

Figura 5 – Análise da esteatose hepática



Legenda: Análise da densidade de volume em porcentagem (A) e fotomicrografia do tecido hepático (B) no período pós tratamento (Coloração HE). Os dados são expressos como média e DP (n= 10 cada grupo). $P < 0,05$; † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šidák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M.

Nota: Camundongos que receberam dieta F apresentam numerosos hepatócitos com gotículas de gordura macro (setas abertas) e micro esteatose (setas fechadas). O tratamento com Metformina reduziu as gotículas de gordura no fígado, mesmo com a dieta F.

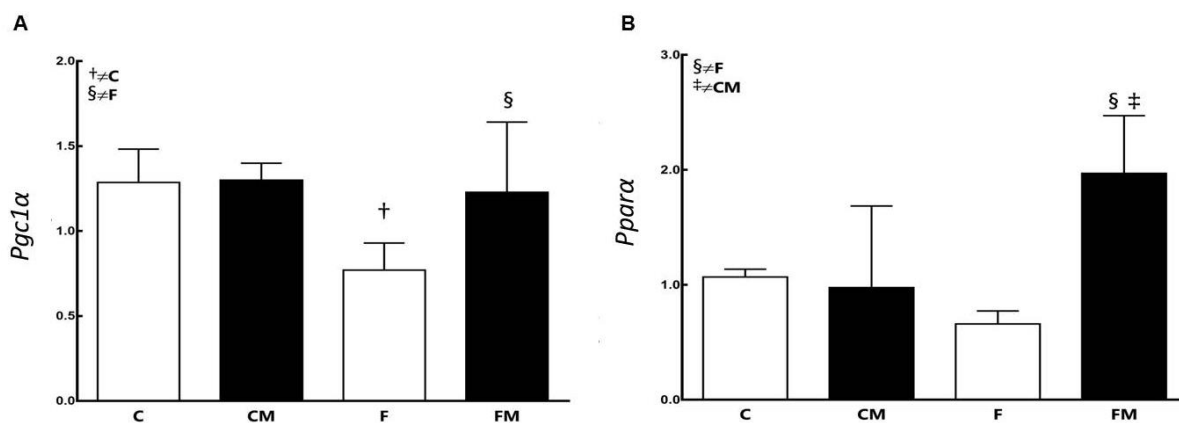
Fonte: A autora, 2019.

4.6.2 β -oxidação e lipogênese hepática

Frutose diminuiu *Pgc1 α* no grupo F (-39,8% quando comparado ao grupo C; $P=0,02$, Figura 6A). A metformina aumentou o *Pgc1 α* no grupo FM (+37% em comparação ao grupo F; $P=0,03$) e restaurou o *Pgc1 α* no nível do grupo CM ($P=0,9595$ comparando o grupo FM com o grupo CM). A dieta e a metformina não interagiram, mas afetaram os achados de forma independente (ANOVA de dois fatores; $P=0,01$).

A frutose não alterou o *Ppar- α* no grupo F, embora tenha sido 38% menor em comparação ao grupo C ($P=0,4$, Figura 6 B). A metformina aumentou o *Ppar- α* no grupo FM (+201% quando comparado ao grupo F; $P=0,001$). *Ppar- α* foi maior no grupo FM do que no grupo CM (+102%; $P=0,01$). Dieta e Metformina afetaram os achados de forma independente e mostraram interação (ANOVA de dois fatores; $P=0,002$).

Figura 6 – Biogênese mitocondrial no fígado



Legenda: Expressão gênica hepática de *Pgc1 α* (A) e *Ppar- α* (B) dos grupos experimentais no período pós-tratamento. O controle endógeno β -actina foi utilizado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são expressos como média e DP (n= 10 cada grupo). $P<0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviações: *Ppar α* , receptor α ativador de proliferador de peroxissoma; *Pgc1 α* , coativador gama 1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma.

Fonte: A autora, 2019.

A frutose aumentou o *Ppar γ* no grupo F (+164% quando comparado ao grupo C; $P<0,0001$, Figura 7 A). A metformina diminuiu o *Ppar γ* no grupo FM (-21% quando comparado com o grupo F, $P=0,001$). No entanto, *Ppar γ* ainda foi alta no grupo FM

(+49% em relação ao grupo CM; $P=0,008$). A metformina afetou o resultado (ANOVA de dois fatores; $P=0,0005$).

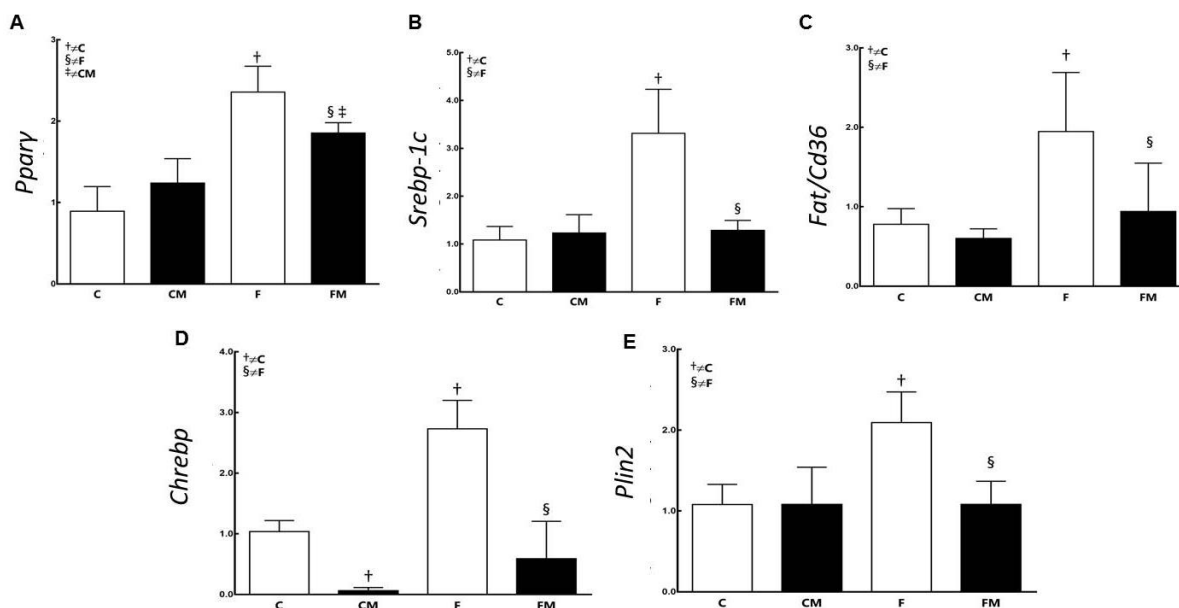
A frutose melhorou o *Srebp-1c* no grupo F (+206% em comparação com o grupo C, $P<0,0001$, Figura 7 B). A metformina reduziu o *Srebp-1c* no grupo FM (-157% em relação ao grupo F, $P<0,0001$). A metformina restaurou o *Srebp-1c* sem diferença para o grupo CM ($P=0,90$). Dieta e Metformina apresentaram interação nos achados (ANOVA de dois fatores; $P=0,0003$).

A frutose aumentou a expressão de *Fat/Cd36* no grupo F (+150% quando comparado ao grupo C; $P=0,009$). A metformina reduziu a expressão de *Fat/Cd36* no grupo FM (-52% comparado ao grupo F; $P=0,02$, Figura 7 C), o grupo FM e o grupo CM foram equivalentes ($P=0,64$). Não houve interação significativa entre dieta e tratamento (ANOVA de dois fatores; $P=0,07$). Dieta e Metformina afetaram independentemente a expressão de *Fat/Cd36*; dieta ($P=0,003$), Metformina (ANOVA de dois fatores; $P=0,01$).

A frutose melhorou o *Chrebp* no grupo F (+162% comparado ao grupo C, $P<0,0001$, Figura 7 D). A metformina diminuiu o *Chrebp* no grupo FM (-440% em relação ao grupo F, $P<0,0001$), e não houve diferença entre os grupos CM e FM ($P=0,10$). A metformina afetou o resultado (ANOVA de dois fatores; $P<0,0001$).

Perilipina-2 (*Plin2*) foi regulada após a ingestão de frutose no grupo F (+94% em relação ao grupo C; $P=0,002$, Figura 7 E). A metformina reduziu a expressão de *Plin2* no grupo FM (-48%, comparado ao grupo F, $P=0,002$). Nenhuma diferença no *Plin2* foi observada entre os grupos FM e CM ($P=0,9$). Dieta e Metformina apresentaram interação nos resultados (ANOVA de dois fatores; $P=0,005$).

Figura 7 – Lipogênese hepática



Legenda: Expressão gênica hepática de *Pparγ* (A), *Srebp-1c* (B), *Fat/Cd36* (C), *Chrebp* (D) e *Plin2* (E) dos grupos experimentais no período pós-tratamento. O controle endógeno β-actina foi utilizado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são expressos como média e DP (n= 10 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: receptor do ativador proliferador de peroxissoma gama, PPARγ; proteína de ligação ao elemento regulador de esterol, SREBP-1c; proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos, ChREBP; translocase de ácido graxo/cluster de diferenciação 36, FAT/CD36; perilipina-2, Plin2. Grupos: C, dieta controle; F dieta frutose; M, metformina.

Fonte: A autora, 2019.

4.6.3 Defesas antioxidantes hepáticas e peroxidação lipídica

Frutose diminuiu a expressão de *Sod2* (-35%) e sua atividade enzimática no grupo F (-53%) em comparação com o C grupo ($P=0,0159$, Figuras 8 A e 9 A). A metformina aumentou a expressão de *Sod2* (+47%) e sua atividade enzimática no grupo FM (+76%) em comparação com o grupo F ($P=0,0349$). A expressão de *Sod2* e sua atividade enzimática não foram diferentes entre os grupos FM e CM ($P=0,31$). Dieta e Metformina apresentaram interação nos resultados (ANOVA de dois fatores; $P=0,002$).

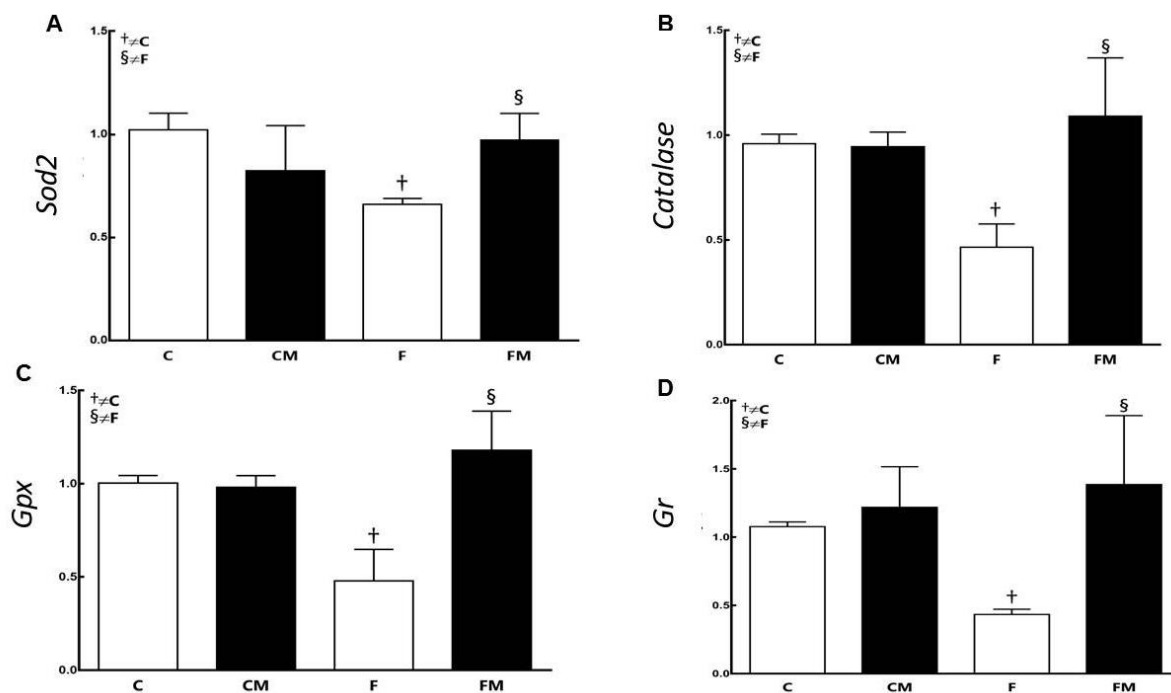
A frutose reduziu apenas a expressão de catalase (*Cat*) no grupo F (-52%) em comparação com o grupo C ($P=0,003$). A metformina aumentou a expressão de *Cat* (+134%) e sua atividade enzimática no grupo FM (+59%) em comparação com o grupo F ($P=0,02$). A expressão enzimática do *Cat* também foi aumentada no grupo CM (+151% comparado ao grupo C; $P=0,001$). A expressão de *Cat* e sua atividade enzimática não foram diferentes nos grupos FM e CM ($P=0,5060$) (Figuras 8B e 9B).

