**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO**

**MARCOS ANTONIO ELEUTÉRIO DA SILVA**

# POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTIOBESIDADE DO 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE: REPERCUSSÕES NO PERFIL LIPÍDICO SISTÊMICO-HEPÁTICO EM UM MODELO MURINO DIETÉTICO PARA A SÍNDROME METABÓLICA

**Maceió**
**2016**

**MARCOS ANTONIO ELEUTÉRIO DA SILVA**

# POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTIOBESIDADE DO 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE: REPERCUSSÕES NO PERFIL LIPÍDICO SISTÊMICO-HEPÁTICO EM UM MODELO MURINO DIETÉTICO PARA A SÍNDROME METABÓLICA

Trabalho de Tese apresentado à Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal UFAL, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profª. Drª. Luíza Antas Rabelo
Coorientadora: Profª. Drª. Valéria Nunes de Souza

**Maceió**
**2016**

**Catalogação na fonte**
**Universidade Federal de Alagoas**
**Biblioteca Central**
**Divisão de Tratamento Técnico**
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586p Silva, Marcos Antonio Eleutério da.
Potencial terapêutico antiobesidade do 3-amino-1,2,4-triazole : repercurssões no perfil lipídico sistêmico-hepático em um modelo murino dietético para síndrome metaólica / Marcos Antonio Eleutério da Silva. – 2016
103 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Luíza Antas Rabelo.
Coorientadora: Valéria Nunes de Souza.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 80-91.
Anexo: f. 92.

1. Síndrome metabólica. 2. Esteatose hepática. 3. Obesidade. 4. Redox. 5. Ação antioxidante. I. Título.

CDU: 547:616.39-008.9

MARCOS ANTONIO ELEUTÉRIO DA SILVA

**Potencial terapêutico antiobesidade do 3-amino-1,2,4-triazole: repercussões no perfil lipídico sistêmico-hepático em um modelo murino dietético para a síndrome metabólica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 26/10/2016.

Profa Dra Luíza Antas Rabelo, Universidade Federal de Alagoas

(Orientadora)

Profa Dra Valéria Nunes de Souza, Universidade Federal de Pernambuco

(Coorientadora)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luiza Antas Rabelo (Orientadora/Presidente)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Profa. Dra. Aline Priscila Pansani
Universidade Federal de Goiás - UFG

Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Profa. Dra. Luciana Aparecida Corá
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Profa. Dra. Luciana Aparecida Corá
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL

Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Acredita-se que o tempo cura tudo, mas deixa uma cicatriz enorme. A saudade que sinto de você, Tia, é enorme! De como ficaria feliz com os meus sonhos; de estar sempre me incentivando e apoiando. Dedico a você, mais esta conquista (*in memoriam).*

# AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Profª. Drª. Luíza Antas Rabelo, por tão brilhantes ensinamentos, incentivos, por ser tão presente na tão difícil tarefa de orientar, por ser meu alicerce científico e por acreditar em Ciência. Sinto-me realmente grato por poder dizer que sou primogênito e que fiz parte da história do LRC. Afinal, já são nove anos! E tantas coisas ainda há por vir. Obrigado pelo suporte científico e por ir além destes, por ouvir, aconselhar, dar inúmeras oportunidades para o crescimento científico e não medir esforços para a concretude desta tese.

Que presente ganhei com a chegada da Profª. Drª. Valéria Nunes de Souza! Obrigado por todo o suporte científico, correções incansáveis, ajustes e tantos experimentos e técnicas executadas e ensinadas. Meu doutorado ficou muito mais rico com a sua chegada. Fiquei muito honrado com essa coorientação, porque compartilhamos da história do LRC desde o início. Nem preciso falar que é muita amizade envolvida também. Você é brilhante Val!

Ao Bruno, pois não faria nada disso sem ele! Por toda a nossa batalha conjunta em busca de todos os objetivos que queremos e ainda há muitos a alcançar. E nisso, já se vão graduação, mestrado, doutorado ... e que venham vários outros.

Aos meus pais e tias tão amados que são tão generosos em todos os seus atos e me fazem ter serenidade para continuar alcançando todos os meus objetivos.

Nessa trajetória, a família LRC só cresceu. Obrigado aos alunos de iniciação científica, estagiários científicos, mestrandos e doutorandos que fazem a unidade e o laboratório ter uma identidade. Meus agradecimentos especiais a Tamires por todos os cuidados com os animais experimentais e "sets" experimentais, foi uma grande parceria. Desde sua chegada ao laboratório, já mostrou toda a sua simpatia, achando que eu também era aluno de iniciação científica! Hoje com os cabelos brancos que ganhei, já não dar mais para pensar isso! Elisa e Valdemir, vocês foram grandes parceiros nos cuidados aos animais junto a Tamires. Vocês foram primordiais! Meus agradecimentos a Glaucevane e ao Nelson pela parceria em muitos experimentos. Obrigado a todos que me incentivaram com palavras de carinho ao longo de todo o doutorado: Marina, Daniela, Luciana, Fernanda, Lucilo, Eduardo, Jayme, como também, pelos finais de semana compartilhados, nos muitos sacrifícios dos animais e experimentos. Meus agradecimentos a Maria, Layse e Vanessa pela nova fase de suporte aos animais experimentais que já fazem parte de projetos vindouros.

Aos animais experimentais que inocentemente proporcionaram o arcabouço biológico para as investigações realizadas na presente tese.

Agradeço aos Professores Dr. Michael Bader e a Dra. Natalia Alenina (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, MDC-Berlin) pela doação de vários reagentes e pelo suporte técnico.

À professora Dra. Fabiana Moura, pelas prestimosas contribuições nas análises histológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), por oportunizar o presente doutorado e por todo o suporte e colaboração na construção do conhecimento científico.

Aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT NanoBiofar) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), pelo fomento financeiro.

À banca de qualificação, composta pelas Professoras: Suzana Lima de Oliveira, Angelina Bossi Fraga e Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pelas contribuições, melhoramentos e leitura minuciosa do material escrito.

À Banca de defesa, por aceitar participar desta importante etapa e contribuições dadas.

## RESUMO

A síndrome metabólica (SMet) é caracterizada pela associação de fatores potencialmente prejudiciais que se reforçam mutualmente, como obesidade central, hipertensão, diabetes mellitus 2 e dislipidemias. Este cenário é acompanhado pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, agravado pela obesidade, que podem implicar desequilíbrio entre as reações de oxidação/redução (redox), culminando no estresse oxidativo e alterações metabólicas. Dentre os antioxidantes, destaca-se a catalase, responsável pela dismutação do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) em água e oxigênio. Este composto é um substrato em vias como as relacionadas à lipólise, controle energético e inflamação. Assim, postula-se que a modulação do eixo $H_2O_2$/catalase/equilíbrio redox na SMet/obesidade, represente um importante efeito terapêutico antiobesidade com importantes modificações sistêmico-hepáticas relacionadas à lipólise. Diante disso, objetivou-se avaliar as ações antiobesidade e lipolíticas sistêmico-hepáticas, induzidas pelo 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ), um reputado inibidor da catalase, sobre o eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio redox, na SMet. Para tanto, utilizou-se este em diferentes doses (125, 250 e 500 $mg.kg^{-1}$) na dieta de animais C57BL6 com SMet por 12 semanas. Os camundongos tratados apresentaram aumento da lipólise ($p<0,001$) e diminuição ($p<0,001$): no diâmetro dos adipócitos; no peso corporal; na distribuição de tecido adiposo; no índice de adiposidade; na expressão plasmática de leptina; nos níveis plasmáticos e hepáticos do colesterol total, triglicerídeos e ácidos graxos livres não esterificados; na glicemia durante os teste de tolerância à glicose, resistência à insulina e do piruvato; no índice de avaliação indireta da resistência à insulina e nos níveis plasmáticos de insulina ($p<0,01$). Diminuição ($p<0,05$) da expressão gênica no fígado para: receptor para a insulina; Glicose-6-fosfatase (G6Pase) e Glicoquinase (GCK). Aumento da expressão gênica para: fosfoenolpiruvato carboxiquinase 2 (PcK2) ($p<0,01$); proteína translocase de ácido graxo (CD36/FAT) ($p<0,001$) e proteína ligadora de ácidos graxos (aP2) ($p<0,001$). Além da diminuição da atividade da catalase e níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($p<0,05$). O ATZ mostra ser um potente indutor lipolítico capaz de promover um importante efeito antiobesidade, ao diminuir o peso corporal, regular o balanço lipídico entre o plasma e o fígado, melhorar o perfil glicêmico e a sensibilidade à insulina, além de modular o desequilíbrio redox em animais com SMet induzida por dieta hiperlipídica.



**Palavras-chave**: Síndrome metabólica. Esteatose. 3-amino-1,2,4-triazole. Peróxido de Hidrogênio. Catalase. *Status* Redox. Antiobesidade.

## ABSTRACT

The metabolic syndrome (MetS) is characterized by an association of factors that reinforce each other mutually; such as central obesity, hypertension, type 2 diabetes and dyslipidemias. This scenario is associated to reactive species of oxygen and nitrogen production, aggravated by obesity status, triggering imbalance between oxidation and reduction reactions (redox), resulting in oxidative stress and metabolic disorders. Among the antioxidants, it is highlighted the catalase role, responsible to hydrogen peroxide ($H_2O_2$) dismutation into oxygen and water. This compound is a substrate in lipolysis, energy control and inflammation. Thus, it is believed that the modulation of the $H_2O_2$/catalase/redox balance-axis in MetS/Obesity, might produce an important therapeutic effect antiobesity and metabolic-liver changes. The aim was to evaluate effect antiobesity and the metabolic-liver changes induced by 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ), a reputed catalase inhibitor on the H2O2/catalase/redox balance-axis. For this, it was used at different doses (125, 250 and 500 $mg.kg^{-1}$) in C57BL6 MetS mice-diet induced for 12 weeks. The ATZ-treated mice showed increased lipolysis ($p<0.001$) and decreased ($p<0.001$) levels of: diameter of adipocytes, body weight; distribution of epididymal fat, adiposity index; expression of plasma leptin ; plasma and liver total cholesterol ($p<0.01$; $ATZ_{500,}$ $p<0.001$), triglycerides (,$p<0.001$) and non-esterified free fatty acids ($p<0.001$); basal glycemia, during the glucose tolerance test ($p<0.001$), insulin resistance test ($p<0.001$) and pyruvate test ($p<0.001$); the index to indirect evaluation of insulin resistance and plasma insulin ($p<0.01$). Decreased ($p<0,05$) of liver-gene expression to: insulin receptor ($p<0.05$); Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and glucokinase (GCK) and increased gene expression to: phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PcK2) ($p<0.01$); the fatty acid translocase protein (CD36 / FAT) ($p<0.001$) and lipid binding protein / adipocyte fatty acids (aP2) ($p<0.001$). Besides, it ocurred decreased in catalase activity and the levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) ($p<0.05$). The ATZ showed to be a potent lipolytic inducer, able to promote an important antiobesity effect, capable to: reduce body weight, regulate the lipid balance between plasma and liver, improve glycaemic control and insulin sensitivity, as well as to modulate the redox imbalance in animal MetS induced by high fat diet.



**Keywords**: Metabolic syndrome. Steatosis. 3-amino-1,2,4-triazole. Hydrogen peroxide. Catalase. Redox Status. Antiobesity.

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 – Principais fatores de risco para o diagnóstico da SMet..... 21

Figura 2 – Produção de adipocinas, estresse oxidativo e produção de enzimas antioxidantes..... 27

Figura 3 – Atividade enzimática da CAT, SOD e GPX..... 31

Figura 4 – Estrutura química do ATZ..... 34

Figura 5 – Delineamento experimental..... 38

Figura 6 – Síndrome metabólica em camundongos..... 39

Figura 7 – Efeitos induzidos pelo ATZ no peso corporal ao longo do tratamento e no peso corporal final de animais com SMet..... 49

Figura 8 – Efeitos induzidos pelo ATZ no peso relativo tecidual de animais com SMet..... 51

Figura 9 – Índice de adiposidade visceral e peso relativo do tecido adiposo marrom..... 52

Figura 10 – Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão proteica plasmática de leptina em animais com SMet..... 53

Figura 11 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil lipídico plasmático de animais com SMet..... 54

Figura 12 – Efeito induzido pelo ATZ sobre a lipólise in vivo e in vitro, em animais com SMet..... 55

Figura 13 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o diâmetro dos adipócitos e aspectos histológicos do tecido adiposo, em animais com SMet..... 56

Figura 14 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o equilíbrio REDOX no tecido adiposo epididimal de animais com SMet..... 57

Figura 15 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil glicêmico em animais com SMet..... 59

Figura 16 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil insulinêmico de animais com SMet..... 61

Figura 17 – Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil lipídico hepático de animais com SMet..... 62

Figura 18 – Efeito induzido pelo ATZ sobre a gliconeogênese em animais com SMet..... 63

Figura 19 – Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão gênica em vias metabólicas glicêmicas no tecido hepático de animais com SMet..... 65