A frutose reduziu a expressão de *Gpx* e a sua atividade enzimática no grupo F (-54%) em comparação com o grupo C ($P=0,0009$, Figuras 7C e 8C). A metformina aumentou a expressão de *Gpx* (+146%) e sua atividade enzimática no grupo FM (+106%) comparado ao grupo F ($P<0,0001$). Os grupos FM e CM não apresentaram diferenças na *Gpx* Dieta e Metformina interagiram com os resultados (ANOVA de dois fatores, $P<0,0001$) (Figuras 8C e 9C).

A frutose diminuiu a expressão de *Gr* no grupo F (-60% em comparação com o grupo C; $P=0,03$). A metformina teve aumento da expressão de *Gr* no grupo FM (+187% quando comparado ao grupo F, $P=0,03$, Figura 8 D). A expressão de *Gr* não foi diferente entre os grupos FM e CM ($P=0,68$). A metformina afetou o resultado (ANOVA de dois fatores; $P=0,002$).

Em relação à peroxidação lipídica no fígado, a frutose aumentou os níveis de MDA no grupo F (+21% em relação ao grupo C; $P<0,0001$, Figura 9D). A metformina alterou as concentrações de MDA no grupo FM (-7% quando comparado ao grupo F, $P=0,03$; +11% em relação ao grupo CM, $P=0,007$).

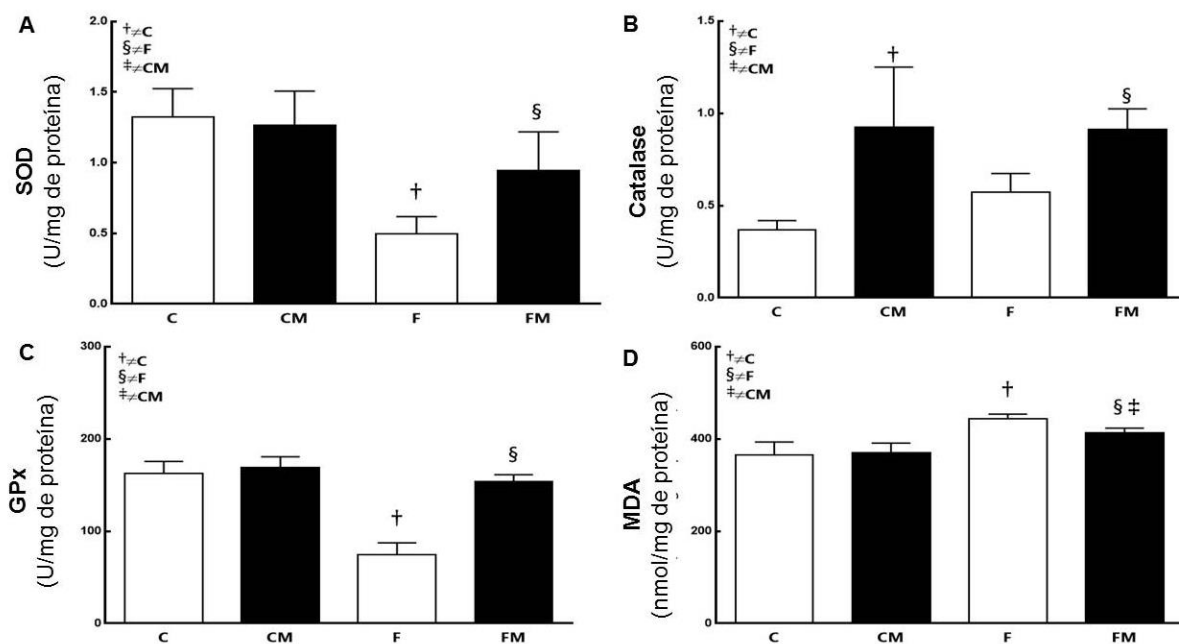
Figura 8 – Expressão gênica de enzimas antioxidantes no fígado



Legenda: Expressão gênica hepática de SOD2 (A), Catalase (B), GPx (C) e GR (D) dos grupos experimentais no período pós-tratamento. O controle endógeno β -actina foi utilizado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são expressos como média e DP (n= 10 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: superóxido dismutase 2, SOD2; glutathiona peroxidase, GPx; glutathiona redutase, GR.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 9 – Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica no fígado



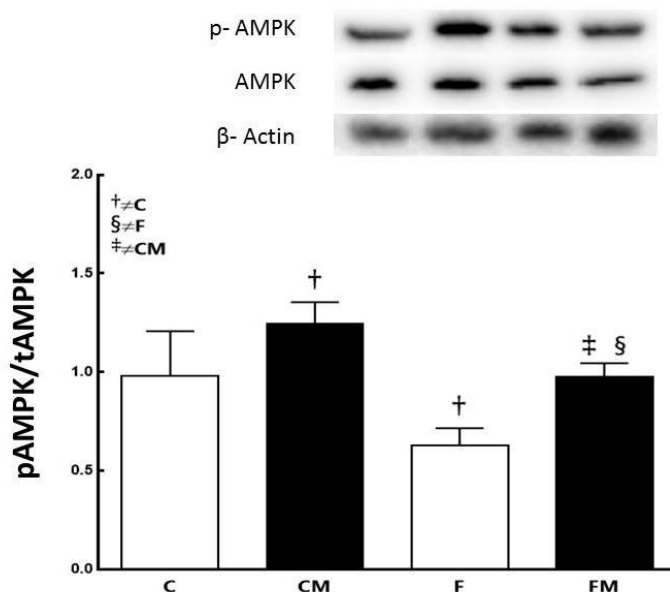
Legenda: Atividade enzimática hepática da SOD (A), Catalase (B), GPx (C) e MDA (D) dos grupos experimentais no período pós-tratamento. Os dados são expressos como média e DP (n= 10 cada grupo). $P < 0.05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šidák). Grupos dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: superóxido dismutase 2, SOD2; glutatona peroxidase, GPx; malondealdeído, MDA.

Fonte: A autora, 2019.

4.6.4 Ativação da AMPK no fígado

A frutose diminuiu a fosforilação de AMPK no grupo F (-36% em comparação com o grupo C; $P=0,0044$, Figura 10). A metformina elevou a fosforilação da AMPK no grupo FM (+56% em comparação com o grupo F, $P=0,004$). No entanto, a fosforilação da AMPK não foi completamente restaurada no grupo FM (-22% do que no grupo CM; $P=0,02$). A metformina teve uma ação que aumentou a fosforilação da AMPK no grupo CM (+28% quando comparado com o grupo C, $P=0,0217$). Assim, a metformina afetou o resultado (ANOVA de dois fatores; $P<0,001$).

Figura 10 – Expressão proteica de AMPK no fígado



Legenda: Expressão proteica no tecido hepático de AMPK dos grupos experimentais no período pós-tratamento. O controle endógeno β -actina foi utilizado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são expressos como média e DP ($n= 10$ cada grupo). $P<0.05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de dois fatores e o teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: proteína quinase ativada por AMP, AMPK.

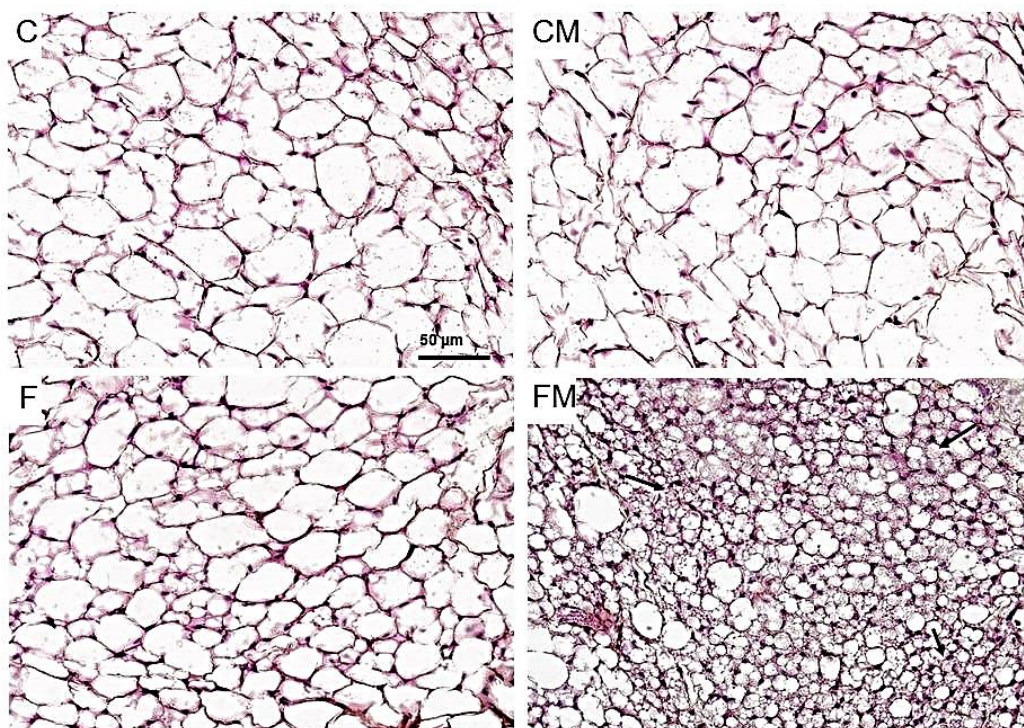
Fonte: A autora, 2019.

4.7 Resultados no tecido adiposo

4.7.1 Tecido adiposo inguinal (subcutâneo)

Os adipócitos brancos são grandes estruturas contendo uma única gota lipídica de forma a preencher quase toda a célula (célula unilocular) no depósito inguinal dos grupos C, CM e F. Entretanto, nos animais com FM, observaram-se aglomerados de adipócitos parecidos com o tecido adiposo marrom apresentando gotículas lipídicas menores e múltiplas no citoplasma (Figura 11).

Figura 11 – Estrutura do tecido adiposo subcutâneo



Legenda: Tecido adiposo branco subcutâneo no período pós tratamento (Coloração HE; mesma ampliação para todas as fotomicrografias). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M.

Nota: A aparência global unilocular dos adipócitos brancos estava presente nos grupos C e CM. No grupo FM, alguns adipócitos desenvolveram uma apresentação de "gordura marrom" com adipócitos multiloculares (setas).

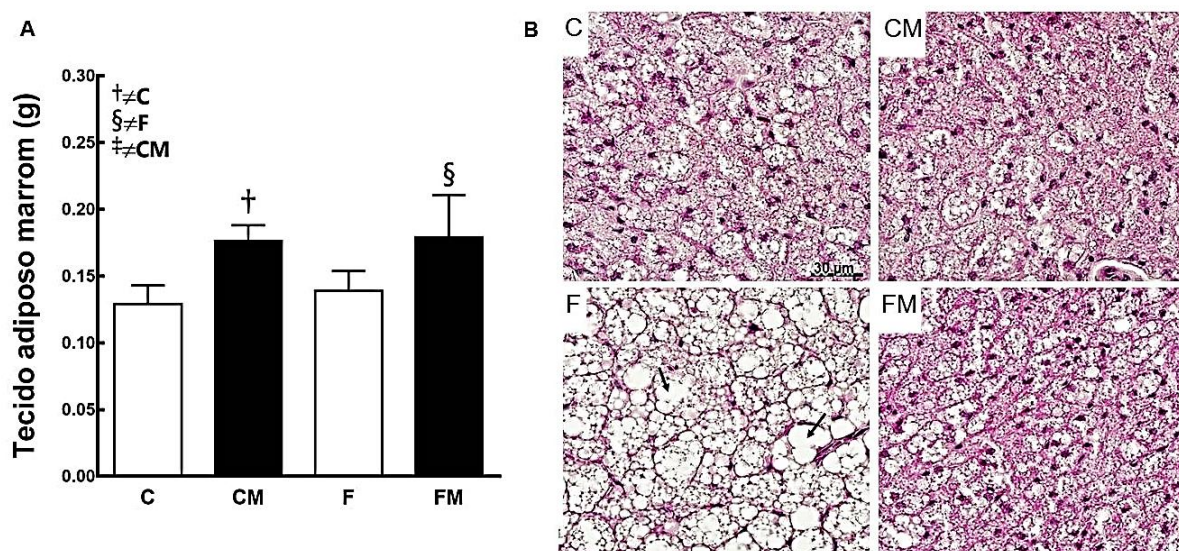
Fonte: A autora, 2019.

4.7.2 Tecido adiposo marrom

Houve maior massa de TAM no grupo CM do que no grupo C (+36%), e no grupo FM quando comparado ao grupo F (+21%) (Figura 12A).

Os adipócitos marrons são células multiloculares presentes nos grupos C e CM, mas uma gordura infiltrada, e gotículas lipídicas mais significativas nos adipócitos foram observadas no grupo F, correspondendo ao fenótipo "adipócito branco". No entanto, a estrutura multilocular dos adipócitos marrons foi restaurada no grupo FM (Figura 12B).

Figura 12 – Análise do tecido adiposo marrom



Legenda: Massa de tecido adiposo marrom (A) e fotomicrografia de adipócitos marrons (B) no período pós tratamento (Coloração HE). Os dados são expressos como média \pm DP (n= 10 cada grupo, ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Šidák). Grupos dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M.

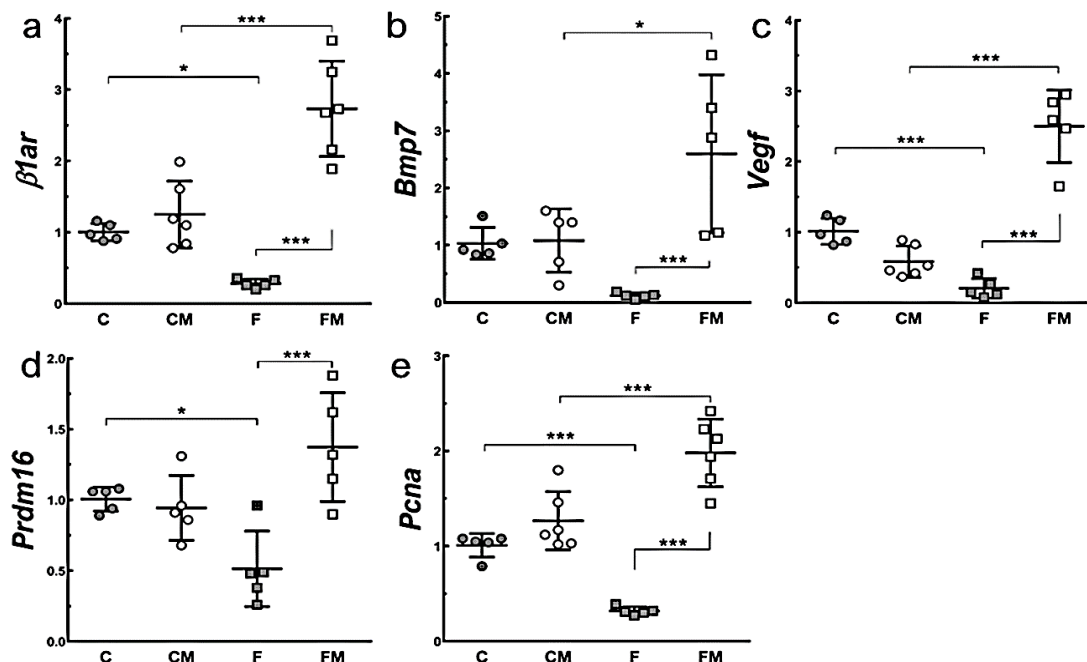
Nota: A aparência multilocular global dos adipócitos marrons estava presente nos grupos C e CM. No grupo F, os adipócitos apresentaram gotículas lipídicas mais significativas, um fenótipo se aproximando dos "adipócitos brancos" (setas). O grupo FM apresentou adipócitos marrons como os grupos C e CM.

Fonte: A autora, 2019.

4.7.2.1 Diferenciação do TAM

A expressão de $\beta 1ar$ diminuiu no grupo F quando comparado ao grupo C (-72%) e aumentou no grupo FM quando comparado ao grupo CM (+118%) e ao grupo F (+869%) (Figura 13A). Além disso, *Bmp7* aumentou no grupo FM em comparação com o grupo CM (+140%) e o grupo F (+2065%) (Figura 13B). *Vegf* diminuiu no grupo F quando comparado ao grupo C (-79%) mas aumentou no grupo FM em comparação ao grupo CM (+523%) e ao grupo F (+1100%) (Figura 13C). *Prdm16* foi menor no grupo F comparado ao grupo C (-49%), mas maior no grupo FM comparado ao grupo F (+167%) (Figura 13D). A expressão de *Pcna* diminuiu no grupo F em comparação ao grupo C (-68%), mas aumentou no grupo FM quando comparado ao grupo CM (+56%) e ao grupo F (+523%) (Figura 13E).

Figura 13 – Marcadores de proliferação e diferenciação celular no tecido adiposo marrom



Legenda: Marcadores de proliferação e diferenciação do tecido adiposo marrom dos grupos experimentais no período pós-tratamento: $\beta 1-ar$ (A), *Bmp7* (B), *Vegf* (C), *Prdm16* (D), *Pcna* (E). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0.05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Šidák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: receptor adrenérgico, AR; proteína óssea morfogênica, *Bmp*; fator de crescimento endotelial vascular, *Vegf*, PR contendo domínio 16, *Prdm16*; antígeno nuclear celular em proliferação, *Pcna*.

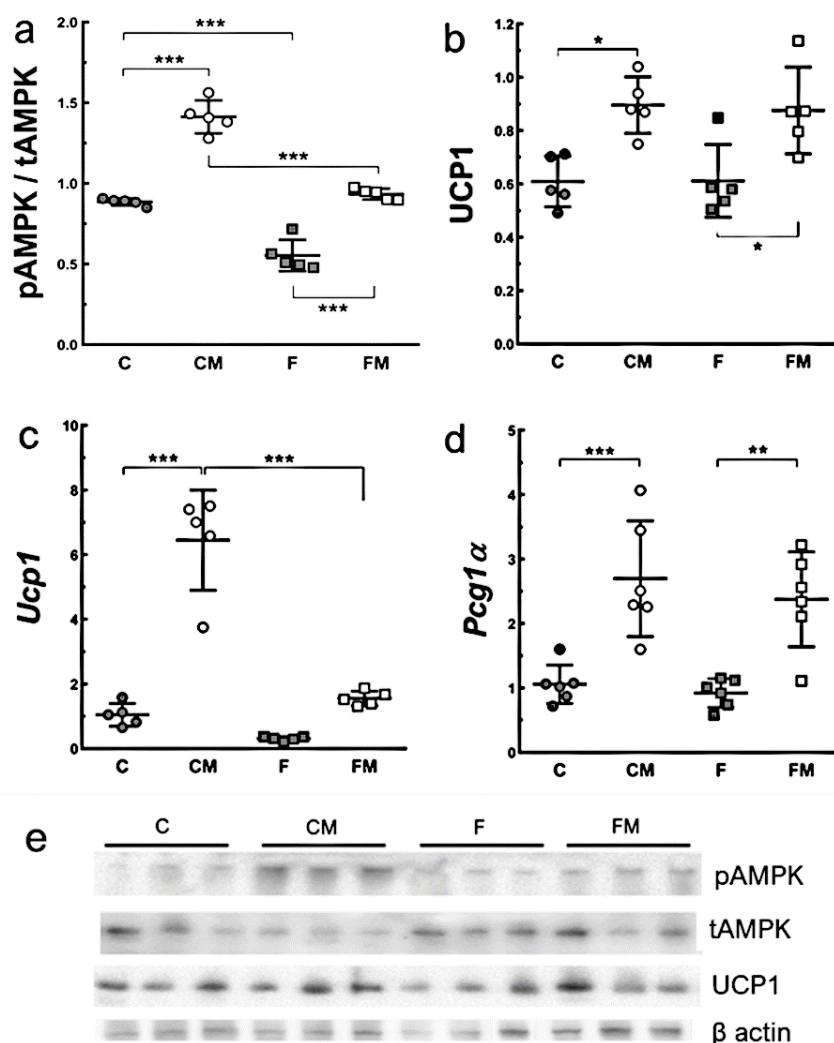
Fonte: A autora, 2019.

4.7.2.2 Marcadores termogênicos no TAM

O nível de proteína pAMPK diminuiu no grupo F quando comparado ao grupo C (-38%) e no grupo FM quando comparado ao grupo CM (-34%). No entanto, pAMPK foi maior no grupo CM do que no grupo C (+60%) e no grupo FM comparado ao grupo F (+69%) (Figura 14 A).

As expressões gênicas de *Pgc1 α* e *Ucp-1* aumentaram no grupo CM quando comparado ao grupo C (+517% para ambos). *Pgc1 α* também foi maior no grupo FM do que no grupo F (+158%), enquanto a expressão da *Ucp-1* foi menor no grupo FM em comparação ao grupo CM (-76%). O nível de proteína UCP-1 aumentou no grupo CM do que no grupo C (+47%), e no grupo FM do que no grupo F (+43%) (Figura 14 B-D).

Figura 14 – Expressão proteica e gênica de marcadores termogênicos no tecido adiposo marrom



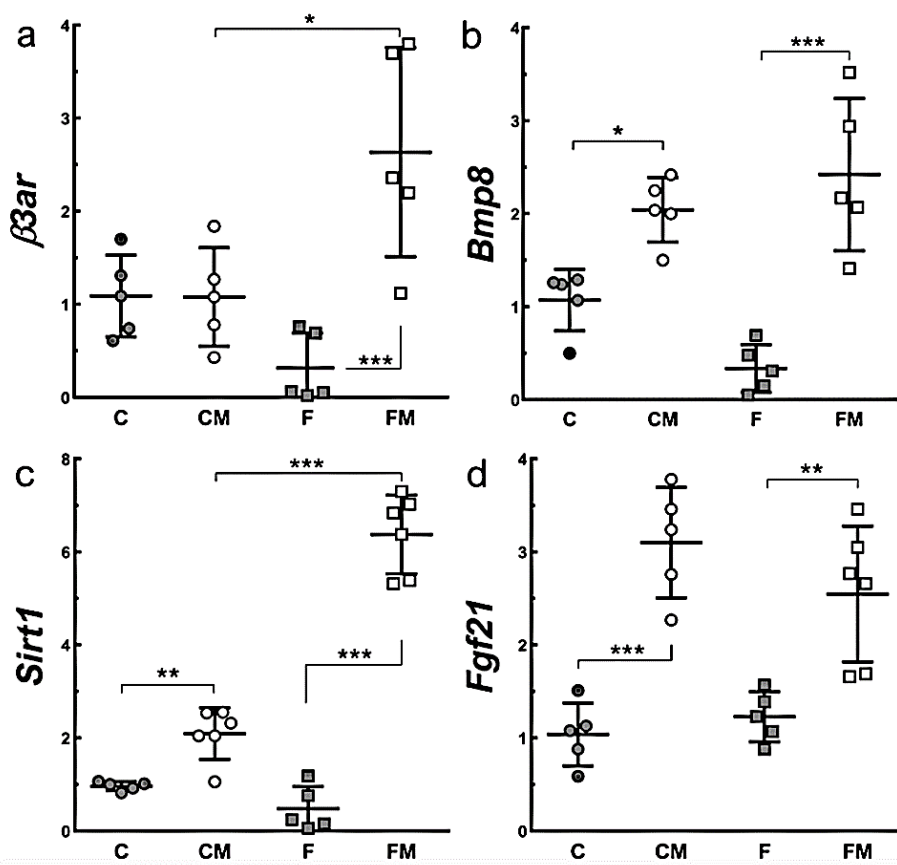
Legenda: Marcadores termogênicos no tecido adiposo marrom dos grupos experimentais no período pós-tratamento. Expressão proteica de pAMPK/tAMPK (A), expressão proteica de UCP-1 (B), UCP-1(C), PGC1α (D), bandas de Western blotting (E). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0.05$, † quando comparado ao grupo C; ‡ grupo F; § grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: proteína quinase ativada por AMP, AMPK; proteína desacopladora tipo 1, UCP-1; coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama 1 α, PGC1α.