Figura 20 – Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão gênica em vias metabólicas lipídicas no tecido hepático de animais com Smet..... 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de “primers” utilizados para o PCR quantitativo em tempo real (amplicons entre 100 - 150 pb)..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **AgRP** | Peptídeo Agouti |
| **aP2** | Adipocyte Protein 2 ou gene da proteína ligadora de lipídeos do adipócito (ALBP) ou ainda FABP4 (fatty acid binding protein-4) |
| **ATP** | Trifosfato de Adenosina |
| **ATZ** | 3-amino-1,2,4-triazole |
| **CART** | Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina |
| **CAT** | Catalase |
| **CD36/FAT** | Cluster of differentiation 36/ fatty acid translocase (conjunto de diferenciação 36 / translocase de ácidos graxos) |
| **CEUA** | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| **CT** | Grupo Controle |
| **DAC** | Doença Arterial Coronariana |
| **DCV** | Doença Cardiovascular |
| **DHGNA** | Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica |
| **Dieta HF** | Dieta "high fat" ou hperlipídico/hipercalórico |
| **DM 2** | Diabetes Mellitus Tipo 2 |
| **EDTA** | Ácido Etilenodiamino Tetraacético |
| **EGTA** | Ácido Etilenoglicol Tetraacético |
| **ELISA** | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| **ERO** | Espécies Reativas de Oxigênio |
| **ERONS** | Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio |
| **G6PD** | Glicose-6-Fosfato Desidrogenase |
| **GCK** | Enzima Glicoquinase |
| **GJ** | Glicemia de Jejum |
| **GLUT4** | Transportador para Glicose do tipo 4 |
| **GP6ase** | Glicose-6-Fosfatase |
| **GPx** | Glutationa Peroxidase |
| **GTP** | Trifosfato de Guanosina |
| **$H_2O_2$** | Peróxido de Hidrogênio |
| **HDL** | High Density Lipoprotein (Lipopropteína de alta densidade) |
| **HF** | Grupo "high fat" ou hperlipídico/hipercalórico |

| | |
|---|---|
| **HAS** | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| **HSL** | Hormônio Lipase Sensível |
| **IDF** | International Diabetes Federation |
| **IDL** | Intermediary Density Lipoprotein (Lipoproteína de densidade intermediária) |
| **IL-6** | Interleucina 6 |
| **LDL** | Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade) |
| **LPL** | Lipase Lipoproteica |
| **LPO** | Peroxidação lipídica |
| **LRC** | Laboratório de Reatividade Cardiovascular |
| **MDA** | Malondialdeído |
| **NADPH** | Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) |
| **NCEP-ATP III** | National Colesterol Education Program for Adult Treatment Panel III |
| **NEFA** | Ácidos Graxos Livres ou Não Esterificados |
| **$^{\bullet}$NO** | Óxido Nítrico |
| **$O_2^{\bullet-}$** | Ânion Superóxido |
| **NOS** | Óxido Nítrico Sintase |
| **NPY** | Neuropeptídeo Y |
| **OMS** | Organização Mundial de Saúde |
| **ONOO$^{\bullet}$** | Peroxinitrito |
| **PcK 1,2** | fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 e 2 |
| **PCR** | Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| **PEPCKc** | Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase citosólica |
| **PEPCKm** | Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase mitocondrial |
| **POMC** | Pró-Ópio-Melanocortina |
| **REDOX** | Reação de Redução-Oxidação |
| **SMet** | Síndrome Metabólica |
| **SOD** | Enzima Superóxido Dismutase |
| **SR-B1** | scavenger receptor class B type I (receptor scavenger da classe B, tipo I) |
| **sVCAM** | Molécula 1 de Adesão Celular Vascular |

| | |
|---|---|
| **TAB** | Tecido Adiposo Branco |
| **TAM** | Tecido Adiposo Marrom |
| **NOS** | Óxido Nítrico Sintase |
| **TBARS** | Substâncias Ácidas Reativas ao Tiobarbitúrico |
| **TG** | Triglicerídeos |
| **TNF α** | Tumor Necrosis Factor-α (Fator de Necrose Tumoral alfa) |
| **TRI** | Teste de Resistência à Insulina |
| **TTG** | Teste de Tolerância à Glicose |
| **TTP** | Teste de Tolerância ao Piruvato |
| **UCP** | Proteínas Desacopladoras Mitocondriais |
| **UFAL** | Universidade Federal de Alagoas |
| **VLDL** | Lipoproteína de muito baixa densidade |
| **WHO** | World Health Organization |
| **XO** | Xantina Oxidase |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| **1** | **INTRODUÇÃO** | 16 |
| **1.1** | **Problematização** | 16 |
| **1.2** | **Problema** | 18 |
| **1.3** | **Hipótese** | 18 |
| **1.4** | **Objetivos** | 19 |
| 1.4.1 | Objetivo geral | 19 |
| 1.4.2 | Objetivos específicos | 19 |
| **2** | **REVISÃO DA LITERATURA** | 20 |
| **2.1** | **Obesidade na síndrome metabólica e equilíbrio redox: uma relação complexa** | 20 |
| **2.2** | **O eixo em foco: Peróxido de hidrogênio/catalase/equilíbrio REDOX** | 30 |
| **2.3** | **3-amino 1,2,4 triazole (ATZ): um antigo inibidor da catalase, mas com um recente e inovador propósito terapêutico** | 34 |
| **3** | **MATERIAL E MÉTODOS** | 38 |
| **3.1** | **Animais e delineamento experimental** | 38 |
| **3.2** | **Dieta hipercalórica** | 39 |
| **3.3** | **Tratamento com o ATZ** | 40 |
| **3.4** | **Avaliações *in vivo*** | 40 |
| 3.4.1 | Ingestão alimentar | 40 |
| 3.4.2 | Peso corporal | 40 |
| 3.4.3 | Glicemia de jejum | 40 |
| 3.4.4 | Avaliação da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e da gliconeogênese | 41 |
| 3.4.5 | Avaliação da lipólise *in vivo* | 42 |
| **3.5** | **Avaliações *in vitro*** | 42 |
| **3.6** | **Avaliações *ex vivo*** | 42 |
| 3.6.1 | Eutanásia, avaliação do peso tecidual e Índice de adiposidade visceral | 42 |
| 3.6.2 | Análise do perfil lipídico plasmático/hepático e níveis de leptina no plasma | 43 |
| 3.6.3 | Avaliação do estado redox no tecido adiposo epididimal | 43 |
| 3.6.3.1 | Extração de proteínas do tecido adiposo epididimal para avaliação da atividade da CAT, SOD e peroxidação lipídica | 43 |
| 3.6.3.1.1 | Atividade da CAT | 44 |
| 3.6.3.1.2 | Peroxidação lipídica | 44 |
| 3.6.3.1.3 | Atividade da SOD | 45 |

3.6.3.2 Concentrações de Peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) no plasma..... 45
3.6.4 Avaliação histológica no tecido adiposo epididimal..... 45
3.6.5 Extração lipídica hepática..... 46
3.6.6 Avaliação da expressão gênica de proteínas glicolíticas e gliconeogênicas no tecido hepático..... 46
**3.7 Análise estatística**..... 48
**4 RESULTADOS**..... 49
**4.1 Peso corporal ao longo do tratamento e peso corporal final**..... 49
**4.2 Peso relativo tecidual**..... 51
**4.3 Índice de adiposidade visceral e peso relativo do tecido adiposo marrom**..... 52
**4.4 Níveis de leptina no plasma**..... 52
**4.5 Perfil lipídico plasmático**..... 53
**4.6 Lipólise *in vivo* e *in vitro***..... 54
**4.7 Avaliação histológica**..... 55
**4.8 Equilíbrio redox no tecido adiposo epididimal**..... 56
**4.9 Perfil glicêmico**..... 58
**4.10 Perfil insulinêmico**..... 59
**4.11 Perfil lipídico hepático**..... 61
**4.12 Gliconeogênese induzida pelo aumento do piruvato**..... 63
**4.13 Expressão gênica em vias metabólicas glicêmicas no tecido hepático**.. 64
**4.14 Expressão gênica em vias metabólicas lipídicas no tecido hepático**..... 65
**5 DISCUSSÃO**..... 67
**6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**..... 78
**7 PERSPECTIVAS FUTURAS**..... 79
**REFERÊNCIAS**..... 80
**ANEXOS**..... 92
**ANEXO A**..... 92
**ANEXO B**..... 93

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Problematização

Atualmente, a obesidade se configura como um dos mais relevantes problemas de saúde pública (ANDERSON et al., 2009). O envelhecimento populacional, o aumento da expectativa de vida e os hábitos alimentares modernos determinam o aparecimento, cada vez mais frequente, de doenças silenciosas que afetam o sistema cardiovascular (VAN DER BERG et al., 2016). De caráter crônico e sem sintomas evidentes para o paciente, doenças como diabetes mellitus 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HSA), dislipidemias, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e obesidade, não são precocemente diagnosticadas, o que implica diferentes níveis de comprometimento ao sistema cardiovascular, além da indução de alterações metabólicas permanentes (NUNES-SOUZA et al., 2016).

Não obstante, torna-se cada vez mais prevalente o número de pessoas que apresentam diversas dessas comorbidades associadas, resultando no surgimento da síndrome metabólica (SMet), caracterizada por estarem presentes mutuamente três ou mais fatores de risco cardiovascular, a saber: obesidade central, HAS, DM2, Hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis de HDL e, mais recentemente, a DHGNA (ALBERTI et al., 2009), sendo mais frequente, a associação entre obesidade central, HAS e DM2 (KASTORINI; PANAGIOTAKOS; GEORGOUSOPOULOU; et al., 2016). Além disso, observa-se que a morbimortalidade decorrente dessas doenças é tempo-dependente, ou seja, está diretamente relacionada ao estadiamento clínico, assim como, à quantidade de fatores de risco presente em um mesmo indivíduo (LIAW et al., 2016).

Neste cenário, à medida que as doenças supracitadas assumem um caráter crônico, o que acontece em pacientes diagnosticados tardiamente, as compensações fisiopatológicas também vão se consolidando, determinadas principalmente, pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), promovendo graves desequilíbrios entre as reações celulares de redução e oxidação (REDOX), com consequente estresse oxidativo sistêmico, cardiovascular e hepático, conforme identificado na SMet, advindos principalmente, da obesidade (ELEUTERIO-SILVA et al., 2013; RANI et al., 2016; YUBERO-SERRANO et al., 2013). Nesta condição, ocorrem frequentes modificações locais e sistêmicas decorrentes das alterações funcionais das vias antioxidantes enzimáticas,

perturbando o equilíbrio REDOX e determinando um “status” pró-oxidante que afeta os vasos sanguíneos e o principal órgão metabólico, o fígado (HUSAIN et al., 2015).

Fisiologicamente, diversas enzimas atuam na manutenção desse equilíbrio, como catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (FERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2011). Dentre estas, destaca-se a CAT, presente amplamente no fígado, rim e plasma de diversos organismos e que, por sua vez, utiliza o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) como substrato, minimizando a formação de espécies reativas e consequente estresse oxidativo (KODYDKOVA et al., 2014).

Interessantemente, as ações da CAT podem estar prejudicadas quando há obesidade, pois já foi sugerido que há desregulação da produção de $H_2O_2$ nestes casos (VENTURINE et al., 2012).

Salienta-se que este peróxido faz parte de diversas vias de sinalização metabólica, inflamatória e imunológica que podem regular, dentre outras funções, a atividade dos adipócitos (LODHI; SEMENKOVICH, 2014), o “status” REDOX vascular (CAI et al., 2002; HARRISON, G. J.; JORDAN; WILLIS, 1994; IIDA; KATUSIC, 2000); HARRISON, G. J.; JORDAN; WILLIS, 1994) e hepático (DUNNING et al., 2013; GREENWEL et al., 2000; YUBERO-SERRANO et al., 2013).

Dessa forma, no contexto fisiopatológico em que a atividade da CAT se encontra aumentada, a biodisponibilidade do $H_2O_2$ para outras reações celulares, exclusas a esta enzima, poderá estar prejudicada, incluindo-se neste contexto, as vias de regulação gliconeogênica/glicolítica e lipogênica/lipolítica. Nesse sentido, o estudo das alterações sistêmico-hepáticas na SMet/obesidade, com foco no eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio REDOX, mostra-se importante, e a utilização de substâncias que modulem esse eixo, como o 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ), um composto químico classicamente conhecido por sua ação de inibir a CAT (FEINSTEIN; BERLINER; GREEN, 1958; MARGOLIASH; NOVOGRODSKY, 1958), pode trazer novas descobertas clínicas relacionadas ao controle metabólico e à obesidade.

## 1.2 Problema

A SMet, principalmente quando a obesidade se faz presente, é acompanhada por um conjunto de alterações metabólicas, sistêmicas e funcionais que podem culminar no desequilíbrio REDOX, antes mesmo do aparecimento de sintomas clínicos (DA FONSECA et al., 2014; YUBERO-SERRANO et al., 2013). Além disso, o aumento da atividade antioxidante de enzimas como a CAT, pode resultar na diminuição da biodisponibilidade de $H_2O_2$, interferindo na formação de outras cascatas metabólicas como àquelas relacionadas à lipólise, lipogênese, glicólise e gliconeogênese. Contudo, ainda não se conhece na SMet, especialmente na obesidade, as alterações sistêmico-hepáticas diretamente ligadas à modulação do eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio REDOX.

Diante disso, o uso do ATZ, um inibidor da CAT, pode alterar a biodisponibilidade do $H_2O_2$ e este participar de vias regulatórias lipolíticas, atuando como um agente antiobesidade na SMet, passando a determinar importantes modificações sistêmico-hepáticas?

## 1.3 Hipótese

Um número crescente de evidências sugere a participação das reações de oxirredução, "status" redox, como mecanismos sinalizadores de diversos processos metabólicos e sistêmicos (CRUZ et al., 2015; DA FONSECA et al., 2014; FERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2011), entre estas, as que envolve a SMet, especificamente a obesidade, e vias de sinalização com o eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio REDOX no controle do balanço energético metabólico. E nesse sentido, a obesidade é vista como o ponto central para o desencadeamento da SMet, pois a partir desta, podem advir a hipertensão, o diabetes e as dislipidemias. Contudo, salienta- se que nenhum estudo, até o momento, teve como foco avaliar as alterações sistêmico-hepáticas na SMet/obesidade, nem tampouco foi testada a utilização do agente químico ATZ como modulador do eixo supracitado nessas comorbidades.