Fonte: A autora, 2019.

A expressão do gene $\beta 3ar$ foi maior no grupo FM em comparação ao grupo CM (+144%) e ao grupo F (+734%).

$Bmp8$ (+90%), $Sirt1$ (+117%) e $Fgf21$ (+200%) foram aumentados no grupo CM em comparação ao grupo C, e o grupo FM em relação ao grupo F (+620%; +1226%; +107%, respectivamente). $Sirt1$ também foi maior no grupo FM do que no grupo CM (+205%) (Figuras 15A-D)

Figura 15 – Expressão gênica de marcadores termogênicos no tecido adiposo marrom



Legenda: Marcadores adrenérgicos dependentes e marcadores independentes no tecido adiposo marrom dos grupos experimentais no período pós-tratamento. $\beta 3-ar$ (A), *Bmp8* (B), *Sirt1*(C), *Fgf21*(D). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0.05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: receptor adrenérgico, AR; proteína óssea morfogênica, Bmp; sirtrulina 1, Sirt1; fator de crescimento de fibroblasto 21, Fgf21.

Fonte: A autora, 2019.

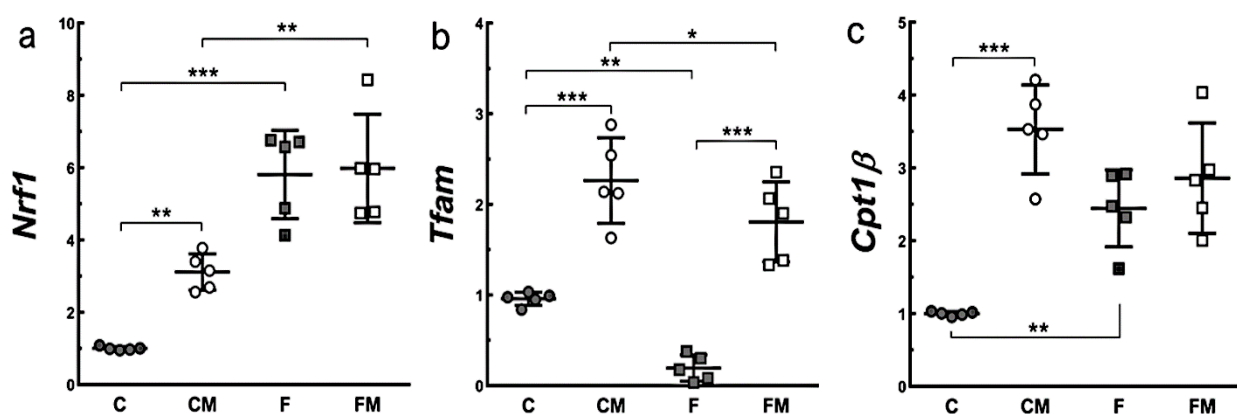
4.7.2.3 Biogênese mitocondrial no TAM

A expressão do gene *Nrf1* aumentou no grupo CM em comparação ao grupo C (+212%), o grupo F em comparação ao grupo C (+482%) e o grupo FM em relação ao grupo CM (+92%).

O *Tfam* foi maior no grupo CM em relação ao grupo C (+136%) e no grupo FM comparado ao grupo F (+830%), mas menor no grupo F que no grupo C (-80%), e o grupo FM comparado ao grupo CM (-20%).

Cpt1 foi elevado no grupo CM quando comparado ao grupo C (+254%) e maior no grupo F do que no grupo C (+145%) (Figuras 16 A-C).

Figura 16 – Biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom



Legenda: Marcadores da biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom nos grupos experimentais no período pós-tratamento. *Nrf1* (A), *Tfam* (B), *Cpt1β* (C). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Šidák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: fator respiratório nuclear 1, Nrf1; fator de transcrição mitocondrial a, Tfam; carnitina palmitoiltransferase -1, Cpt1β.

Fonte: A autora, 2019.

4.7.2.4 Marcadores de utilização de substrato no TAM

A expressão do gene *Plin1* (Perilipin) foi diminuída no grupo F em comparação ao grupo C (-68%) e no grupo FM comparado ao grupo CM (-63%).

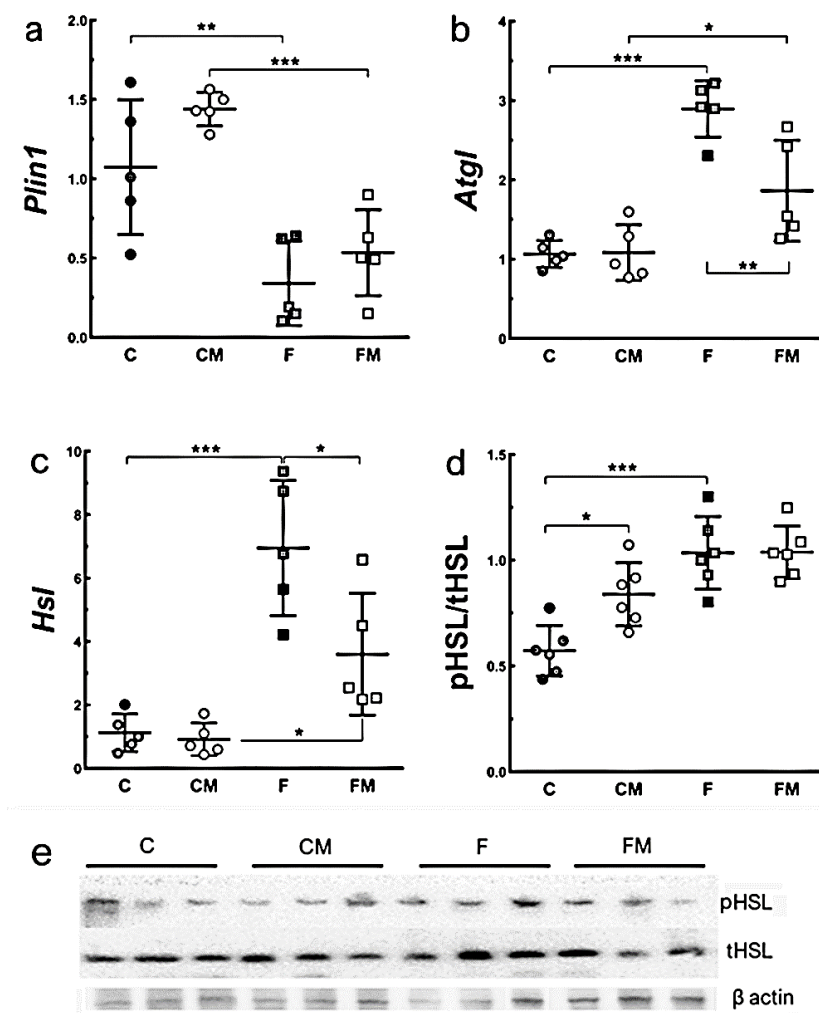
Atgl (+172%) e *Hsl* (+518%) foram maiores no grupo F que no grupo C, e no grupo FM comparado ao grupo CM (+72% e +294%, respectivamente), mas menor no grupo FM do que no grupo F (-36% e -48%, respectivamente) (Figuras 17A-C). O nível de proteína pHSL aumentou no grupo CM em comparação ao grupo C (+47%) e no grupo F comparado ao grupo C (+81%) (Figura 17D).

Além disso, *Lpl* aumentou no grupo F em relação ao grupo C (+200%) e no grupo FM quando comparado ao grupo CM (+118%).

Cd36 foi maior no grupo CM em relação ao grupo C (+80%) e no grupo F em relação ao grupo C (+64%), mas menor no grupo FM do que no grupo CM (-23%).

Ap2 foi maior no grupo F quando comparado ao grupo C (+117%) e no grupo FM do que no grupo CM (+107%), mas menor no grupo FM do que no grupo F (-35%) (Figuras 18A-C).

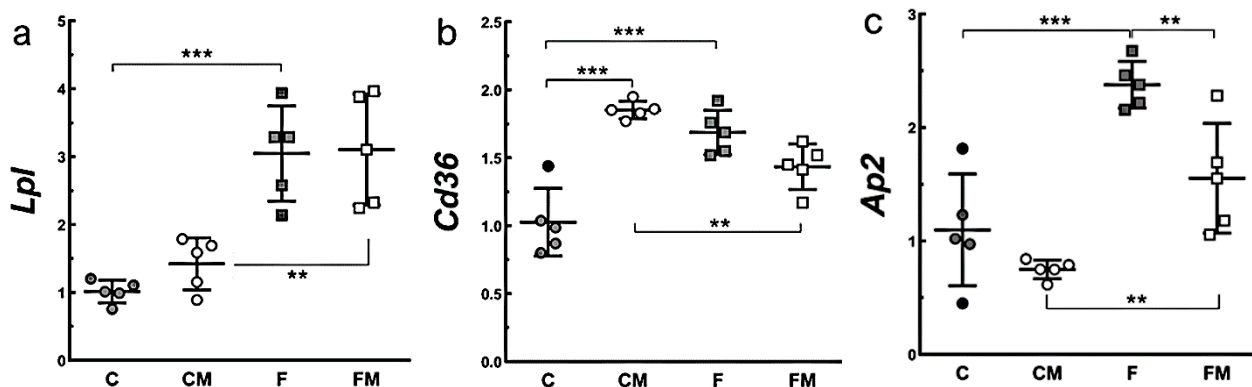
Figura 17 - Expressões gênica e proteica de marcadores de absorção de lipídios no tecido adiposo marrom



Legenda: Marcadores de captação de lipídios no tecido adiposo marrom dos grupos experimentais no período pós-tratamento. *Plin1* (A), *Atgl* (B), *Hsl* (C), expressão proteica de pHSL/tHSL (D), bandas de Western blotting (E). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; § grupo F; ‡ grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Šídák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: perilipina1, *Plin*; lipase de triacilglicerol do adipócito, *Atgl*; lipase sensível ao hormônio, *Hsl*.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 18 – Expressão gênica de marcadores de lipólise no tecido adiposo marrom

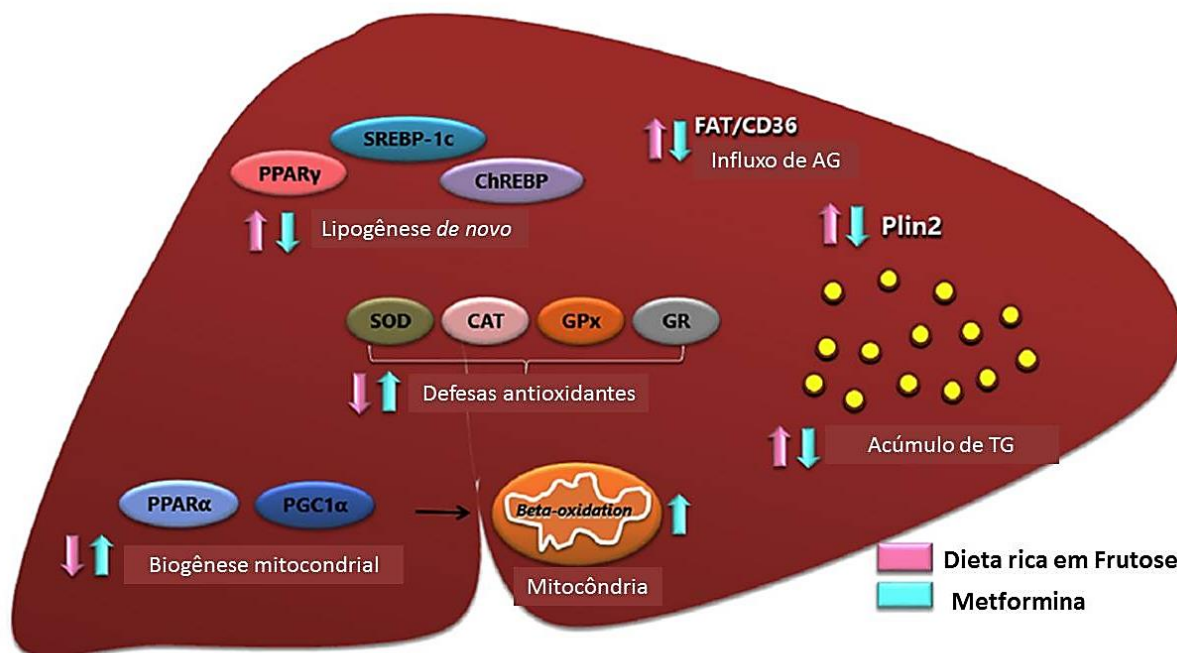


Legenda: Marcadores de lipólise do tecido adiposo marrom dos grupos experimentais no período pós-tratamento. *Lpl* (A), *Cd36* (B), *Ap2* (C). Os dados são expressos como média e DP (n= 5-6 cada grupo). $P < 0,05$, † quando comparado ao grupo C; ‡ grupo F; § grupo CM (ANOVA de um fator e teste posthoc de Holm-Sídák). Grupos: dieta controle, C; dieta frutose, F; metformina, M. Abreviaturas: lipoproteína lipase, *Lpl*; cluster de diferenciação 36, *Cd36*; proteína adipócito 2, *Ap2*.

Fonte: A autora, 2019.

Em suma, os resultados encontrados no tecido hepático (Figura 19):

Figura 19 – Síntese dos achados no tecido hepático



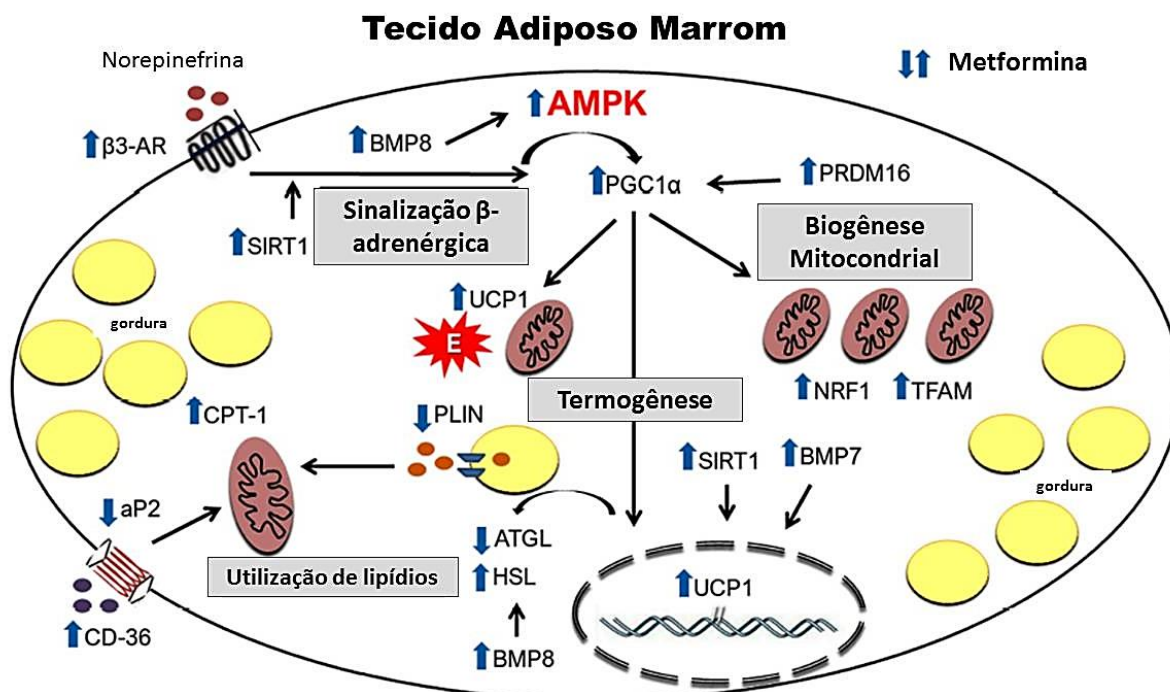
Legenda: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c, SREBP-1c; proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos, ChREBP; receptor ativador de proliferador de peroxissoma gama, PPAR γ ; translocase de ácido graxo, FAT/CD36; coativador gama-receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1- α , PGC1 α ; superóxido dismutase, SOD; catalase, CAT; glutaciona peroxidase, GPx; glutaciona redutase, GR; triglicérides, TG; proteína de gota lipídica Perilipin 2, Plin2.

Nota: A dieta rica em frutose estimula SREBP-1c e ChREBP, aumentando a lipogênese *de novo*. Além disso, o PPAR γ e seu transcrito FAT/CD36 são ativados, aumentando o influxo de ácidos graxos do tecido adiposo para dentro do hepatócito. As defesas antioxidantes são reduzidas, assim como PGC1 α , prejudicando a biogênese mitocondrial. Esses fatores resultam em acúmulo de triglicérides no hepatócito (justificado pelo Plin2 elevado), caracterizando esteatose hepática. O tratamento com metformina reverte todos esses processos. Ocorre uma diminuição na lipogênese *de novo*; PPAR γ reduzido e sua transcrição FAT/CD36; aumento na expressão de PGC1 α e PPAR α , que promovem biogênese mitocondrial com conseqüente aumento da β -oxidação. A metformina também acentua as enzimas antioxidantes, fatores que podem impedir a progressão da doença hepática. A metformina diminui conseqüentemente o acúmulo de triglicérides no fígado.

Fonte: A autora, 2019.

Em suma, os resultados encontrados no tecido adiposo marrom (Figura 20):

Figura 20 – Síntese dos achados no tecido adiposo marrom



Legenda: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c, SREBP-1c; proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos, ChREBP; receptor ativador de proliferador de peroxissoma gama, PPAR γ ; translocase de ácido graxo, FAT/CD36; coativador gama-receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1- α , PGC1 α ; triglicérides, TG; proteína de gota lipídica Perilipin 2, Plin2.

Nota: A noradrenalina liga-se aos receptores β -adrenérgicos. Estimula a expressão de PGC1 α que, por sua vez, atua de várias maneiras: aumenta a UCP-1 (produção de calor), a AMPK estimula o PGC1 α , que estimula o NRF1 e o TFAM (biogênese mitocondrial) e estimula a UCP-1. Outros mediadores envolvidos na termogênese do TAM incluem a SIRT1 (aumenta a sinalização β -adrenérgica e aumenta a expressão gênica da UCP-1 e BMP8, que estimula a AMPK e a HSL), estimulando a termogênese. Além disso, BMP7 (aumenta UCP-1) e PRDM16 (ativa PGC1 α) são indutores potentes da diferenciação dos adipócitos marrons. TAM tem três opções de substrato: a) glicose: GLUT4 e TC10 levam glicose ao ciclo mitocondrial de Krebs; b) a fosforilação da AKT facilita o GLUT4; c) ácidos graxos livres (AGL): a LPL libera AGL para a célula através do CD36, onde a AP2 a transporta para a mitocôndria através da CPT1, d) o TG armazenado na gotícula de gordura é mantido pelo PLIN; ATGL e HSL liberam CPT1 para a produção de calor nas mitocôndrias.

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

O estudo identificou três eventos maiores no fígado relacionados ao consumo crônico de frutose pelos animais:

- a) lesão hepática (DHGNA, com esteatose, aumento da lipogênese e peroxidação lipídica, e redução da beta-oxidação);
- b) metabolismo de carboidratos prejudicado (resistência à insulina, triglicérides aumentados);
- c) aumento do estresse oxidativo (comprometimento de enzimas hepáticas).

A metformina melhorou a resistência à insulina, apesar de uma ingestão continuamente elevada de frutose. A metformina diminuiu a lipogênese, a esteatose hepática e a peroxidação lipídica, tornou a beta-oxidação mais eficiente e aumentou as defesas antioxidantes.

Há relato da ação da metformina aumentando a FOXO3, fatores de transcrição envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo, regulando positivamente os antioxidantes, como a catalase e a SOD, com isso potencialmente melhorando à longevidade em humanos (Willcox et al. 2008). Também há relato da associação entre o uso de metformina e um efeito benéfico na prevenção e tratamento do câncer (Morales e Morris 2015). Além disso, a metformina atenua o estresse oxidativo hepático em ratos alimentados com frutose (Bagul et al. 2012), o que pode estar associado ao aumento da atividade da catalase (Dai et al. 2014) e melhora da atividade mitocondrial (Repiscak et al. 2014). Em nível molecular, além da metformina aumentar a atividade da AMPK e dar mais proteção antioxidante, diminui o acúmulo de dano oxidativo e inflamação crônica (Martin-Montalvo et al. 2013).

O mecanismo de ação metformina ainda não é totalmente esclarecido, apesar de ser a droga antidiabética oral mais usada em todo o mundo. Uma causa possível para as discussões sobre o mecanismo de ação metformina deve-se ao uso pelos estudos de variadas concentrações farmacológicas de metformina, às vezes muito superiores às doses terapêuticas (He e Wondisford 2015). Com isso em perspectiva, nossa preocupação de não usar uma dose muito elevada de metformina nos fez analisar várias prescrições encontradas na literatura para roedores, cuja média foi de 250 mg/kg/dia (ainda menor do que usamos anteriormente) (Souza-Mello et al. 2010).

O equilíbrio entre a resistência à insulina / sensibilidade à insulina é crucial na DHGNA. No modelo de dieta rica em frutose que usamos, a metformina melhorou a sensibilidade à insulina, o que concorda com estudos anteriores (Anurag e Anuradha 2002, Cleasby et al. 2004), possivelmente porque a metformina regula positivamente a expressão do receptor beta de insulina (IR) e a transdução de sinalização IRS2/fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt), aumentando o armazenamento de glicogênio hepático e melhorando a resistência à insulina (Xu et al. 2016).

Além dos efeitos diretos sobre a sinalização insulínica no fígado, aumentando a fosforilação de FOXO3 (Takayama et al. 2014), a metformina protege o fígado desde o início da DHGNA induzida pela frutose, alterando a permeabilidade intestinal e, subsequentemente, a ativação independente de endotoxina das células de Kupffer (Spruss et al. 2012).

O PGC1 α é um fator de transcrição que aumenta o número e a função das mitocôndrias em fígados com esteatose (Aharoni-Simon et al. 2011), um conhecido regulador essencial do metabolismo lipídico mitocondrial e lipídico hepático. PPAR α é um fator de transcrição e principal regulador do metabolismo lipídico no fígado (Aatsinki et al. 2014). O PPAR α está associado a beta-oxidação que é ativada em condições de privação de energia, uma resposta adaptativa chave ao jejum prolongado (Kersten et al. 1999). Recentemente, uma ativação dupla de PPAR γ e PPAR α foi visto com efeito na melhoria na DHGNA pela modulação de algumas expressões gênicas de tecido hepático e tecido adiposo (Abd El-Haleim et al. 2016). Nossas descobertas estão de acordo com esses relatos. Aqui mostramos como as expressões gênicas de fatores de transcrição relacionados à biogênese mitocondrial e a regulação lipídica se comportam nos animais alimentados com frutose e nos animais tratados com metformina. Podemos ver claramente que a dieta rica em frutose foi responsável por diminuir a expressão de PGC1 α e que a metformina foi responsável por melhorar ambos os fatores, mesmo em animais que continuaram a receber a dieta com frutose.

PPAR γ ativa a lipogênese no fígado (Barbosa-da-Silva et al. 2015), enquanto SREBP-1c regula os genes necessários para o metabolismo da glicose e síntese de ácidos graxos, e há uma associação entre estresse oxidativo e DHGNA via SREBP-1c (Aragno et al. 2009). Neste estudo, um aumento na fosforilação da AMPK promovida pela metformina suprimiu a expressão de SREBP-1c, justificando a ação

da metformina na regulação do metabolismo de lipídios e glicose (Zhang et al. 2012). Podemos ver que todos os marcadores estão significativamente aumentados nos animais com dieta frutose, e a metformina reduziu os marcadores, às vezes para os mesmos níveis do grupo controle.