Neste contexto, acredita-se que o ATZ diminua o peso corporal de animais obesos, promovendo efeitos antiobesidade, induzindo modificações sistêmico-hepáticas por modular o eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio redox na síndrome metabólica.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo geral

Avaliar as ações antiobesidade induzidas pelo ATZ sobre o eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio redox, na síndrome metabólica.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do ATZ no peso corporal e na distribuição de tecido adiposo de camundongos com SMet;
- Mensurar a expressão proteica plasmática de leptina nesses animais;
- Analisar o efeito lipolítico do ATZ na lipólise *in vivo* e *in vitro* e o diâmetro dos adipócitos dos animais com SMet;
- Avaliar as ações do ATZ sobre o perfil glicêmico, insulinêmico e sensibilidade à insulina de animais com SMet;
- Caracterizar o perfil lipídico plasmático e hepático de animais com SMet sob tratamento com o ATZ;
- Determinar a influência do ATZ no *status* redox do tecido adiposo epididimal através da mensuração da atividade da superóxido dismutase, catalase e dos níveis de peroxidação lipídica, bem como dos níveis de $H_2O_2$;
- Avaliar os efeitos do ATZ sobre a gliconeogênese e a expressão de genes relacionados com o metabolismo glicêmico e lipídico no tecido hepático de animais com SMet.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 Obesidade na síndrome metabólica e equilíbrio redox: uma relação complexa

A obesidade está sendo amplamente estudada como uma das comorbidades mais importantes do século XXI, tratada com *status* de epidemia mundial pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ALBERTI et al., 2009; ANDERSON et al., 2009). Dados estatísticos apontam uma prevalência de 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso no ano de 2014 e destes, 600 milhões já eram diagnosticados com obesidade. Atualmente, cerca de 39% da população mundial adulta está em sobrepeso e 13% são diagnosticados com obesidade, sendo esta responsável por 2,8 milhões de mortes por ano. Nos últimos anos, preocupa-se o número de crianças menores de cinco anos com sobrepeso, principalmente em países em desenvolvimento, onde a prevalência já supera em 30% os países desenvolvidos (WHO, 2015).

No Brasil, o perfil epidemiológico se mostra também bastante preocupante com prevalência de 17,3% de homens e 22,7% de mulheres com obesidade. Não obstante, o DM2 aparece associado a esta, acometendo principalmente aqueles de baixa renda, 8,5% de homens e 7,2% de mulheres, estimando-se uma prevalência de 40 milhões de acometidos em 2025 (WHO, 2015).

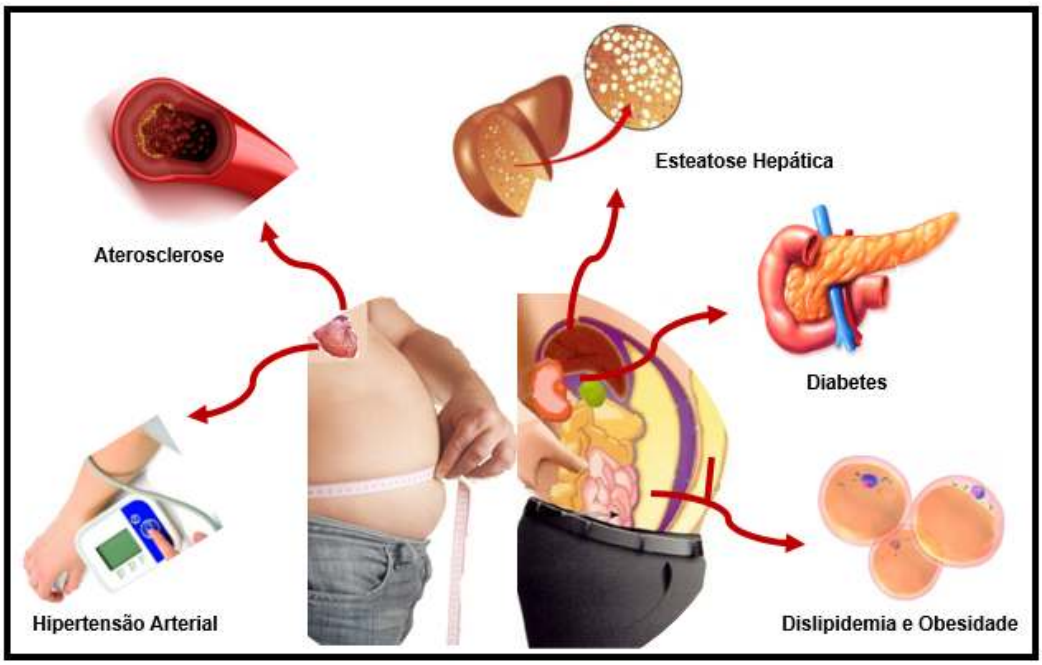
Nesse cenário, a SMet surge como uma doença crônica grave de caráter insidioso e que reúne diversos fatores de risco cardiovasculares, dentre os quais, HAS, DM2, dislipidemias, DHGNA e obesidade central (NUNES-SOUZA et al., 2016). Na tríade dos fatores mais comumente associados à SMet, a hipertensão segue o mesmo panorama epidemiológico crescente, mostrando valores de 26,4% e 20,4% para homens e mulheres, respectivamente (WHO, 2015).

Gerald Reaven, em 1988, foi um dos primeiros pesquisadores a citar um conjunto de doenças metabólicas presentes num mesmo paciente, denominando-a de síndrome X (REAVEN, 1988;1993). Posteriormente, entidades como a OMS (1998), o NCEP-ATPIII ("National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults", 2003) e a IDF ("International Diabetes Federation", 2006), descreveram os critérios para o diagnóstico e tratamento da SMet (IDF, 2005; NCEP-ATPIII, 2003; OMS, 1999)(ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005; GRUNDY et al., 2004a;2004b; MARCHESINI et al., 2004; WHO, 1999).

Os critérios mais utilizados para o diagnóstico são os advindos da IDF (Figura 1). Para tanto, faz-se necessário encontrar circunferência abdominal aumentada (obesidade central ≥ 90 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres), associada a dois ou mais dos seguintes critérios: glicemia de jejum aumentada (>100 mg/dL ou diagnóstico pregresso de DM2), aumento dos triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; diminuição do HDLc (<40 mg/dL para homens e <50 mg/dL para mulheres) e pressão arterial ≥ 130/85 mg/dL (IDF, 2005).

Alberti e colaboradores, em 2009, descreveram uma versão harmonizada das principais entidades que definem o diagnóstico e tratamento da SMet, dentre elas a IDF. E a partir de então, tornou-se amplamente empregada, firmando-se o diagnóstico quando três ou mais dos fatores supracitados, de forma independente, fazem-se presentes. Não sendo obrigatória, portanto, a presença de alterações na circunferência abdominal, embora, recomenda-se que esta medida seja um dos critérios iniciais a serem avaliados (ALBERTI et al., 2009).

**Figura 1 – Principais fatores de risco para o diagnóstico da SMet**




Observa-se os principais fatores de risco associados ao diagnóstico da síndrome metabólica (hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade e diabetes) e duas complicações severas (esteatose hepática e aterosclerose).
Fonte: Autor, 2016 - Baseado em informações da Federação Internacional do Diabetes (IDF), 2005).

Atualmente, a SMet é estudada como o resultado complexo de predisposições genéticas (JAGANNADHAM et al., 2016) e ambientais para a obesidade, tendo-se como centro desencadeador os hábitos alimentares modernos e o sedentarismo (KASTORINI; PANAGIOTAKOS; GEORGOUSOPOULOU; et al., 2016). Nesse contexto, a relação direta entre a obesidade e dislipidemias como o aumento dos triglicerídeos e LDLs (lipoproteínas de

baixa densidade) e/ou diminuição das HDLs (lipoproteínas de alta densidade), predispõe a um grave perfil aterogênico (CARR; BRUNZELL, 2004), comprometendo fluxos circulatórios locais (KHALIQ et al., 2015), regionais e sistêmicos (WU et al., 2015), ocasionando desequilíbrio REDOX plasmático e hepático (LUNA-LUNA et al., 2015). Com isso, a SMet cursa com o chamado fenótipo lipídico aterogênico, composto por hipertrigliceridemia, aumento dos níveis séricos de apoliproteína B (apo B), redução do HDL colesterol e aumento de LDLs oxidadas (LDL-ox) pequenas e densas, consideradas mais aterogênicas (AL RIFAI et al., 2015; HONG et al., 2015). Dessa forma, outros exames podem ser somados na investigação da SMet para melhor avaliar o risco cardiovascular, como: colesterol total, LDL-colesterol, creatinina, ácido úrico e enzimas hepáticas (ALBERTI et al., 2009).

Diante do perfil silencioso das doenças que compõem a SMet, o diagnóstico e estadiamento clínico inicial, tornam-se bastante complexos, evoluindo corriqueiramente para a cronicidade, determinando mudanças progressivas e contínuas sobre o sistema metabólico, cardiovascular e hepático. Isso contribui para o aumento da mortalidade geral e duplica àquela diretamente ligada a causas cardiovasculares (DA FONSECA et al., 2014; KASTORINI; PANAGIOTAKOS; CHRYSOHOOU; et al., 2016; KASTORINI; PANAGIOTAKOS; GEORGOUSOPOULOU; et al., 2016).

Observa-se que a obesidade ganha cada vez mais destaque na tríade com o diabetes e a hipertensão, quando se trata de SMet, ainda que cada fator de risco influencie e reforce mutuamente um ao outro (ALBERTI et al., 2009; FURUKAWA et al., 2004). O respaldo a essa afirmação se encontra principalmente no fato de que o tecido adiposo passou a ser estudado como um órgão metabólico extremamente ativo, e dessa forma, na obesidade, o excesso da produção de citocinas, decorrente do aumento do número ou da atividade dos adipócitos, pode predispor a lesões vasculares, inflamação, resistência à insulina e esteatose hepática (KLOTING; BLUHER, 2014).

Com base nas premissas acima elencadas, a obesidade representa uma verdadeira epidemia interligada a um excesso de ingestão calórica, sedentarismo e resistência à insulina, liberando para a circulação sistêmica grande número de peptídeos ativos, fatores de complemento e citocinas, capazes de promover alterações sistêmico-hepáticas (BYRNE; TARGHER, 2014; KLOTING; BLUHER, 2014). Além disso, a presença da obesidade central, caracterizada por aumento da concentração de gordura visceral na região abdominal, implica potencial risco aterogênico, culminando, por vezes, em um desfecho clínico fatal (OKADA et al., 2016).

Diante do exposto, observa-se que o tecido adiposo é um órgão secretório central, capaz de produzir importantes substâncias, as adipocinas, que atuam na regulação metabólica local e sistêmica (SHI; BURN, 2004). Dois tipos teciduais podem ser identificados, o branco (TAB), com ampla produção hormonal, e o marrom (TAM), com atividade voltada à produção de calor (termogênese), distintos histologicamente pelo maior número de mitocôndrias observadas neste, como também pelo tamanho dos adipócitos, entre 30-40 μm de diâmetro, comparados aos até 100 μm no TAB (KIM; PLUTZKY, 2016; ZHANG; SUN; LIU, 2016).

O TAB está presente na região abdominal, glúteos, coxas e quadril e quando aumentados, determinam o surgimento de dois fenótipos distintos (MIN; MIN, 2015): androide e ginóide. O excesso de gordura nas regiões visceral e subcutânea abdominal, caracteriza o fenótipo clínico conhecido como andróide, considerado o mais grave e preocupante, principalmente devido à gordura visceral (obesidade central) que está diretamente ligada ao aparecimento da DHGNA e ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. Enquanto que o excesso nos membros inferiores, glúteos e quadril está associado a menores riscos, configurando-se o fenótipo ginóide (MIN; MIN, 2015).

Assim, considera-se que a obesidade central é um importante fator de risco presente na SMet, exercendo um papel chave no desencadeamento das alterações hormonais e moleculares presentes na patogênese desta síndrome (KIM et al., 2016). Associada a essa, a circunferência do pescoço vem sendo fortemente investigada, estando diretamente relacionada à obesidade central (DAI et al., 2016).

Nesse sentido, as adipocinas liberadas pelo TAB correspondem a um grupo diverso de substâncias com diferentes funções hormonais sistêmicas, especialmente hepáticas, metabólicas e vasculares. Entre essas, destacam-se: leptina, TNF-α, resistina, adiponectina e interleucinas (MOSCAVITCH et al., 2016).

A leptina é considerada um importante hormônio regulador da ingestão alimentar e gasto energético, podendo ser expressa por vários tecidos como: fundo gástrico, adeno-hipófise, musculatura esquelética e principalmente pelo TAB (LOPES et al., 2014). Suas ações são resultados da estimulação de neurônios hipotalâmicos que liberam substâncias anorexígenas (pró-ópio-melanocortina - POMC; transcrito relacionado à cocaína e anfetamina - CART) e da inibição daqueles que produzem substâncias orexígenas (neuropeptídeo Y - NPY; peptídeo agouti - AgRP) (BURKE et al., 2016; IWAKURA et al., 2016). Essas ações são frequentemente associadas à estimulação do gasto energético, principalmente, via sistema simpático (CRUZ et al., 2015).

O TNF-α também é outra adipocina que merece destaque; diretamente relacionado com o índice de massa corporal, possui diversas funções modulatórias e indutoras, podendo estar envolvido em processos de inflamação, apoptose, citotoxicidade (WON et al., 2009) e, ainda, no desencadeamento de doenças cardiovasculares (MUSE et al., 2015).

No cenário exposto, atenta-se para a fisiopatologia da DHGNA, desencadeada pelo acúmulo de gordura no fígado, em que as células adipocíticas presentes, nesta condição, são capazes de produzir TNF-α, IL-6 e fatores de proliferação macrofágica que podem contribuir para a indução e manutenção do processo inflamatório e agravamento da doença. Dessa forma, torna-se comum em situações crônicas de obesidade, o desenvolvimento de esteatose hepática, diretamente ligada à produção de adipocinas (PAN et al., 2015). Além disso, a IL-6 se mostra frequentemente associada à resistina na indução de cascatas inflamatórias, estando diretamente ligadas ao índice de adiposidade corporal (AMATO et al., 2014).