A translocase de ácido graxo (FAT/CD36) pertence à família de receptores de classe B, que é usada pelos hepatócitos para absorver AGL via proteínas transportadoras e a translocação de FAT/CD36 para a membrana plasmática dos hepatócitos contribui para o acúmulo de gordura hepática em pacientes com DHGNA (Miquilena-Colina et al. 2011). A regulação hepática de FAT/CD36 está significativamente associada a resistência à insulina, à hiperinsulinemia e ao aumento da esteatose em pacientes com EHNA e vírus da hepatite C (He et al. 2011). O ChREBP é outro importante fator de transcrição na resposta hepática ao excesso de carboidratos na dieta, pode prevenir a hipertrigliceridemia induzida pela frutose, mas sem grandes melhorias na esteatose hepática e na eficiência de insulina hepática (Erion et al. 2013). Perilipina-2 (PLIN2) é uma proteína rica em gotículas lipídicas no fígado, o padrão de expressão de PLIN2 nos fígados DHGNA varia com o tamanho das gotículas lipídicas e está intimamente associado ao dano oxidativo (Fujii et al. 2009).

Determinamos a expressão gênica e a atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no fígado. Os resultados são homogêneos, indicando que a maioria das enzimas está reduzida no fígado dos animais com frutose, mas se recuperam com a metformina, mesmo quando os animais continuam sendo alimentados com dieta rica em frutose. Nesse contexto, a SOD é uma importante enzima antioxidante, pois a frutose leva à geração de ânion superóxido no complexo I das mitocôndrias pela ativação da NADPH oxidase (Aronis et al. 2005). É bem conhecido que SOD é a primeira linha de defesa contra a produção de EROs, uma vez que desmuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Portanto, o aumento dos níveis de SOD pode resultar em uma redução na carga oxidativa causada por alta ingestão de frutose. Nossos achados concordam com a literatura pois há redução da atividade da SOD no fígado dos animais alimentados com frutose (Botezelli et al. 2012). A catalase (no peroxissoma dos hepatócitos) é também uma importante enzima antioxidante. Os animais alimentados com frutose tiveram menor expressão gênica de catalase. Um estudo anterior demonstrou que a atividade da catalase varia dependendo do substrato em que é encontrada (Kirkman e Gaetani 2007). Além disso,

analisamos o GPx e o GR, ambos muito diminuídos no fígado dos animais alimentados com dieta rica em frutose, mas restaurados pela metformina. O principal papel biológico da GPx é proteger o organismo contra danos oxidativo. A GR catalisa a redução do dissulfeto de glutathione na forma de sulfidril glutathione, que é uma molécula crítica na resistência ao estresse oxidativo e na manutenção do perfeito ambiente celular (Deponete 2013).

A dieta rica em frutose usada no estudo induziu aumento nos níveis de MDA hepático, denotando peroxidação lipídica. A oxidação lipídica nas membranas citoplasmáticas interfere na sua permeabilidade seletiva, liberando EROs. O desequilíbrio crônico na produção de EROs pode prejudicar a capacidade do sistema antioxidante de reduzir os níveis desses radicais livres, reduzindo sua função protetora (Girard et al. 2006). A metformina melhorou a função do sistema antioxidante, pois atenuou a peroxidação lipídica no fígado.

Estudamos também o TAM e demonstramos que a metformina tem uma ação que promove a proliferação e diferenciação de adipócitos marrons, seguida do aumento da massa de TAM. A metformina também melhorou os marcadores termogênicos no TAM, bem como os marcadores de mediadores da biogênese mitocondrial e de utilização de ácidos graxos (a metformina reduz *Atgl* e *Hsl*, que são enzimas conhecidas por hidrolisar triacilglicerol, mobilizando as gorduras armazenadas).

A literatura relata que o alto consumo de frutose induz resistência à insulina, aumento de lipídios plasmáticos e esteatose hepática (Anurag e Anuradha 2002, Cleasby et al. 2004, Katz et al. 2000). É importante ressaltar que os efeitos metabólicos da ingestão crônica de frutose no presente estudo aconteceram sem que houvesse ganho relevante na massa corporal dos animais, porque a dieta rica em frutose foi calculada para ser isoenergética com a dieta controle, e a ingestão de alimentos não foi diferente entre os grupos. Conseqüentemente, os efeitos da metformina que observamos podem ser considerados independentes das alterações na massa corporal.

Só recentemente o TAM passou a ser considerado um alvo da metformina (Breining et al. 2018). Outros estudos indicaram que o efeito hipolipemiante da metformina é devido ao aumento da depuração de triglicérides por VLDL no TAM, acompanhado por aumento da maquinaria lipolítica e conteúdo mitocondrial no adipócito marrom (Geerling et al. 2014). Ao que sabemos, nosso estudo é o primeiro

a tentar associar o TAM como alvo de metformina em um modelo de dieta rica em frutose. Vimos que metformina aumenta PGC1 α e UCP-1, o que concorda com relatos anteriores, onde metformina melhorou os marcadores relacionados ao TAM, no TAB subcutâneo de camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica (Kim *et al.*, 2016), e também aumentou UCP-1 no TAM de ratos (Tokubuchi *et al.* 2017) e em adipócitos 3T3-L1 (Kim *et al.* 2016).

A metformina é reconhecida como um potente indutor da AMPK (Zhou *et al.* 2001) e vias intracelulares que vão além da ativação da AMPK (Fujita e Inagaki 2017). Aqui vimos que a metformina aumentou a atividade de AMPK no TAM dos camundongos, possivelmente aumentando o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias e a oxidação de ácidos graxos (Geerling *et al.* 2014). Em cultura de adipócitos 3T3-L1 a metformina reduziu o estresse do retículo endoplasmático de maneira dependente da AMPK (Li *et al.* 2016) e, usando o composto C (um inibidor da AMPK), houve redução da IL-6 e TNF α que estão normalmente aumentados com o uso de metformina (Jing *et al.* 2018). A ativação da AMPK no TAM também melhorou a formação de adipócitos marrons *in vitro* (Wang *et al.* 2017). Portanto, embora o estudo atual tenha uma limitação porque o efeito da metformina dependente de AMPK não foi medido diretamente com o uso de um inibidor de AMPK, é razoável supor que a ação da metformina no TAM usa o AMPK.

Observamos que houve aumento dos marcadores de proliferação e diferenciação celular, associado ao aumento da massa de TAM. A proliferação de adipócitos marrons é mediada por β 1-AR (Bronnikov *et al.* 1992) com a participação de PCNA (Fukano *et al.* 2016) e VEGF (Shimizu *et al.* 2014). PRDM16 é um regulador importante da diferenciação de adipócitos e BMP7 é um indutor essencial desse processo (Kajimura 2015), aumentando a atividade mitocondrial via aumento da absorção e oxidação de ácidos graxos (Townsend *et al.* 2013). A hiperplasia do TAM também pode ocorrer quando os adipócitos estão sob estímulos β 3-adrenérgicos (Fukano *et al.* 2016). A metformina aumentou a sinalização adrenérgica, especialmente no grupo FM, incluindo β 3-AR, BMP8 e SIRT1. BMP8B está envolvida na sinalização termogênica do TAM (Whittle *et al.* 2012), e SIRT1 potencializa a resposta aos estímulos β -adrenérgicos no TAM (Boutant *et al.* 2015).

A metformina aumentou a atividade da AMPK no TAB associada à expressão aumentada de SIRT1 (Caton *et al.* 2011), o que corrobora com nossos resultados no TAM. Além disso, sugerimos que a metformina também aumentou o FGF21, como

outra via de indução da termogênese no TAM. A metformina é responsável pelo aumento da expressão de FGF21 em adipócitos brancos (Kim et al. 2016) e em camundongos obesos (Kim et al. 2018a). Além disso, no TAM FGF21 pode elevar a expressão da UCP-1 (Keipert et al. 2015).

Os efeitos da metformina elevando os marcadores de biogênese mitocondrial no TAM já foram relatados (Geerling et al. 2014). NRF1 é o principal alvo do PGC1 α e regula vários genes envolvidos na função mitocondrial e biogênese, enquanto o TFAM é responsável pela replicação e manutenção do DNA mitocondrial (Williams et al. 2017). Além disso, a ativação do eixo α -NRF da AMPK/PGC1 melhora os reguladores da biogênese mitocondrial (Kukidome et al. 2006), um dos possíveis mecanismos observados no presente estudo. A metformina aumentou a CPT-1 (uma proteína mitocondrial essencial associada à utilização de ácidos graxos e à capacidade de oxidação). A inibição de CPT-1 prejudica a atividade mitocondrial em adipócitos marrons (Townsend et al. 2013).

A termogênese utiliza ácidos graxos como substrato e, para isso acontecer os estoques intracelulares devem sofrer lipólise com a participação de perilipina, ATGL e HSL (Martins et al. 2017). A corrente sanguínea é uma fonte de ácidos graxos para uso ou, mais frequentemente, para a manutenção dos depósitos de gordura (Khedoe et al. 2015). A ativação do TAM também envolve aumento da LPL e do CD36, que são críticos para a absorção de ácidos graxos (Lynes et al. 2017). Encontramos aqui expressão aumentada de CD36, indicando elevada absorção de ácidos graxos. Como os genes lipolíticos continuaram a ser mais elevados no grupo FM, sugerimos que isso contribuiu para a redução da deposição de gordura no TAM neste grupo.

Mantivemos os animais em temperatura de 20 ± 2 °C, condição na qual os camundongos tiveram que aumentar a produção de calor para manter a temperatura corporal. Esta questão é particularmente importante por causa da correlação para possíveis efeitos em humanos (Maloney et al. 2014). Um estudo recente confirmou que o TAM quando já está totalmente diferenciado não pode ser testado com o frio, medicamentos e nutrientes em estudos realizados em temperatura de cerca de 21 °C. No entanto, o TAM pode se expandir ou reduzir de acordo com a proporção relativa de lipídios teciduais, aumentando as proporções de proteína e formando mais adipócitos (Kalinovich et al. 2017). Esses eventos reforçam que a metformina pode ser considerada um agente de *browning* mesmo em camundongos mantidos em temperatura ambiente.

CONCLUSÃO

Nossos achados contribuem para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações hepáticas causadas pela dieta rica em frutose e pelo tratamento com cloridrato de metformina. A frutose aumenta a lipogênese *de novo* e a peroxidação lipídica, reduz as defesas antioxidantes e diminui a biogênese mitocondrial, que tem efeitos devastadores no fígado a longo prazo. Após um período prolongado de ingestão de frutose, o tratamento com metformina, mesmo continuando a ingestão de frutose, reverte, pelo menos parcialmente, a lesão hepática e previne a progressão de DHGNA para estágios mais graves da doença hepática.

Também mostramos que cloridrato de metformina estimula o TAM em camundongos alimentados com dieta rica em frutose, com proliferação celular (β 1AR, PCNA e VEGF) e diferenciação (PRDM16 e BMP7), possivelmente mediada pela ativação da AMPK. Além disso, a metformina aumenta os marcadores termogênicos (UCP-1 e PGC1 α) e a expressão de mediadores e estimuladores adrenérgicos, associados a marcadores aumentados de biogênese mitocondrial (NRF1 e TFAM), lipólise alterada (perilipina, ATGL e HSL) e absorção de ácidos graxos (LPL, CD36 e a P2). Portanto, o TAM pode ser um alvo da metformina para o tratamento de distúrbio metabólico, independente de alteração da massa corporal.