Nesse ínterim, a adiponectina exerce funções antagônicas ao TNF-α e à resistina, de maneira que uma de suas principais funções consiste no aumento da sensibilidade à insulina e inibição do TNF-α, promovendo proteção vascular e diminuição da interação de fatores que promovem danos sistêmicos (NOVOTNY et al., 2014).

Portanto, quanto maior o consumo de nutrientes ricos em gorduras e menor o gasto energético proporcional, tão logo será maior também a quantidade de lipídios armazenados no TAB, afetando diversos órgãos e sistemas, principalmente, quando se trata de adiposidade visceral central (MOSCAVITCH et al., 2016).

Fisiologicamente, e também na prática clínica, os lipídios mais importantes são os fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos, sendo estes últimos, a principal fonte de armazenamento energético nos adipócitos e no músculo (BYRNE; TARGHER, 2014; SHI; BURN, 2004). Nesse contexto, pequenas estruturas formadas por proteínas e lipídios, as apolipoproteínas aparecem com uma função bem importante, que é permitir o transporte dos lipídios no plasma, uma vez que estes possuem características hidrofóbicas (BYRNE; TARGHER, 2014).

De forma geral, as lipoproteínas são divididas em dois grupos: 1. As ricas em triglicerídeos, representadas pelos quilomícrons (de origem intestinal) e pelas VLDLs (lipoproteínas de muito baixa densidade) de origem hepática; e 2. Aquelas ricas em colesterol, representadas pelos HDLs e pelo LDLs. Ressalta-se ainda, a formação de componentes intermediários como os IDLs (lipoproteínas de densidade intermediária) e a lipoproteína “a” (Lpa), resultante da ligação covalente entre LDL e Apo-a (apolipoproteína-a) (BAYS et al., 2016).

Um dos principais componentes lipídicos consumidos na dieta são os triglicerídeos (BYRNE; TARGHER, 2014; DE MEIJER et al., 2010) que, após serem ingeridos, sofrerão a ação da lipase pancreática, liberando ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos que formarão micelas necessárias ao processo de absorção nos enterócitos, com consequente formação de quilomícrons no interior destes. Após circulação linfática, na forma de quilomícrons, estes ganham a circulação sistêmica e sofrem a ação de outra enzima, a lipase lipoprotéica, que estão presentes nos vasos sanguíneos e promovem a clivagem dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres ou não esterificados (NEFA). Estes, por sua vez, podem seguir para o fígado e, juntamente com o colesterol não esterificado, serem utilizados para a formação de VLDLs. Além disso, podem também, serem absorvidos pelos adipócitos e formarem novos triglicerídeos ou ainda, seguirem para os músculos esqueléticos e serem prontamente utilizados (FEINGOLD; GRUNFELD, 2000).

As lipases lipoprotéicas também podem atuar sobre as VLDLs liberando ácidos graxos e produtos remanescentes que formarão, no fígado, as IDLs e LDLs sob a ação da lipase hepática (HUANG; ELVINGTON; RANDOLPH, 2015).

Nesse controle, duas proteínas se destacam para facilitar o transporte de NEFA, a CD36 e a aP2. A CD36 corresponde a um elemento de diferenciação, podendo também ser chamado de FAT (fatty acid translocase ou translocase de ácido graxo), um análogo do receptor SR-B1 (“scavenger receptor class B type I”), representando uma proteína integral de membrana que pode ser encontrada em eritrócitos, plaquetas, adipócitos, fígado, entre outras células. Participa ativamente na captação de ácidos graxos de cadeia longa e está fortemente envolvida em processos como angiogênese, trombose, aterogênese e doença de Alzheimer (GRECO et al., 2008; KOONEN et al., 2007). Esta molécula é considerada um verdadeiro sensor lipídico, responsável pela manutenção do equilíbrio energético (MIQUILENA-COLINA et al., 2011). Além disso, outra molécula envolvida no transporte de ácidos graxos é a aP2 (gene da proteína ligadora de lipídeos do adipócito (ALBP), ou ainda FABP4 (fatty acid binding protein-4)) presentes no citoplasma, cuja regulação gênica pode ser intermediada pelos próprios NEFA, servindo como estimuladores gênicos da cascata (GRECO et al., 2008). Estas moléculas também apresentam uma regulação direta na liberação da glicose e na gliconeogênese no tecido hepático, podendo participar amplamente da homeostase da glicose; além de estimular diretamente a secreção da enzima hormônio lipase sensível (HSL), responsável pela indução da lipólise (OSORIO, 2014; ZECHNER; LANGIN, 2014).

Nesse ínterim, o HDL formado no fígado, intestino e na circulação, cumpre o importante papel de transportar o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, realizando o

transporte reverso desse elemento; além de exercer importante função protetora contra a aterogênese por remover lípides oxidados das LDLs, estimular a produção do $^{\bullet}$NO e impedir a adesão monocitária (GOGONEA, 2016).

Importantes alterações surgem quando ocorre desregulação na produção das lipoproteínas, resultando nas dislipidemias. Nesse sentido, o aumento da produção das VLDLs ou a diminuição da atividade da lipoproteína lipase no plasma, pode resultar em hidrólise insuficiente dos triglicerídeos e consequente hipertrigliceridemia. Enquanto que o acúmulo de LDLs no plasma resulta em hipercolesterolemia (HUANG et al., 2015).

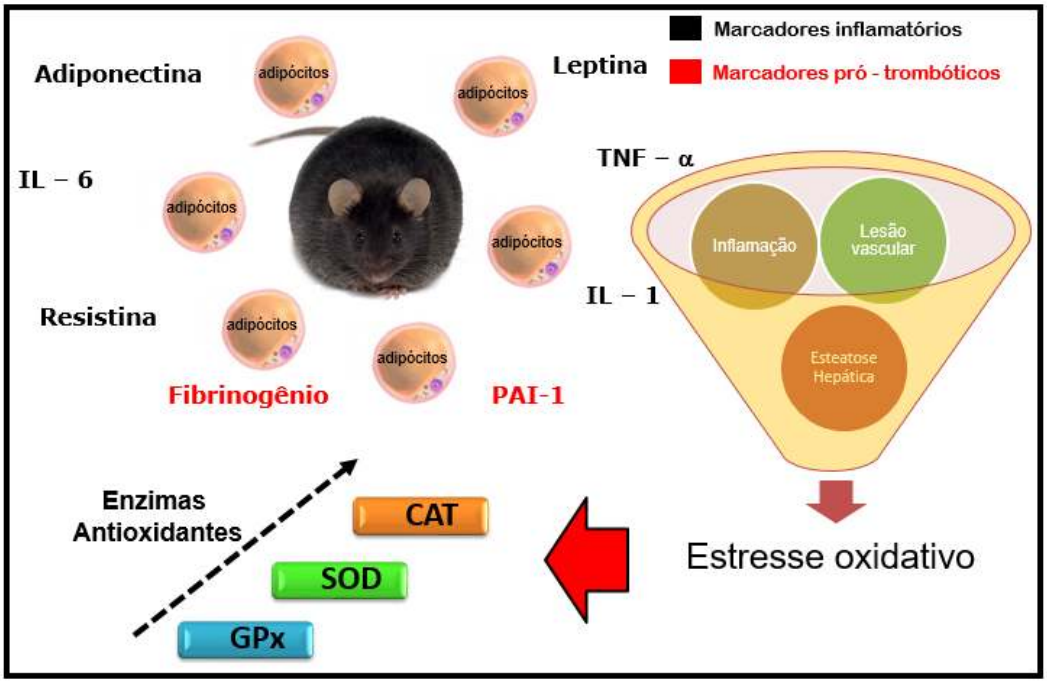
Atualmente, a terapia farmacológica utilizada no controle das dislipidemias é realizada principalmente pelas: 1. Estatinas com ações voltadas à diminuição da produção de LDLs e VLDLs; 2. Resinas e ezetimibas que promovem diminuição da absorção de colesterol e 3. Niacinas e fibratos que atuam na degradação de triglicerídeos e utilização de NEFA pelo fígado para a síntese de lipoproteínas (XAVIER et al., 2013). Associado a estes, a dieta e o exercício físico podem ser potentes coadjuvantes no tratamento dessas disfunções, haja vista que o exercício, ao estimular o sistema nervoso autônomo simpático, aumenta a atividade da enzima hormônio lipase sensível, promovendo maior atividade lipolítica (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013; PEDERSEN et al., 2016). Porém, ainda não se conhece nenhuma substância química ou mesmo farmacológica que possua amplas ações, capazes de controlar a obesidade em suas várias facetas metabólicas, desde o aumento do tamanho e número de adipócitos, passando pelo incremento secretório de adipocinas até a consolidação das alterações sistêmico-hepáticas, constituindo-se, portanto, em um amplo desafio.

Nestas condições de obesidade e dislipidemia, a desregulação metabólica e consequente produção de adipocinas estão associadas à intensa produção de ERONs (Figura 2), resultando em menor liberação e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, como o $^{\bullet}$NO, e aumento na liberação de substâncias vasoconstritoras como os radicais ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o que compromete o controle do tônus miogênico e o fluxo sanguíneo para órgãos e sistemas, incluindo o próprio tecido adiposo e hepático (FERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2011; RANI et al., 2016).

As diferentes ERONs possuem importantes funções de sinalização, a exemplo de cascatas inflamatórias e apoptóticas, necessárias a um amplo funcionamento do organismo. Contudo, vale ressaltar que muito dessa produção corresponde a radicais livres, elementos caracterizados por possuir um elétron desemparelhado em sua última camada, e por isso, na tentativa de formar par, induz lesões em tecidos, vasos e membranas, promovendo intenso processo de destruição e aumento do estresse oxidativo. Além disso, produtos finais de

glicação avançada, formados a partir de reações aminocarbonilo de natureza não-enzimática, e LDLs oxidadas contribuem para esses fenômenos e estão diretamente ligados às disfunções sistêmicas como hipertensão, diabetes, obesidade e DHGNA, observando-se uma interação múltipla entre estes (RANI et al., 2016).

**Figura 2 – Produção de adipocinas, estresse oxidativo e produção de enzimas antioxidantes**




A obesidade predispõe ao aumento da produção pelos adipócitos de diversas adipocinas com características pró-inflamatórias (adiponectina, IL-6, resistina, leptina, TNF-α e IL-1) e pró-trombóticas (fibrinogênio e PAI-1) que propiciam o surgimento de inflamação, lesão vascular e esteatose hepática, culminando no estresse oxidativo e consequente aumento de enzimas antioxidantes como a CAT, SOD e GPx. IL-6: interleucina-6; TNF: Fator de Necrose Tumoral α; PAI-1: inibidor do ativador de fibrinogênio-1; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase e GPx (glutationa peroxidase).
Fonte: Autor, 2016 - Baseado em informações de RANI et al., 2016; FERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2011.

Por outro lado, apesar das ERONs serem produzidas continuadamente e por diversos órgãos e tecidos, os sistemas antioxidantes enzimáticos são responsáveis por adequar essa produção, resultando num equilíbrio denominado equilíbrio REDOX, que pode ser caracterizado por reações de redução e oxidação necessárias para a manutenção celular e que estão necessariamente relacionadas à quantidade de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes.

O nível de produção dessas espécies vai variar de acordo com a função desempenhada por cada sistema ou órgão, assim como, em conformidade com sua capacidade metabólica e produção de antioxidantes. Nesse sentido, a alimentação também pode fornecer importantes antioxidantes exógenos naturais, como aqueles presentes nos flavanóides. Além disso, hábitos de vida saudáveis, como a prática de exercícios físicos regulares, podem promover aumento de enzimas que reduzem o estresse oxidativo como a creatina fosfoquinase muscular,

aldolase, SOD e CAT, as quais passam a apresentar um aumento de sua atividade em caráter adaptativo (KASTORINI; PANAGIOTAKOS; CHRYSOHOOU; et al., 2016; RANI et al., 2016).

Diversas enzimas importantes estão envolvidas nos mecanismos de defesa antioxidantes como a SOD, a CAT e a GPx, bem como proteínas representadas pela tioredoxina e peroxiredoxina (DA FONSECA et al., 2014; LEI et al., 2016).

Em se tratando da SOD, esta pode ser encontrada em diversos compartimentos celulares como no citosol (CuZnSOD – SOD 1), na membrana mitocondrial interna (CuZnSOD – SOD 1), no interior das mitocôndrias (MnSOD – SOD 2) e no espaço extracelular (SOD – SOD 3) e geralmente estão aumentadas em situações de desequilíbrio REDOX e estresse oxidativo (LEI et al., 2016).

Nesse sentido, a peroxidação lipídica decorrente do estresse oxidativo é vista como o principal fator indicativo de lesão sobre as membranas celulares, mitocondriais, do retículo endoplasmático e do núcleo, decorrente do aumento das ERONS, especificamente dos radicais livres. A detecção do malondialdeído (MDA), um dos produtos derivados da peroxidação pode ser efetivada pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (TBARS) e representa um método bastante empregado na detecção do estresse oxidativo (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; ESTERBAUER et al., 1992). Outros produtos como os isoprostanos, hidrocarbonetos (etanos e pentanos) e alcanos, também podem ser detectados (ESTERBAUER et al., 1992).

Nesse contexto, a glutationa também pode ser utilizada na avaliação do equilíbrio REDOX (DUNNING et al., 2013), por ser caracterizada como um importante antioxidante sistêmico. Frequentemente, pode reagir com o $H_2O_2$ originando glutationa oxidada, reação catalisada pela enzima glutationa peroxidase ou, do contrário, remover o $H_2O_2$ através da glutationa redutase (LEI et al., 2016).