REFERÊNCIAS

- Aatsinki SM, Buler M, Salomaki H, Koulu M, Pavek P, Hakkola J. Metformin induces PGC-1alpha expression and selectively affects hepatic PGC-1alpha functions. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 2351-63.
- Abd El-Haleim EA, Bahgat AK, Saleh S. Effects of combined PPAR-gamma and PPAR-alpha agonist therapy on fructose induced NASH in rats: Modulation of gene expression. *Eur J Pharmacol* 2016; 773: 59-70.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
- Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23: 363-70.
- Aguila MB, Santos CF, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. *Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease*. In: Molière J, Gauthier L, editors. *Insulin resistance: symptoms, causes and treatment*. Hauppauge, NY: Nova Science Pu.; 2010. p. 1-44.
- Aharoni-Simon M, Hann-Obercyger M, Pen S, Madar Z, Tirosh O. Fatty liver is associated with impaired activity of PPARγ-coactivator 1α (PGC1α) and mitochondrial biogenesis in mice. *Laboratory Investigation* 2011; 91: 1018-28.
- Anurag P, Anuradha CV. Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4: 36-42.
- Aragno M, Tomasinelli CE, Vercellinatto I, Catalano MG, Collino M, Fantozzi R, Danni O, Boccuzzi G. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1067-74.
- Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1221-30.
- Aw DK, Sinha RA, Xie SY, Yen PM. Differential AMPK phosphorylation by glucagon and metformin regulates insulin signaling in human hepatic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447: 569-73.
- Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, Reddy BR, Chakravarty S, Banerjee SK. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res* 2012; 66: 260-8.
- Bahrambeigi S, Yousefi B, Rahimi M, Shafiei-Irannejad V. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 1593-1601.

Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 1989; 12: 553-64.

Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995; 127: 700-4.

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.

Bargut TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell* 2016; 48: 452-60.

Bargut TCL, Santos LP, Machado DGL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Eicosapentaenoic acid (EPA) vs. Docosahexaenoic acid (DHA): Effects in epididymal white adipose tissue of mice fed a high-fructose diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017; 123: 14-24.

Bernsmeier C, Albano E. Liver dendritic cells and NAFLD evolution: A remaining open issue. *J Hepatol* 2017; 66: 1120-2.

Bhanu Prakash KN, Verma SK, Yaligar J, Goggi J, Gopalan V, Lee SS, Tian X, Sugii S, Leow MK, Bhakoo K, Velan SS. Segmentation and characterization of interscapular brown adipose tissue in rats by multi-parametric magnetic resonance imaging. *MAGMA* 2016; 29: 277-86.

Bolsoni-Lopes A, Deshaies Y, Festuccia WT. Regulation of brown adipose tissue recruitment, metabolism and thermogenic function by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Temperature (Austin)* 2015; 2: 476-82.

Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, Voltarelli FA, de Mello MAR. Fructose-rich diet leads to reduced aerobic capacity and to liver injury in rats. *Lipids in health and disease* 2012; 11: 1.

Boutant M, Joffraud M, Kulkarni SS, Garcia-Casarrubios E, Garcia-Roves PM, Ratajczak J, Fernandez-Marcos PJ, Valverde AM, Serrano M, Canto C. SIRT1 enhances glucose tolerance by potentiating brown adipose tissue function. *Mol Metab* 2015; 4: 118-31.

Breining P, Jensen JB, Sundelin EI, Gormsen LC, Jakobsen S, Busk M, Rolighed L, Bross P, Fernandez-Guerra P, Markussen LK, Rasmussen NE, Hansen JB, Pedersen SB, Richelsen B, Jessen N. Metformin targets brown adipose tissue in vivo and reduces oxygen consumption in vitro. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 2264-73.

Bronnikov G, Houstek J, Nedergaard J. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J Biol Chem* 1992; 267: 2006-13.

Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 195-203.

- Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011; 53: 810-20.
- Bruzzi S, Sutti S, Giudici G, Burlone ME, Ramavath NN, Toscani A, Bozzola C, Schneider P, Morello E, Parola M, Pirisi M, Albano E. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radic Biol Med* 2018; 124: 249-59.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
- 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.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.
- Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, Holness MJ, Sugden MC. Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically-obese db/db mice. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 1097-1104.
- 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: 477-85.
- Chang Y, Jung HS, Yun KE, Cho J, Ahn J, Chung EC, Shin H, Ryu S. Metabolically healthy obesity is associated with an increased risk of diabetes independently of nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity (Silver Spring)* 2016; 24: 1996-2003.
- Charrez B, Qiao L, Hebbard L. The role of fructose in metabolism and cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2015; 22: 79-89.
- Chen Q, Wang T, Li J, Wang S, Qiu F, Yu H, Zhang Y, Wang T. Effects of Natural Products on Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* 2017; 9. Doi: 10.3390/nu9020096.
- 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: 111-21.
- Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, Lidell ME, Saraf MK, Labbe SM, Hurren NM, Yfanti C, Chao T, Andersen CR, Cesani F, Hawkins H, Sidossis LS. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2014; 63: 4089-99.
- Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab* 2019; 29: 27-37.

Cleasby ME, Dzamko N, Hegarty BD, Cooney GJ, Kraegen EW, Ye JM. Metformin prevents the development of acute lipid-induced insulin resistance in the rat through altered hepatic signaling mechanisms. *Diabetes* 2004; 53: 3258-66.

Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O, Holman AR, Tal I, Palmer MR, Kolodny GM, Kahn CR. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 10001-5.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 1509-17.

Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Franquet Elia E, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A, Kolodny GM. Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 2015; 21: 33-8.

Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wu K, Deng X, Jing Y, Jia M, Wan J, Zhang L. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem Biol Interact* 2014; 216: 34-42.

Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene* 1994; 147: 157-60.

Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3217-66.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 353-63.

Erion DM, Popov V, Hsiao JJ, Vatner D, Mitchell K, Yonemitsu S, Nagai Y, Kahn M, Gillum MP, Dong J, Murray SF, Mancham VP, Bhanot S, Cline GW, Shulman GI, Samuel VT. The role of the carbohydrate response element-binding protein in male fructose-fed rats. *Endocrinology* 2013; 154: 36-44.

Ferreira GD, Germeyer A, de Barros Machado A, do Nascimento TL, Strowitzki T, Brum IS, von Eye Corleta H, Capp E. Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 175: 157-62.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-21.

Freemark M, Burse D. The effects of metformin on body mass index and glucose tolerance in obese adolescents with fasting hyperinsulinemia and a family history of type 2 diabetes. *Pediatrics* 2001; 107: E55.

Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, Naruko T, Itabe H, Kawada N, Caldwell SH, Ueda M. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16: 893-901.

Fujita Y, Inagaki N. Metformin: New Preparations and Nonglycemic Benefits. *Curr Diab Rep* 2017; 17: 5.

Fukano K, Okamatsu-Ogura Y, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K. Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a α 3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One* 2016; 11: e0166579.

Geerling JJ, Boon MR, van der Zon GC, van den Berg SA, van den Hoek AM, Lombes M, Princen HM, Havekes LM, Rensen PC, Guigas B. Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes* 2014; 63: 880-91.

Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J. Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 2006; 22: 758-66.

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* 2018. Doi: 10.1111/dom.13592.

He J, Lee JH, Febbraio M, Xie W. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236: 1116-21.

He L, Wondisford FE. Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab* 2015; 21: 159-62.

Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kubota K, Tanaka S, Saito M. Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes (Lond)* 2016b; 40: 1655-61.

Ikeda T, Iwata K, Murakami H. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 887-90.

Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, Liu W, Tesz GJ, Birnbaum MJ, Rabinowitz JD. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 2018; 27: 351-61 e353.

Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 461: 256-64.

Kajimura S. Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway. *Int J Obes Suppl* 2015; 5: S11-14.

Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 2017; 134: 127-37.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-10.

Keipert S, Kutschke M, Lamp D, Brachthäuser L, Neff F, Meyer CW, Oelkrug R, Kharitonov A, Jastroch M. Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion. *Mol Metab* 2015; 4: 537-42.

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: 1489-98.

Khedoe PP, Hoeke G, Kooijman S, Dijk W, Buijs JT, Kersten S, Havekes LM, Hiemstra PS, Berbee JF, Boon MR, Rensen PC. Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *J Lipid Res* 2015; 56: 51-9.

Kim A, Chung I, Yoon SH, Yu KS, Lim KS, Cho JY, Lee H, Jang IJ, Chung JY. Effects of proton pump inhibitors on metformin pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drug Metab Dispos* 2014; 42: 1174-9.

Kim EK, Lee SH, Jhun JY, Byun JK, Jeong JH, Lee SY, Kim JK, Choi JY, Cho ML. Metformin Prevents Fatty Liver and Improves Balance of White/Brown Adipose in an Obesity Mouse Model by Inducing FGF21. *Mediators Inflamm* 2016; 5813030.

Kim EK, Lee SH, Lee SY, Kim JK, Jhun JY, Na HS, Kim SY, Choi JY, Yang CW, Park SH, Cho ML. Metformin ameliorates experimental-obesity-associated autoimmune arthritis by inducing FGF21 expression and brown adipocyte differentiation. *Exp Mol Med* 2018a; 50: e432.

Kim SY, Jeon JY, Park SJ, Kim MG. Pharmacokinetics of a Lobeglitazone/Metformin Fixed-Dose Combination Tablet (CKD-395 0.5/1000 mg) Versus Concomitant Administration of Single Agents and the Effect of Food on the Metabolism of CKD-395 in Healthy Male Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev* 2018b. Doi: 10.1002/cpdd.625.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 44-50.

Konishi M, Iwasa M, Araki J, Kobayashi Y, Katsuki A, Sumida Y, Nakagawa N, Kojima Y, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M. Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8-isoprostane. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1821-5.

Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 2006; 55: 120-7.

Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1760-5.

Legeza B, Balazs Z, Odermatt A. Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Lett* 2014; 588: 490-6.

Li A, Zhang S, Li J, Liu K, Huang F, Liu B. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 434: 36-47.

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: 251-64.

Livesey G, Elia M. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 608-28.

Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, Gasbarrini A, Loguercio C, Lonardo A, Marchesini G, Marra F, Persico M, Prati D, Baroni GS. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 272-82.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.

Luque V, Escribano J, Closa-Monasterolo R, Zaragoza-Jordana M, Ferre N, Grote V, Koletzko B, Totzauer M, Verduci E, ReDionigi A, Gruszfeld D, Socha P, Rousseaux D, Moretti M, Oddy W, Ambrosini GL. Unhealthy Dietary Patterns Established in Infancy Track to Mid-Childhood: The EU Childhood Obesity Project. *J Nutr* 2018; 148: 752-9.

Lynes MD, Leiria LO, Lundh M, Bartelt A, Shamsi F, Huang TL, Takahashi H, Hirshman MF, Schlein C, Lee A, Baer LA, May FJ, Gao F, Narain NR, Chen EY, Kiebish MA, Cypess AM, Bluher M, Goodyear LJ, Hotamisligil GS, Stanford KI, Tseng YH. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nat Med* 2017; 23: 631-7.

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: 355-67.

Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21: 323-9.

Maloney SK, Fuller A, Mitchell D, Gordon C, Overton JM. Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology (Bethesda)* 2014; 29: 413-20.

Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). *Int J Morphol* 2017; 35: 1482-94.

Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Mateusiak L, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr Pharm Des* 2017; 23: 2532-50.

Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 2013; 4: 2192.

Martins FF, Bargut TCL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. *Ann Anat* 2017; 210: 44-51.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.

Mazza A, Fruci B, Garinis GA, Giuliano S, Malaguarnera R, Belfiore A. The Role of Metformin in the Management of NAFLD. *Exp Diabetes Res* 2012; 716404.

McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* 2016; 59: 426-35.

McCreight LJ, Stage TB, Connelly P, Lonergan M, Nielsen F, Prehn C, Adamski J, Brosen K, Pearson ER. Pharmacokinetics of metformin in patients with gastrointestinal intolerance. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 1593-1601.

Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 656-65.

Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV, Fernandez-Bermejo M, Lozano-Rodriguez T, Vargas-Castrillon J, Buque X, Ochoa B, Aspichueta P, Gonzalez-Gallego J, Garcia-Monzon C. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 2011; 60: 1394-1402.

Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med* 2015; 66: 17-29.

Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 374-7.

Moreno-Fernandez S, Garces-Rimon M, Uranga JA, Astier J, Landrier JF, Miguel M. Expression enhancement in brown adipose tissue of genes related to thermogenesis and mitochondrial dynamics after administration of pepsin egg white hydrolysate. *Food Funct* 2018; 9: 6599-6607.

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* 2017; 123: 699-709.

Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011; 43: 617-49.

Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-452.

Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996; 80: 1147-66.

Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *J Comp Physiol B* 2015; 185: 587-606.

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.

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: 1939-51.

Repiscak P, Erhardt S, Rena G, Paterson MJ. Biomolecular mode of action of metformin in relation to its copper binding properties. *Biochemistry* 2014; 53: 787-95.