Observa-se que todos esses fatores envolvidos com o estresse oxidativo podem estar presentes na SMet, cursando como fatores predisponentes a esta, ou mais comumente, serem resultantes desta. Assim, há evidências de que o *status* oxidativo e os altos níveis de inflamação podem tanto denotarem manifestações de disfunção endotelial, hipertensão, DHGNA, DM2 de forma isolada ou atuarem evolutivamente na formação e consolidação da síndrome (YUBERO-SERRANO et al., 2013).

Nesse sentido, Yubero-Serrano e colaboradores (YUBERO-SERRANO et al., 2013) demonstraram uma estreita relação entre o estresse oxidativo e o número de comorbidades presentes em pacientes com SMet, de modo que os níveis plasmáticos da molécula 1 de

adesão celular vascular (sVCAM-1), $H_2O_2$, produtos da peroxidação lipídica (LPO), SOD e GPx foram menores em pacientes com 2 ou 3 componentes para a síndrome comparados a pacientes com 4 ou mais (YUBERO-SERRANO et al., 2013). Além disso, o aumento do estrese oxidativo está diretamente relacionado com a maior deposição de gordura visceral ou obesidade central (FUJITA et al., 2006).

Venturini e colaboradores (VENTURINI et al., 2012) demonstraram que indivíduos com sobrepeso diagnosticados com SMet apresentavam níveis mais altos de hidroperóxidos e $H_2O_2$ comparados àqueles apenas com sobrepeso, evidenciando além do desequilíbrio REDOX, diminuição da capacidade oxidativa (VENTURINI et al., 2012). Além disso, as ações da CAT podem estar prejudicadas na obesidade, o que pode contribuir para a desregulação da produção de $H_2O_2$ (AMIRKHIZI et al., 2014), o que determina um importante eixo ($H_2O_2$/CAT), dentro do equilíbrio REDOX, a ser investigado.

Assim sendo, estes eventos além de contribuir para a desregulação de diversas cascatas de sinalização em importantes órgãos metabólicos como os adipócitos e o fígado, podem implicar prejuízos na regulação entre lipólise e lipogênese, mesmo na presença de estímulos que ativem a fome ou a saciedade, e dessa forma comprometer o delicado controle/equilíbrio entre o armazenamento das reservas alimentares e a estimulação do gasto energético (CANTO; AUWERX, 2012).

Quando há desregulação desse equilíbrio, doenças como a resistência à insulina, obesidade e diabetes podem estar envolvidas na sua origem ou serem consequências do processo (ADIELS; TASKINEN; BOREN, 2008; BYRNE; TARGHER, 2014). Portanto, torna-se importante atentar para as vias de sinalização que regulam esses estímulos, bem como seus moduladores.

A produção de radicais livres e ERONs ocorre na maioria das reações celulares e está envolvida na regulação de diversas cascatas de sinalização, incluindo regulação gênica e apoptótica. Contudo, diferentes comorbidades estão associadas à desregulação dessa produção, provendo acentuado aumento na formação das ERONs, como acontece na obesidade e na SMet (TOUYZ; BRIONES, 2011; VENTURINI et al., 2012; VIDELA et al., 2004).

Nessa condição, membranas celulares tornam-se suscetíveis à lesão oxidativa, ocasionando danos às macromoléculas como o DNA, lipídios e proteínas (BHATTACHARYYA et al., 2014). Nesse cenário, mesmo sob a ação de antioxidantes enzimáticos já supracitados como a CAT, GPx, SOD, paraoxonase 1 (PON1), e por vezes, sob a atuação de componentes não enzimáticos como as vitaminas C, E, ácido úrico e ubiquinona;

a capacidade antioxidante pode ser sobrepujada, conforme demostrado por Spanidis e colaboradores (2016) em estudo avaliativo sobre o *status* redox em pacientes com SMet (SPANIDIS et al., 2016). Ainda assim, faz-se importante salientar que estas enzimas: SOD, GPx e CAT são caracterizadas como importantes antioxidantes primários por estarem envolvidas na eliminação direta das ERONs.

Diante disso, a utilização de agentes químicos que modulem o equilíbrio redox, principalmente no que corresponde ao eixo ($H_2O_2$/CAT), torna-se relevante, podendo melhorar a ativação de vias metabólicas, determinando possibilidades terapêuticas mais precoces. Assim, os eventos decorrentes, principalmente, da obesidade, da resistência à insulina e da esteatose hepática podem ser minimizados, restaurando-se ou melhorando-se o equilíbrio nas vias de atuação do controle energético (BYRNE; TARGHER, 2014; DE KREUTZENBERG et al., 2010).

## 2.2 O eixo em foco: peróxido de hidrogênio/catalase/equilíbrio REDOX

A catalase foi descoberta em 1901 por Lowi, através de experimentos com plantas e tecidos animais, nos quais se evidenciou a ação de uma enzima capaz de decompor o $H_2O_2$, chamando-a de CAT (BROWN, 1952). Esta é amplamente encontrada em mamíferos, estando presente em altas concentrações no fígado, rins e eritrócitos (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970).

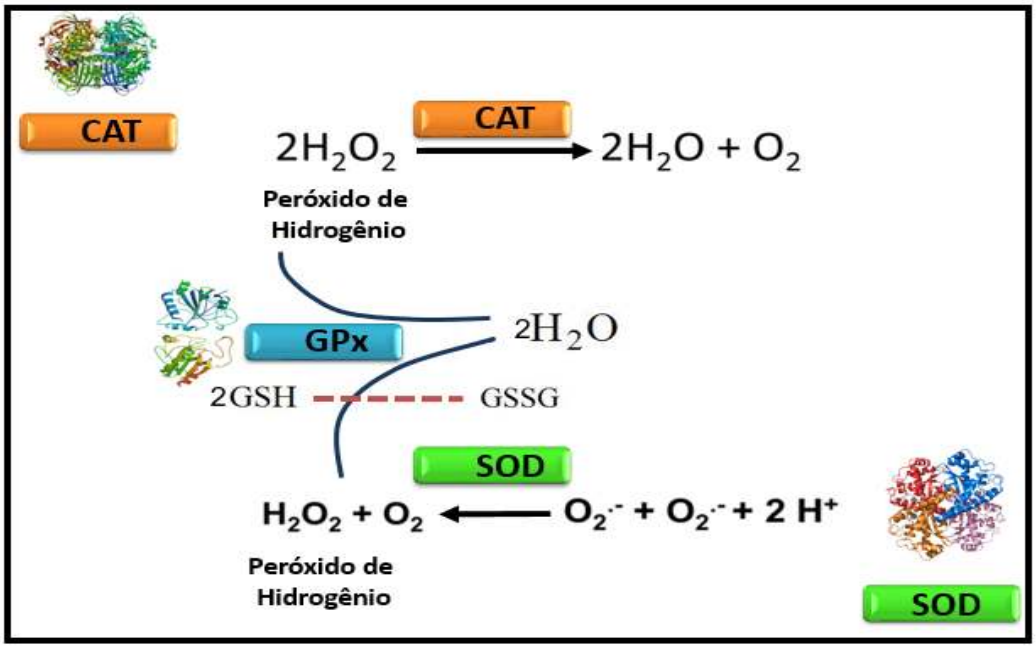
Esta enzima representa um dos mais importantes sistemas de defesa antioxidante enzimático presentes nos peroxissomos (LEI et al., 2016), apresentando a função de degradar o excesso de $H_2O_2$ (Figura 3), que excede os níveis considerados fisiológicos e sua produção está frequentemente associada à atividade metabólica dos adipócitos, sendo portanto, modificada de acordo com os estados de restrição calórica e obesidade.

O $H_2O_2$, substrato exclusivo para a ação da CAT, é uma potente espécie reativa envolvida nas mais diversas funções, agindo como bactericida, promotores ou inibidores do relaxamento vascular e até mediadores de canais. Recentemente, o mesmo vem sendo bastante estudado por suas características recém exploradas de que ele consegue agir amplamente na regulação metabólica, ativando vias de forma semelhante a moléculas voláteis como o $^{\cdot}NO$, apresentando grande facilidade de difusão membranar através das aquaporinas (SIES, 2014). A maior via de produção do $H_2O_2$ ocorre a partir da dismutação do radical ânion superóxido pela SOD (Figura 3), e este, por sua vez, é produzido em grandes

quantidades no organismo, tanto pelas NADPH oxidases, quanto por neutrófilos, monócitos e macrófagos (SIES, 2014).

A partir da ação da SOD sobre o $O_2^{\bullet-}$, dá-se origem à formação de $H_2O_2$, que pode ser convertido em $H_2O$ sob a ação da CAT ou da GPx (Figura 3). Além disso, outra importante enzima, a mieloperoxidase, presente nos leucócitos pode também utilizar o $H_2O_2$ como co-substrato. Interessantemente, em sua atividade, esta enzima é responsável pela produção de substâncias oxidantes como o ácido hipocloroso, que acaba gerando produtos secundários com alto potencial deletério como o oxigênio singlet, desencadeando eventos como apoptose e condução do processo inflamatório, juntamente com o próprio $H_2O_2$ (VAN DER ZWAN et al., 2010). Intrigantemente, o ácido hipocloroso pode induzir o desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) endotelial, tornando-a produtora de $O_2^{\bullet-}$ e promovendo um ciclo vicioso diretamente relacionado ao estresse oxidativo (VAN DER ZWAN et al., 2010).

**Figura 3 – Atividade enzimática da CAT, SOD e GPX**




As atividades das enzimas CAT, SOD e GPX regulam a produção de $H_2O_2$. A CAT realiza a dismutação do $H_2O_2$ em água e oxigênio molecular, por sua vez, a SOD o forma através da dismutação do radical ânion superóxido e a glutationa o transforma em água.
Fonte: Autor, 2016 - Baseado em informações de SIES, 2014; VAN DER ZWAN et al., 2010.

É importante ressaltar que o $H_2O_2$ está entre as espécies mais presentes no tecido adiposos, representando a principal ERON neste, e o aumento de suas concentrações pode implicar graves disfunções no metabolismo dos adipócitos (RUPEREZ; GIL; AGUILERA, 2014). Além disso, autores mostraram que a atividade da CAT pode estar diminuída em

indivíduos obesos, resultando em maiores concentrações de $H_2O_2$ nestes. Este fenômeno pode estar relacionado à indução da produção de ERONs na obesidade e doenças associadas que comprometem toda a dinâmica funcional dos adipócitos, diminuindo também a formação da adiponectina e expressão de GLUT 4 (AMIRKHIZI et al., 2014).

As mitocôndrias também apresentam um importante meio de produção de $H_2O_2$ estreitamente relacionado à cadeia respiratória e à produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial pelo complexo citocrômico. Somado a isto, enzimas como a NAD(P)H oxidase e NOS desacoplada constituem as principais vias de produção do $O_2^{\bullet-}$, o qual origina, consequentemente, o $H_2O_2$. A produção direta desse ânion pode ser mediada por diferentes oxidases, como a xantina oxidase e a monoamina oxidase em diferentes compartimentos celulares (VAN DER ZWAN et al., 2010). Além disso, foi demostrado que a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) representa uma importante fonte de NADPH em condições de obesidade, aumentando a produção do $O_2^{\bullet-}$ (SERPILLON et al., 2009), muito embora, o NADPH seja necessário para a produção da glutationa reduzida (GSH).

Não obstante, Fisher-Wellman e colaboradores (2013) mostraram que o complexo piruvato desidrogenase também pode ser uma via de produção de $H_2O_2$ proveniente de mitocôndrias de músculos esqueléticos, sob condições de reduzida produção de glutationa; em condições normais, esta realiza tamponamento e mascara a produção do peróxido decorrente do piruvato (FISHER-WELLMAN et al., 2013).

Furukawa e colaboradores (2014) mostraram que camundongos obesos tratados com inibidores da formação de NADPH apresentaram diminuição das ERONs no tecido adiposo, servindo para atenuar a desregulação de adipocitocinas, apresentando melhoras glicêmicas e hepáticas, resultando em diminuição da esteatose (FURUKAWA et al., 2004). Isso demonstra que a regulação REDOX no tecido adiposo pode ser considerada um potente alvo terapêutico na obesidade.

Faz-se importante destacar que o aumento da peroxidação lipídica, associado à produção de ERONS, encontra-se amplamente amparado no aumento do consumo de dietas ricas em gorduras.

Nesse sentido, Nadal-Casellas e colaboradores (2011) mostraram que ratas Wistar alimentadas com dieta “high fat” por 26 semanas exibiram maior capacidade termogênica acompanhada de maior produção de $H_2O_2$ mitocondrial e intrigantemente menores danos oxidativos, explicado possivelmente pelo aumento da atividade da GPx, comparado a ratos machos nas mesmas condições (NADAL-CASELLAS et al., 2011). Mais recentemente, Kakimoto e colaboradores (KAKIMOTO et al., 2015) observaram que animais com esteatose

hepática induzida por dieta rica em gordura, apresentaram maior produção de $H_2O_2$ resultante do maior transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias hepáticas, sendo utilizados para a β-oxidação (KAKIMOTO et al., 2015). Em conjunto, esses dados evidenciam que cadeias longas de acyl-CoA desidrogenase, importante componente da β-oxidação, produz em sua atividade oxidativa o $H_2O_2$ no interior mitocondrial (KAKIMOTO et al., 2015; NADAL-CASELLAS et al., 2011).

Em situações fisiológicas, a mitocôndria tem preferência pela utilização da glicose no que corresponde à produção de energia (BOUILLAUD, 2009). Nesse processo, algumas enzimas se destacam no estrito controle regulatório da disponibilidade de glicose, através da glicólise e gliconeogênese (KAKIMOTO et al., 2015).

A glicoquinase (GCK) é uma importante enzima presente no pâncreas, cérebro e fígado, apresentando como função catalisar a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato. Pode-se afirmar que ela controla a entrada de glicose que dever ser fosforilada, servindo, portanto, como um sensor. Ao passo que outra enzima limitante no processo de regulação da glicemia consiste na glicose-6-fosfatase (G6Pase) que é responsável, no fígado, pela conversão final de glicose-6-fosfato em glicose, formando, portanto, junto à glicoquinase, um elo regulador entre armazenamento e liberação da glicose (HAYASHI et al., 2015).

Completando a tríade enzimática no processo de regulação da glicose, a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase merece destaque por participar do processo de gliconeogênese, favorecendo a formação de oxaloacetato a partir de fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono, na presença de trifosfato de guanosina (GTP), como doador de fosfato, fazendo-se presente tanto no citosol quanto nas mitocôndrias hepáticas. O gene PcK1 é responsável por codificar a fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (PEPCKc) e o PcK2 codifica a mitocondrial (PEPCKm), com ações em rins e fígado (BEALE; HARVEY; FOREST, 2007)(BEALE; HARVEY; FOREST, 2007).

Como o sistema mitocondrial possui extrema preferência pelos carboidratos na manutenção da respiração celular basal, a partir do momento que ocorre um maior consumo de ácidos graxos decorrentes da obesidade, atenta-se que isso pode ser um dos indicativo da causa da resistência à insulina. Interessantemente, os peroxissomos também realizam β-oxidação e a falta da cadeia respiratória faz com que ocorra transferência de elétrons diretamente ao $O_2$, produzindo $H_2O_2$ (LODHI; SEMENKOVICH, 2014).

Observa-se, portanto, que a mitocôndria, uma das organelas mais abundantes nos adipócitos e células hepáticas, exercem um papel chave na produção de peróxido na

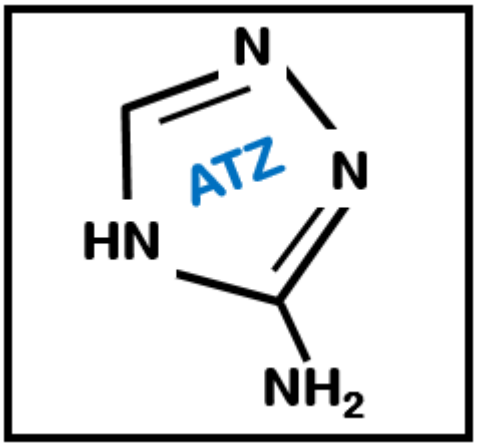
obesidade, evidenciando-se importantes interações encontradas na SMet, o que torna essas comorbidades, os principais alvos medicamentosos.

Dessa maneira, evidências apontam que o eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio REDOX pode ser considerado um potencial alvo terapêutico na SMet/obesidade e o uso de inibidores como o ATZ pode determinar respostas antiobesidade associadas à modificações sistêmico-hepáticas.

## 2.3 3-amino 1,2,4 triazole (ATZ): um antigo inibidor da catalase, mas com um recente e inovador propósito terapêutico

O 3-amino 1,2,4 triazol (ATZ, C2H4N4), (Figura 4), também conhecido como 1,2,4-triazol-3-amine, ou aminotriazole ou amitrol, com peso molecular de 84,08 g/mol, caracteriza-se como um composto orgânico heterocíclico sólido, sabor amargo, estável à temperatura de 20ºC, solúvel em água, metanol e etanol (ORGANIZATION, 1994).

**Figura 4 – Estrutura química do ATZ**




A figura mostra a estrutura química do ATZ, C2H4N4.
Fonte: Baseado em WHO-HSG.85, 1994.

Na década de 1950, o ATZ passou a ser usado na composição de um importante herbicida, comumente denominado de Amitrole, empregado no controle de diversas pragas agrícolas, por possuir um amplo espectro de atuação. Este contém apenas 19% de ATZ, sendo o restante de sua composição, formada por outros compostos químicos (BALKISSON; MURRAY; HOFFSTEIN, 1992). Quando aplicado como herbicida, atua inibindo a formação de clorofila e, devido à baixa pressão de vapor, não entra na atmosfera (WHO-HSG.85, 1994).

Em se tratando do ATZ, pode se afirmar que, quimicamente, comporta-se como uma amina aromática ou como s-triazol formado através da condensação de aminoguanidina e ácido fómico a 200ºC. Trata-se de um pó cristalino de cor branca, com ponto de fusão em

torno de 159ºC, solúvel em água e etanol, mas moderadamente solúvel em compostos orgânicos como hexano e tolueno (WHO-HSG.85, 1994).

Faz-se importante ressaltar que, por possuir uma alta solubilidade em água e um coeficiente de partição muito baixo, não há possibilidades de bioacumulação ou transporte de seus componentes, através das cadeias alimentares (BALKISSON et al., 1992)

Em meados do século XX, o ATZ passou a ser classicamente reputado como um potente inibidor da CAT, em concentrações de $2x10^{-2}$ M (FEINSTEIN et al., 1958). E tão logo, deu-se sua utilização em animais para fins de observação do funcionamento sistêmico-orgânico, retratando situações metabólicas sob inibição da atividade da CAT e aumento da biodisponibilidade de $H_2O_2$, uma vez que, essa enzima, apresenta a função de convertê-lo em água e oxigênio molecular (TEPHLY et al., 1965).

Nessa época, experimentos *in vivo* e *in vitro* demostraram a especificidade do ATZ sobre a inibição da catalase hepática e renal (Feinstein, 1957), o mesmo não ocorrendo sobre a catalase eritrocitária (FEINSTEIN; DAINKO, 1959). Interessantemente, observou-se também que a inibição efetiva da CAT só ocorre na presença de quantidades basais de $H_2O_2$ (DARR; FRIDOVICH, 1986). Em 1962, Margoliash e Schejter relataram existir inibição irreversível da CAT pelo ATZ na presença do peróxido de hidrogênio e do complexo I de doadores de peróxido-catalase (MARGOLIASH; SCHEJTER, 1962).

Em estudo pioneiro comparando as ações de vários inibidores, demostrou-se que quatro tipos mostram-se bem efetivos: 4-aminopirazol, 4-hidroxipirazol, pirazol e 3-aminotriazol. Não obstante, o ATZ mostrou eficiência inibitória, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DEIS; LIN; LESTER, 1977).

A partir de então, o ATZ passou a ser amplamente empregado para investigações sistêmico-orgânicas. Dessa forma, observou-se que o uso do ATZ inibe rapidamente a atividade da CAT hepática, alcançando sua atividade mínima após 1,5 hora da aplicação, sem afetar o funcionamento microssomal, onde a enzima possui atividade normal, quando comparada a outros sítios celulares como os peroxissomos (NAKAMURA; HARA; MINAKAMI, 1973). De acordo com Morimoto e colaboradores (1978), o ATZ também se mostrou efetivo em inibir a CAT presente no córtex renal de ratos, sem afetar a atividade nos peroxissomos (MORIMOTO et al., 1978). Posteriormente, Ueda e colaboradores (2003) confirmaram que o uso do ATZ não afeta o transporte da catalase para os peroxissomos (UEDA et al., 2003).

Nesse contexto, observou-se que o aumento da produção do $H_2O_2$ induzido pelo uso de ATZ sobre a CAT pode ser prejudicado, quando associado a outras substâncias, como o

etanol, determinando aumentos na peroxidação lipídica, conforme observado em miocárdio de ratos (ANTONENKOV et al., 1989).

Em 2009, Cardoso e colaboradores observaram que o uso do ATZ permite maior disponibilidade do $H_2O_2$ para áreas como o núcleo do trato solitário, sendo efetivamente atuante na indução da diminuição da pressão arterial e bradicardia em ratos (CARDOSO et al., 2009), demonstrando uma importante ação sistêmica. Seguindo-se, compostos com ação comprovadamente antimicrobiana foram sintetizados a partir da reação de 1,3,4-thiadiazoles com compostos nucleófilos de nitrogênio, como o ATZ (FARGHALY; ABDALLAH; AZIZ, 2012).

O que se observa é que o ATZ é amplamente utilizado em pesquisas que objetivam estudar as ações da catalase e ou do $H_2O_2$, como fizeram Chilumuri e colaboradores (2013), demonstrando que a superexpressão da CAT diminui a quantidade de substâncias beta amilóides na doença de Alzheimer e esse processo pode ser revertido pelo uso do ATZ, ao inibir a atividade dessa enzima (CHILUMURI; ODELL; MILTON, 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o ATZ promove lipólise em diversos tecidos sólidos isolados, como o fígado e rins (MARGOLIASH; NOVOGRODSKY, 1958).

Interessantemente, em um elegante estudo envolvendo experimentos *in vivo* e *in vitro* em ratos, Ishii e colaboradores (1978) demostraram que a injeção intraperitoneal de (100mg/100 g) de ATZ determina uma concentração hepática máxima de 20 mM de ATZ em 30 minutos, decaindo nas duas horas subsequentes, ficando, a partir de então, mais concentrado no plasma celular. Esses eventos predispõem a uma menor formação de triglicerídeos hepáticos diretamente relacionada à diminuição na síntese de ácidos graxos, por inibir enzimas que participam no processo de síntese como a malonil-coA-carboxilase e a acetil-coA- carboxilase (ISHII et al., 1978). Contudo, até o momento, nenhum trabalho descreveu as ações deste composto em modelos animais para a obesidade, SMet e outras doenças cardiovasculares e metabólicas.

Observa-se que, quando aplicado em animais experimentais, o ATZ é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e excretado quase por completo nas primeiras 24 h através da urina. Além disso, de acordo com a US-EPA (1996), as evidências mostram que o ATZ não é mutagênico ou carcinogênico em humanos (US-EPA, 1996).

Nesse contexto, quando testado em várias espécies e por diversas vias de administração, os valores de sua DL50 foram sempre maiores que 2500 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal, apresentando baixa toxicidade aguda. Contudo, salienta-se, que doses elevadas

podem determinar comprometimento da glândula tireoide e induzir lesões hepáticas (WHO-HSG.85, 1994).

Tratando-se dos possíveis efeitos tóxicos encontrados em humanos, apenas um caso de dermatite por contato foi relatado. Não obstante, o ATZ não ocasiona efeitos tóxicos quando ingeridos até a dose de 20 $mg.kg^{-1}$ de peso, não sendo relatado o uso de doses superiores (WHO-HSG.85, 1994).

Deng e colaboradores (2012) observaram os efeitos agudos do uso do ATZ, administrado intraperitonealmente nas doses de 125$mg.kg^{-1}$ até 500 $mg.kg^{-1}$, em camundongos com lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCL4) e obtiveram como resultado, após seis horas da aplicação, diminuição dos níveis de $H_2O_2$, malondialdeído, citocinas pró-inflamórias (TNFα, IL-6), níveis plasmáticos de mieloperoxidase e enzimas hepáticas (ALT e AST), resultando em melhora da lesão hepática (DENG et al., 2012).

Por outro lado, recentemente, Ruiz-Ojeda e colaboradores (2016) observaram que o uso do ATZ (2mM e 10 mM) em células adiposas isoladas promove estresse oxidativo, inflamação, diminuição do aporte de glicose para a célula e lipólise (RUIZ-OJEDA et al., 2016).

A partir do contexto histórico experimental discutido, acredita-se que o ATZ pode ser uma relevante ferramenta química capaz de agir potencialmente como modulador do eixo $H_2O_2$/CAT/equilíbrio REDOX e promover importantes benefícios, principalmente direcionados à lipólise e ao controle energético sistêmico-hepático, determinando efeitos terapêuticos antiobesidade.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

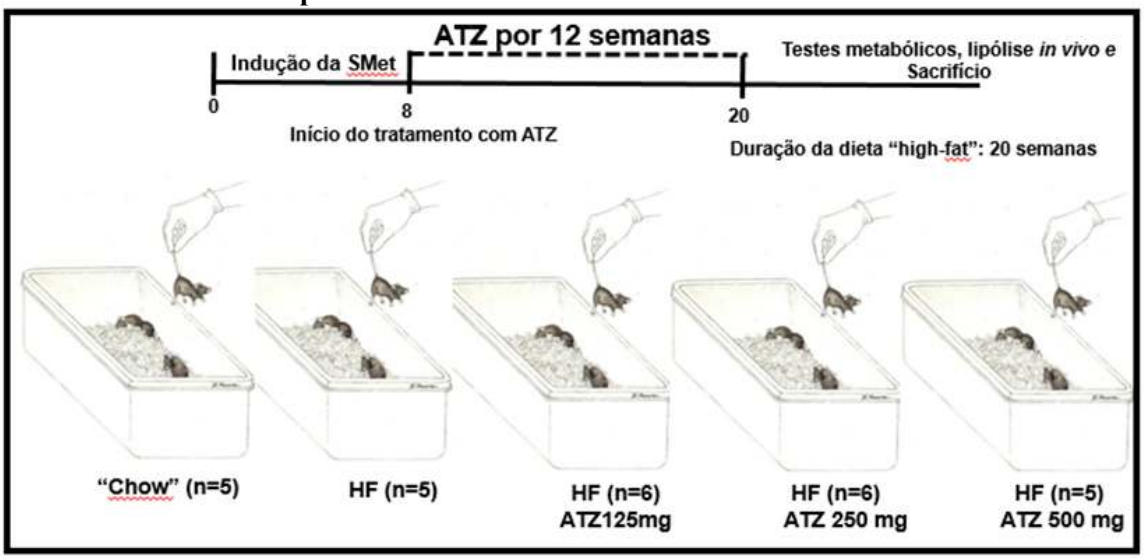
## 3.1 Animais e delineamento experimental

Para o presente estudo foram realizadas 3 séries experimentais com camundongos machos isogênicos, jovens, da raça C57Bl/6 com idades de 6 a 8 semanas (~19-20 gramas), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL).