Resuli B, Demiraj V, Babameto A, Sema K, Malaj V. Metformin superior to lowfat diet for the treatment of patients with nonalcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Pol Arch Med Wewn* 2012; 122 Suppl 1: 68-71.

Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34 Suppl 2: S59-66.

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: 1684-91.

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: 273-82.

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: 21873-86.

Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutr Metab* 2015; 66 Suppl 2: 7-12.

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest* 2014; 124: 2099-2112.

Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1282-93.

Song Z, Revelo X, Shao W, Tian L, Zeng K, Lei H, Sun HS, Woo M, Winer D, Jin T. Dietary Curcumin Intervention Targets Mouse White Adipose Tissue Inflammation and Brown Adipose Tissue UCP1 Expression. *Obesity (Silver Spring)* 2018; 26: 547-58.

Sorrentino G, Crispino P, Coppola D, De Stefano G. Efficacy of lifestyle changes in subjects with non-alcoholic liver steatosis and metabolic syndrome may be improved with an antioxidant nutraceutical: a controlled clinical study. *Drugs R D* 2015; 15: 21-5.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila 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: 239-50.

Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest* 2012; 92: 1020-32.

Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med* 2012; 63: 329-43.

Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016; 53: 52-67.

Stefanescu H, Lupsor-Platon M, Badea RI. The devil's triangle of steatosis, obesity, and liver stiffness. *Hepatology* 2016; 63: 1392-3.

Stephane X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 2011; 54: 3101-10.

Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-9.

Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J Biol Chem* 2014; 289: 335-45.

Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X, Xu Z, Gan L. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol* 2016. Doi: 10.1530/JOE-16-0142.

Tappy L, Le KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36: 554-60.

Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 2010; 26: 1044-9.

Thomas I, Gregg B. Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. *Pediatr Diabetes* 2017; 18: 10-6.

Tokubuchi I, Tajiri Y, Iwata S, Hara K, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Mifune H, Yamada K. Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLoS One* 2017; 12: e0171293.

Townsend KL, An D, Lynes MD, Huang TL, Zhang H, Goodyear LJ, Tseng YH. Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 243-57.

van Baak MA, Mariman ECM. Mechanisms of weight regain after weight loss - the role of adipose tissue. *Nat Rev Endocrinol* 2019. Doi: 10.1038/s41574-018-0148-4.

Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E1229-33.

Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013; 57: 2525-31.

Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Zhu M, Rodgers BD, Jiang Q, Dodson MV, Du M. Resveratrol enhances brown adipocyte formation and function by activating AMP-activated protein kinase (AMPK) alpha1 in mice fed high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2017; 61.

Wen J, Zeng M, Liu Z, Zhou H, Xu H, Huang M, Zhang W. The influence of telmisartan on metformin pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharmacol Sci* 2019; 139: 37-41.

Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M, Vidal-Puig A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149: 871-85.

Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13987-92.

Williams JA, Zhao K, Jin S, Ding WX. New methods for monitoring mitochondrial biogenesis and mitophagy in vitro and in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017; 242: 781-7.

Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, Guo X, Guo T, Botchlett R, Qi T, Pei Y, Zheng J, Xu Y, An X, Chen L, Chen L, Li Q, Xiao X, Huo Y, Wu C. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PLoS One* 2014; 9: e91111.

Wu K, Tian R, Huang J, Yang Y, Dai J, Jiang R, Zhang L. Metformin alleviated endotoxemia-induced acute lung injury via restoring AMPK-dependent suppression of mTOR. *Chem Biol Interact* 2018; 291: 1-6.

Wu TC, Chen LK, Tsai SH, Liaw YH, Hwang B. Hepatic steatosis: an experimental model for quantification. *Arch Gerontol Geriatr* 2011; 52: 164-6.

Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F, Ruo R. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol* 2016; 229: 133-44.

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

Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 2013; 123: 3404-8.

Zhang L, Ip CK, Lee IJ, Qi Y, Reed F, Karl T, Low JK, Enriquez RF, Lee NJ, Baldock PA, Herzog H. Diet-induced adaptive thermogenesis requires neuropeptide FF receptor-2 signalling. *Nat Commun* 2018; 9: 4722.

Zhang Y, Wang Y, Bao C, Xu Y, Shen H, Chen J, Yan J, Chen Y. Metformin interacts with AMPK through binding to γ subunit. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 368: 69-76.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167-74.

Zhuang X, Sun F, Li L, Jiang D, Li X, Sun A, Pan Z, Lou N, Zhang L, Lou F. Therapeutic Effect of Metformin on Chemerin in Non-Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Clin Lab* 2015; 61: 1409-14.

ANEXO A - Comitê de Ética



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



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/022/2015 sobre "Metformina e vitamina E no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica causada por frutose em modelo animal" sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarin de Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 26/05/2015. Este certificado expira em 26/05/2019.

Rio de Janeiro, 26 de Maio de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

ANEXO B – Primeiro artigo

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biochimie Open 4 (2017) 19–30

<http://www.journals.elsevier.com/biochimie-open>

Research paper

Liver and Metformin: Lessons of a fructose diet in mice

Iara Karise^a, Fernanda Ornellas^a, Sandra Barbosa-da-Silva^a, Cristiane Matsuura^b,
Mariano del Sol^c, Marcia Barbosa Aguila^{a,c}, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda^{a,c,*}^a Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil^b Laboratory of Membrane Transport, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil^c Doctoral Programing on Morphological Sciences, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

Received 26 September 2016; accepted 27 January 2017

Available online 3 February 2017

Abstract

Studies show that the continuous consumption of fructose can lead to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and steatohepatitis. We aimed to investigate the role of Metformin in an animal model of liver injury caused by fructose intake, focusing on the molecular markers of lipogenesis, beta-oxidation, and antioxidant defenses. Male three months old C57BL/6 mice were divided into control group (C) and fructose group (F, 47% fructose), maintained for ten weeks. After, the groups received Metformin or vehicle for a further eight weeks: control (C), control + Metformin (CM), fructose (F), and fructose + Metformin (FM). Fructose resulted in hepatic steatosis, insulin resistance and lower insulin sensitivity in association with higher mRNA levels of proteins linked with *de novo* lipogenesis and increased lipid peroxidation. Fructose diminished mRNA expression of antioxidant enzymes, and of proteins responsible for mitochondrial biogenesis. Metformin reduced *de novo* lipogenesis and increased the expression of proteins related to mitochondrial biogenesis, thereby increasing beta-oxidation and decreasing lipid peroxidation. Also, Metformin upregulated the expression and activity of antioxidant enzymes, providing a defense against increased reactive oxygen species generation. Therefore, a significant reduction in triglyceride accumulation in the liver, steatosis and lipid peroxidation was observed in the FM group. In conclusion, fructose increases *de novo* lipogenesis, reduces the antioxidant defenses, and diminishes mitochondrial biogenesis. After an extended period of fructose intake, Metformin treatment, even in continuing the fructose intake, can reverse, at least partially, the liver injury and prevents NAFLD progression to more severe states.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Steatosis; Lipogenesis; beta-oxidation; Oxidative stress; Stereology

1. Introduction

The fructose consumption has increased dramatically in recent years incorporated in industrial products and sugary

drinks [1]. Fructose is metabolized to triose phosphates by hepatocytes, enterocytes, and kidney tubular cells. In contrast to glucose, fructose metabolism is not tightly regulated by cellular energy status and fructose consumption leads to an overflow of triose phosphates into hepatocytes and a subsequent disposal of these compounds, leading to increased lactic acid production, gluconeogenesis and *de novo* lipogenesis [2]. Studies have demonstrated that the continuous consumption of fructose can lead to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in both humans [3] and rodents [4].

NAFLD is a highly prevalent condition, as population studies indicate that 10–50% of the worldwide population possess a reversible form of hepatic steatosis [5]. However, in a small percentage of individuals, it can progress to

* Corresponding author. Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil. Fax: +55 2868 8033.

E-mail addresses: iarakarise@hotmail.com (I. Karise), cruz.fop@gmail.com (F. Ornellas), sandrabarbosasilva@gmail.com (S. Barbosa-da-Silva), crismatsuura@gmail.com (C. Matsuura), mariano.delsol@ufrontera.cl (M. del Sol), marciaguila@gmail.com (M.B. Aguila), mandarim.ca@gmail.com, mandarim@uerj.br (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

URL: <http://www.lmmc.uerj.br>

ANEXO C – Segundo artigo

Biomedicine & Pharmacotherapy 111 (2019) 1156–1165



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Metformin enhances mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipocytes of mice



Iara Karise^a, Thereza Cristina Bargut^a, Mariano del Sol^b, Marcia Barbosa Aguila^a,
Carlos A. Mandarin-de-Lacerda^{a,*},¹

^a Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Doctoral Program in Morphological Sciences, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:
Brown adipose tissue
Thermogenesis
Metformin
Fructose
Mouse

ABSTRACT

Aims: We studied the effect of metformin on the brown adipose tissue (BAT) in a fructose-rich-fed model, focusing on BAT proliferation, differentiation, and thermogenic markers.

Main methods: C57Bl/6 mice received isoenergetic diets for ten weeks: control (C) or high-fructose (F). For additional eight weeks, animals received metformin hydrochloride (M, 250 mg/kg/day) or saline. After sacrifice, BAT and white fat pads were prepared for light microscopy and molecular analyses.

Key findings: Body mass gain, white fat pads, and adiposity index were not different among the groups. There was a reduction in energy intake in the F group and energy expenditure in the F and FM groups. Metformin led to a more massive BAT in both groups CM and FM, associated with a higher adipocyte proliferation (β 1-adrenergic receptor, proliferating cell nuclear antigen, and vascular endothelial growth factor), and differentiation (PR domain containing 16, bone morphogenetic protein 7), in part by activating 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase. Metformin also enhanced thermogenic markers in the BAT (uncoupling protein type 1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) through adrenergic stimuli and fibroblast growth factor 21. Metformin might improve mitochondrial biogenesis in the BAT (nuclear respiratory factor 1, mitochondrial transcription factor A), lipolysis (perilipin, adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase), and fatty acid uptake (lipoprotein lipase, cluster of differentiation 36, adipocyte protein 2).

Significance: Metformin effects are not linked to body mass changes, but affect BAT thermogenesis, mitochondrial biogenesis, and fatty acid uptake. Therefore, BAT may be a metformin adjuvant target for the treatment of metabolic disorders.

1. Introduction

The brown adipose tissue (BAT) dissipates energy in heat form, promoting thermogenesis through the presence of uncoupling protein (UCP) 1 [1]. Studies demonstrated that BAT could be activated in adult

humans [2–4], as seen in cases of loss of body mass (BM) [5]. Also, cold-exposure might enhance BAT activity [6,7]. Brown adipocytes can proliferate and start brown adipogenesis when BAT is recruited, in a process under adrenergic control involving two key mediators: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC) 1-

Abbreviations: AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; AP2, adipocyte protein 2; BAT, brown adipose tissue; BM, body mass; β 1AR, beta-1 adrenergic receptor; β 3AR, beta-3 adrenergic receptor; BMP, bone morphogenetic protein; CD36, cluster of differentiation 36; cDNA, complementary DNA; CPT, carnitine palmitoyltransferase; FGF21, fibroblast growth factor 21; HSL, hormone sensitive lipase; LPL, lipoprotein lipase; mRNA, messenger RNA; NRF1, nuclear respiratory factor 1; pAMPK, human phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGC1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1; pHSL^{ser660}, phosphorylated hormone sensitive lipase on serine 660; PLIN1, perilipin; ATGL, adipose triglyceride lipase; PRDM, PR domain containing; SIRT, sirtuin; TFAM, mitochondrial transcription factor A; UCP, uncoupling protein; VEGF, vascular endothelial growth factor; WAT, white adipose tissue

* Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil.

E-mail addresses: iarakarise@hotmail.com (I. Karise), therezabargut@gmail.com (T.C. Bargut), mariano.delsol@ufrontera.cl (M. del Sol), mbaguila@uerj.br (M.B. Aguila), mandarin@uerj.br, mandarin.ca@gmail.com (C.A. Mandarin-de-Lacerda).

¹ Website: <http://www.lmmc.uerj.br>

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2019.01.021>

Received 12 October 2018; Received in revised form 4 January 2019; Accepted 6 January 2019

0753-3322/ © 2019 Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).