Todos os aniais foram mantidos em condições ideais de experimentação (NUNES-SOUZA et al., 2016) no Laboratório Experimental para Camundongos do Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), respeitando-se os cuidados padrão, como: ciclo claro-escuro fisiológico de 12hs (com fase de escuro das 18:00 hs às 6:00 hs), temperatura de 21 ± 2,0ºC, água e alimentação *ad libitum* e condições adequadas de higienização. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os critérios descritos no "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publicação 86-23, 1996) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (Protocolo CEAU 029/2014). Após uma semana de aclimatação, randomizaram-se os animais, em 4 grupos (Figura 5):

1. Grupo controle (CT, n = 5; sem nenhuma intervenção, apenas com dieta chow);
2. Grupo SMet ("high fat" - HF -, n = 5; com dieta hiperlilípidica-hipercálorica);
3. Grupo SMet + $ATZ_{125}$ ($ATZ_{125}$, n = 6; com dieta HF associada a 125 $mg.kg^{-1}$ de ATZ);
4. Grupo SMet + $ATZ_{250}$ ($ATZ_{250}$, n = 6; com dieta HF associada a 250 $mg.kg^{-1}$ de ATZ);
5. Grupo SMet + $ATZ_{500}$ ($ATZ_{500}$, n = 5; com dieta HF associada a 500 $mg.kg^{-1}$ de ATZ).

**Figura 5 – Delineamento experimental**



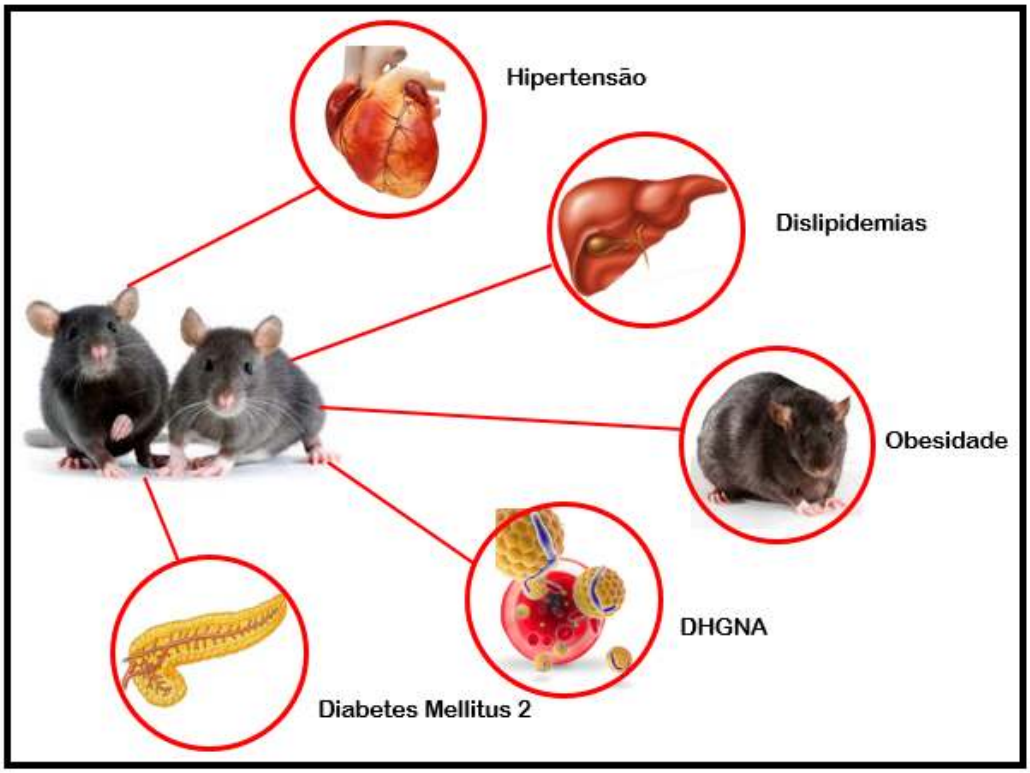

Após 8 semanas de dieta HF, iniciou-se o tratamento com o ATZ em três diferentes doses (125 mg, 250 mg e 500 mg) até a vigésima semana, totalizando 12 semanas de intervenção. Em seguida, realizou-se os testes metabólicos, lipólise e o sacrifício dos animais.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

A dose administrada de ATZ foi estritamente relacionada com a dose-padrão recomendada para ocorrer inibição total da catalase ($2x10^{-2}$ mM na presença de $H_2O_2$) (WHO-HSG.85, 1994).

Inicialmente, todos os animais, exceto os do grupo controle, receberam a dieta HF por 8 semanas (tempo suficiente para a indução dos agravos metabólicos a serem investigados, (Figura 6) e após esse período, observou-se que estes apresentavam fenótipo para a SMet (NUNES-SOUZA et al., 2016). A partir desse momento, iniciou-se o tratamento com o ATZ em diferentes doses (125 mg, 250 mg e 500 $mg.kg^{-1}$) na dieta HF já ofertada, o que ocorreu durante 12 semanas (Figura 5).

A dose de AZT foi ajustada semanalmente, tendo-se em conta o peso corporal médio, que, por sua vez, foi avaliado semanalmente em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®).

**Figura 6 – Síndrome metabólica em camundongos**




A dieta HF induz o surgimento dos principais fatores de risco encontrados na SMet em humanos: diabetes mellitus 2, DHGNA: doença hepática gordurosa não alcóolica, obesidade, dislipidemias e hipertensão.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 3.2 Dieta hipercalórica

A dieta hipercalórica foi manipulada no LRC por uma única pessoa, devidamente habilitada, apresentando a seguinte distribuição de macronutrientes: lipídios 58,4%, proteínas 15,0% e carboidratos 26,6%, com maior quantidade de calorias advindas dos lipídios e

compactada na forma de “pellets” (NUNES-SOUZA et al. 2016). Todos os componentes da dieta hipercalórica foram adquiridos da Rhoster® LTDA (São Paulo, Brasil) e Sigma® (Seelze, Alemanha). O ATZ se mostrou estável quando associado à dieta, a qual em nenhum momento ficou em temperaturas acima 22°C. A dieta “chow” (Nuvilab®) ofertada ao grupo controle possuía 14,0% de lipídios, 23% de proteínas e 63,0% de carboidratos, apresentando maior quantidade de calorias advindas dos carboidratos.

## 3.3 Tratamento com o ATZ

Procedeu-se com a intervenção com o ATZ a partir da oitava semana em diferentes doses, e este foi ofertado microprocessado e misturado com a dieta, durante doze semanas até o sacrifício, conforme descrito no item “3.1”.

No intuito de avaliar as ações metabólicas do ATZ, diversos experimentos foram realizados *in vivo, in vitro* e *ex vivo,* conforme descritos a seguir.

## 3.4 Avaliações *in vivo*

Serão apresentados todos os procedimentos realizados no animal antes do sacrifício.

### 3.4.1 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar (consumo alimentar) dos camundongos foi avaliada três vezes por semana, fazendo a pesagem em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®). É importante salientar que a dieta era pesada durante a oferta inicial e na reposição, momento em que eram pesados os resíduos.

### 3.4.2 Peso corporal

O peso corporal também foi avaliado utilizando-se balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®). O mesmo era acompanhado semanalmente. Além disso, registrou-se o peso inicial dos animais e ao final de todo o tratamento (antes do sacrifício), respeitando-se os mesmos horários pelo mesmo observador, mantendo-se um padrão de análise.

### 3.4.3 Glicemia de jejum

A glicemia foi realizada semanalmente através da utilização de um glicosímetro (Accu-Chek® *Performa*, Roche®, Alemanha), respeitando-se um jejum de 12 hs. A coleta de sangue foi realizada a partir da veia caudal, após um pequeno corte na ponta da cauda do animal.

### 3.4.4 Avaliação da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e da gliconeogênese

Ao final do tratamento com o ATZ, todas as avaliações metabólicas *in vivo* foram realizadas no período de atividade do animal (período da tarde/janela metabólica). A glicemia de jejum (~12h de jejum) foi analisada através do aparelho (Accu-Chek® *Performa*, Roche®, Alemanha), a partir de amostra de sangue retirada da ponta da cauda dos animais.

Em seguida, para o teste de tolerância à glicose (TTG), injetou-se intraperitonealmente (ip) uma solução de glicose (2,0 $g.kg^{-1}$ de peso corporal), avaliando-se posteriormente, os níveis glicêmicos aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, através da coleta de uma gota de sangue a partir da cauda dos animais nos tempos específicos.

Dois dias depois, realizou-se o teste de sensibilidade à insulina (TRI) com os animais em estado alimentado. Para tanto, mensurou-se a glicemia basal a partir de um pequeno corte na cauda do animal e em seguida foram administradas 0,75 unidades de $insulina.kg^{-1}$ de peso corporal (ip; Humulin®, Eli Lilly, EUA) com medições glicêmicas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Intentando-se avaliar as ações do ATZ no perfil gliconeogênico hepático, ~48h após o TRI, procedeu-se o teste de tolerância ao piruvato (TTP). Neste experimento, os animais foram mantidos em jejum de ~16 horas. Após a verificação da glicemia basal, injetou-se, por via intraperitoneal, o piruvato de sódio (2,0 $g.kg^{-1}$ de peso corporal). Temporalmente, mensurou-se a glicemia conforme descrito para o TTG.

O índice triglicerídeos-glicose também foi utilizado para determinar indiretamente a resistência à insulina, obtido pelo produto dos níveis de triglicerídeos (Tyg) e de glicose, conforme descrito na equação 01, a seguir (GUERRERO-ROMERO et al., 2010; SIMENTAL-MENDIA; RODRIGUEZ-MORAN; GUERRERO-ROMERO, 2008):

$$\text{Equação 01: Índice Tyg} = \ln\left[\text{triglicerídeos}\ (\text{mg}.dL^{-1}) \times \text{glicose}\ (\text{mg}.dL^{-1}) / 2\right]$$

### 3.4.5 Avaliação da lipólise *in vivo*

A lipólise *in vivo* foi realizada pela administração de 1mg.kg$^{-1}$ (i.p) do agonista do receptor adrenérgico β3, o CL-316,243 hidrato (C5976; Sigma-Aldrich®, Seelze, Alemanha) (QIAO et al., 2011). Coletou-se o sangue pela veia caudal antes da administração do composto e 15 e 30 minutos após a administração. Em seguida, o sangue foi centrifugado (4000 rpm por 10 minutos) e o plasma foi utilizado para mensuração dos NEFA Através de *kit* comercial (Wako® Chemicals GmbH, Alemnha). A concentração de NEFA foi normalizada pelo índice de adiposidade visceral.

## 3.5 Avaliações *in vitro*

Para determinar os efeitos do ATZ, CAT e $H_2O_2$ em tecido adiposo isolado e sem influências sistêmicas de camundongos controle, realizou-se a lipólise *in vitro* no tecido adiposo branco, coletado após a eutanásia. O tecido foi incubado em meio de cultura (DMEM, Gibco® 11880; Darmstadt, Alemanha), posto em banho (37 °C; 95% de $O_2$; 5% de $CO_2$) durante 30 minutos e, em seguida, foi realizada a primeira coleta no tempo basal. Imediatamente após esse procedimento, adicionou-se um agonista do receptor adrenérgico β3, o CL-316243 a 0,1mM, de forma isolada, e em combinação com ATZ (50 mmmol.L$^{-1}$), CAT e $H_2O_2$, separadamente. A partir de então, os NEFA foram mensurados no meio de cultura em 0, 90 e 180 minutos e posteriormente normalizados pela quantidade de gordura usada no procedimento (QIAO et al., 2011).

## 3.6 Avaliações *ex vivo*

Serão apresentados todos os procedimentos realizados no animal após o sacrifício.

### 3.6.1 Eutanásia, avaliação do peso tecidual e Índice de adiposidade visceral

Após 12h de jejum, anestesiaram-se os animais (100 mg.kg$^{-1}$ de cetamina, 10 mg.kg$^{-1}$ xilazina, ip). Posteriormente, os animais foram sacrificados por exsanguinação, através da punção sanguínea via ventrículo direito. Após este procedimento, aspirou-se o sangue diretamente em seringas previamente umedecidas com 0,2 M de etileno-diamina tetra-acético (EDTA). Na sequência, o sangue foi centrifugado (4000 rpm a 4°C, durante 10 minutos), e armazenado a -80ºC, até as análises bioquímicas serem realizadas. Após os procedimentos acima descritos, os animais foram perfundidos com solução salina heparinizada e os tecidos adiposos (epididimal, perirenal, mesentérico e marrom), o fígado e todos os demais órgãos

dos animais foram removidos, pesados e armazenados a -80°C até análise posterior (NUNES-SOUZA et al. 2016). Especificamente no fígado, realizaram-se dois cortes longitudinais no lóbulo direito (aproximadamente 5 mm de espessura) para a análise histopatológica, sendo as demais frações destinadas às análises metabólicas. Uma fração do tecido adiposo epididimal foi destinada à análise histológica, uma outra para as análises redox e uma terceira fração para a lipólise *in vitro* (NUNES-SOUZA et al. 2016).

O índice de tecido adiposo branco visceral (TAB) e o peso relativo (%) tecidual foram calculados usando as equações 02 e 03, abaixo:

Equação 2:

$$\text{Índice de TAB (\%)} = [(\text{gordura epididimal (g)} + \text{gordura perirenal (g)}) / (\text{peso corporal (g)}) * 100]$$

Equação 03:

$$\text{Peso Relativo (\%)} = [(\text{peso do tecido (g)} / \text{peso corporal (g)}) * 100]$$

3.6.2 Análise do perfil lipídico plasmático/hepático e níveis de leptina no plasma

Colesterol total (ColT), triglicerídeos (TG) (ensaio colorimétrico enzimático; Labtest®, Brasil) e NEFA (Wako Chemicals GmbH®, Alemanha) foram avaliados no plasma/fígado usando "kits" comerciais de acordo com as instruções do fabricante e realizados em microplaca. Os níveis de insulina e leptina plasmática foram mensurados por imunoensaios tipo "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay" sanduíche (ELISA) (Millipore®, Schwalbach, Alemanha). A medição foi realizada num leitor de microplacas (Thermo Scientific®, Software 2.4 Espectro Multiskan®, Finlândia).

3.6.3 Avaliação do estado redox no tecido adiposo epididimal

Serão descritos os experimentos realizados para a avaliação do estado redox no tecido adiposo epididimal.

3.6.3.1 Extração de proteínas do tecido adiposo epididimal para avaliação da atividade da CAT, SOD e peroxidação lipídica

De cada animal, um fragmento de tecido adiposo epididimal foi homogeneizado num tampão de lise RIPA (pH 7,5; Cell Signaling® Technology, Beverly, MA), contendo: 50

mmol.$L^{-1}$ Tris-HCl; 0,1 mmol.$L^{-1}$ EDTA (“ethylenediamine tetraacetic acid” ou ácido etilenodiamino tetraacético); 0,1 mmol.$L^{-1}$ de EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid ou ácido etilenoglicol tetraacético); 0,1% de SDS (sodium dodecyl sulfate ou Dodecil sulfato de sódio); 0,1% de desoxicolato; 1% de IGEPAL (“octylphenoxypolyethoxyethanol”) e uma diluição de 1000 vezes de um coquetel inibidor de protease e fosfatase (Roche®, Mannheim, Alemanha). Centrifugou-se a suspensão a 14.000 rpm, durante 20 min. Na sequência, coletou-se o sobrenadante e este foi armazenado a -80 °C, para subsequente medição da atividade da SOD, da CAT e da peroxidação lipídica. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 3.6.3.1.1 Atividade da CAT

A atividade da CAT no tecido adiposo epididimal foi medida de acordo com Xu e colaboradores (XU et al., 2008).

O método baseia-se na medição indireta da atividade da enzima, a qual reage com o metanol na presença do peróxido de hidrogênio e forma como cromógeno o formaldeído, detectado espectrofotometricamente a 540nm num leitor de microplacas (Thermo Scientific®, Software 2.4 Espectro Multiskan®, Finlândia). A atividade da CAT foi expressa em unidades internacionais (UI) por proteína (mg.m$L^{-1}$) do tecido epididimal (BRADFORD, 1976).

#### 3.6.3.1.2 Peroxidação lipídica

Mensurou-se este parâmetro pela avaliação dos níveis das Substâncias Ácidas Reativas ao Tiobarbitúrico (TBARS), um reputado marcador para peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Sucintamente, procedeu-se a sua quantificação de acordo com um método adaptado de Ohkawa e colaboradores (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Para tanto, 100 µL de homogenato de tecido adiposo epididimal foram misturados com 10 µL de hidroxitolueno butilado (concentração final = 1 mmol.$L^{-1}$) e 1000 µL de ácido tiobarbitúrico (1,3%, Sigma®). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 60 minutos, e em seguida, incubadas num banho de gelo (~ 4°C), durante 10 minutos, para o término da reação. Consecutivamente, centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm, por 15 minutos, a 4ºC. A partir do sobrenadante, registrou-se a absorbância a 532 nm e 600 nm, em um leitor para microplacas (Thermo Scientific®, Software 2.4 Multiskan Spectrum®, Finlândia). Os dados foram normalizados por concentração total de proteína e expressa como nmol.$L^{-1}$/proteina, mg.$dL^{-1}$.

3.6.3.1.3 Atividade da SOD

Mensurou-se este parâmetro através de *kit* comercial (Sigma®), em microplacas (Nunc®, Dinamarca), seguindo instruções do fabricante. Para tanto, foi utilizado sal hidrosolúvel, o WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4- nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio, sal monosódico), que se reduz à $O_2^{\bullet-}$, formando o cromógeno "formazana". A reação é proporcional à atividade da enzima xantina oxidase (XO), que é inibida pela SOD. Os dados foram normalizados pela concentração de proteínas (BRADFORD, 1976).

3.6.3.2 Concentrações de Peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) no plasma

A quantificação dos níveis de $H_2O_2$ no plasma foi realizada por fluorescência (Tecan 200 Infinite, Mannedorf, Suíça), utilizando kit comercial (Ultra Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit, Invitrogen, Paisley, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Na presença de peroxidase (peroxidase horseredish, HRP), o reagente Amplex Red estequiometricamente reage com o $H_2O_2$ para formar um produto de oxidação fluorescente vermelho, resorufina. Uma curva padrão de $H_2O_2$ foi preparada com concentrações variando entre 0 a 10 $\mu$L. Em seguida, 50 $\mu$L dos pontos de curva das soluções-padrão ou das amostras foram plaqueadas em duplicatas, com a adição de 50 $\mu$L da solução do reagente / HRP para iniciar a reação. Por fim, a placa (Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) foi incubada em temperatura ambiente, durante 120 minutos, protegida da luz e, na sequência, realizou-se a leitura em comprimentos de onda de 530 e 590 nm (DA FONSECA et al., 2014).

3.6.4 Avaliação histológica no tecido adiposo epididimal

As técnicas de processamento e coloração foram realizadas no Laboratório de histologia (ICBS – UFAL), de acordo com procedimentos previamente descritos (NUNES-SOUZA et al., 2016). Para isso, pequenos fragmentos de tecido adiposo epididimal foram fixados em 4% de formalina tamponada 10%, até 16 horas. Na sequência, colocadas em parafina e seccionadas no padrão de 10 μm. Posteriormente, procedeu-se a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), para determinação do diâmetro do adipócito. As secções foram observadas no microscópio óptico de luz (Olympus BX51 attached DP70 Digital Camera System (Tóquio, Japão) com aumento final de 20x (50μm). As fotomicrografias foram retiradas e analisadas de cada animal. O diâmetro do adipócito foi quantificado usando o

"software" "ImageJ" *image processing software* (NIH, Bethesda, MD, USA) (COLLINS, 2007). Os resultados foram apresentados em imagens representativas por grupo de animal.

### 3.6.5 Extração lipídica hepática

A extração lipídica hepática foi realizada pela técnica descrita anteriormente (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957) que se baseia na separação dos lipídios totais hepáticos pela utilização de solventes com diferentes polaridades. Para isso, aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi triturado em solução de clorofórmio:metanol ($CHCl_3$:MeOH; proporção 2:1), centrifugado, após a adição de 400 µL de MeOH, a 3000 rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante reservado em tubo previamente pesado. Neste, por sua vez, foram acrescentados 800 µL de $CHCl_3$ e 640 µL de cloreto de sódio (NaCl 0,73%) e, novamente, foi realizada uma centrifugação nas condições descritas, sendo a fase inferior lavada por três vezes com 600 µL de solução de Folch, composta por 3% de $CHCl_3$, 48% de MeOH, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%. Os tubos foram mantidos em estufa 37°C, "overnight", para obtenção dos extratos lipídicos. Estes foram quantificados gravimetricamente em balança analítica e normalizados pelo peso tecidual hepático total. Os extratos lipídicos obtidos foram ressuspensos e homogeneizados em 500 µL de isopropanol até obtenção de uma suspensão, a qual foi utilizada para a mensuração de triglicerídeos, colesterol e NEFA, seguindo a metodologia descrita anteriormente no item 3.6.2.

### 3.6.6 Avaliação da expressão gênica de proteínas glicolíticas e gliconeogênicas no tecido hepático

Com o intuito de se avaliar os genes relacionados às vias gliconeogênicas/glicolíticas, investigou-se a expressão gênica de proteínas hepáticas (tabela 1), através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Assim, o RNA total foi isolado a partir do tecido hepático usando Trizol® (Reagente Trizol®, Darmstadt, Alemanha) e quantificado na absorbância de 260nm. O valor da relação 260/280nm para cada amostra ficou dentro das exigências vigentes para a biologia molecular, ou seja, em torno de 1,8. Em seguida foi realizada a transcrição reversa do cDNA a partir de 1 µg de RNA extraído (Reverse Transcriptase – Invitrogen®) e, na sequência, amplificado usando o GoTaq qPCR Master MIx (Promega®; Mannheim, Alemanha) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real time qPCR) (ABI1267900HT Real-Time PCR System-Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha). O RNA total foi quantificado como um

valor relativo em comparação com uma referência interna, o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os valores quantitativos para a expressão do RNA foram obtidos pelo parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A tabela 1 mostra a sequência dos "primers" utilizados.

**Tabela 1 – Sequência de "primers" utilizados para o PCR quantitativo em tempo real (amplicons entre 100 - 150 pb).**

| "Primers" | Sequência "Forward" e "Reverse" (5' – 3') |
|---|---|
| **Ap2**[1] | **F:** GTTGAGGATGGTGTCCACGTAC<br>**R:** GTATGCCATGTGTGACCGGAG |
| **CD36**[2] | **F:** CATGTAGGAAATGTGGAAGCGA<br>**R:** TCTTCCAGCCAATGCCTTTG |
| **GAPDH**[3] | **F:** CCATCACCATCTTCCAGGAG<br>**R:** GTGGTTCACACCCATCACAA |
| **G6Pase**[4] | **F:** GACTGTGGGCATCAATCTCC<br>**R:** ACAGGTGACAGGGAACTGCT |
| **GCK**[5] | **F:** GGATGCAGAAGGAGATGGAC<br>**R:** GCATCACCCTGAAGTTGGTT |
| **PCK1**[6] | **F:** CCGTCTGGCTAAGGAGGAA<br>**R:** GGGCATCAAACTTCATCCAG |
| **PCK2**[7] | **F:** GGCTGGAAAGTGGAGTGTGT<br>**R:** AGTACACACCGCCATCACTG |
| **RI**[8] | **F:** CCACCAATACGTCATTCACAAC<br>**R:** GGGCAGATGTCACAGAATCAA |

**1- Ap2**: proteína do adipócito 2; **2- CD36**: translocase de ácidos graxos; **3- GAPDH**: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; **4- G6Pase**: Glicose 6-fosfatase; **5- GCK**: glicoquinase; **6- PCK1 e 7- PCK2**: fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 e 2; **8- RI**: receptor para insulina.
Fonte: Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 3.7 Análise estatística

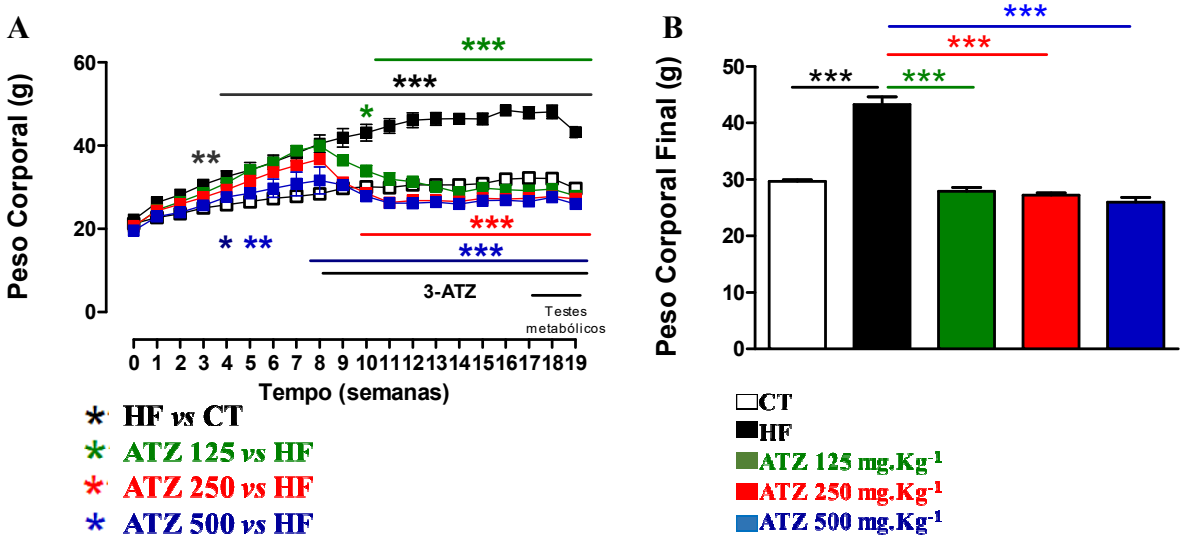
Os resultados foram expressos como média ± EPM, nas análises que consideram duas variáveis, utilizou-se ANOVA duas vias, seguida pelo teste de *Bonferroni* e para as análises considerando apenas uma variável, utilizou-se a ANOVA uma via. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p< 0,05$. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel® (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA).

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Peso Corporal ao longo do tratamento e peso corporal final

Após a terceira semana de indução, observou-se um aumento significativo (p<0,001) no peso dos camundongos alimentados com dieta HF, comparados ao grupo CT (Figura 7A). Interessantemente, observa-se na mesma figura, que a administração do ATZ na dieta diminuiu significativamente o peso corporal em todos os grupos submetidos à intervenção com este inibidor da catalase comparados ao HF, e isso se manteve até o final do tratamento. Estes dados demonstram a efetividade deste agente em todas as doses administradas ($ATZ_{125}$, $ATZ_{250}$, $ATZ_{500}$, p<0,001). Somados a esses achados, salienta-se que o peso corporal final permaneceu aumentado no grupo HF comparado ao CT (p<0,001, Figura 7B), o que demonstra efetividade da dieta ao longo da série experimental. Além disso, observa-se também, na mesma figura, que todos os grupos tratados mantiveram a redução obtida no peso, ao final do tratamento, comparados ao grupo HF (p<0,001), exibindo pesos finais semelhantes aos do CT. Este fato caracteriza a efetividade do ATZ na diminuição e, principalmente, na manutenção do novo peso.

**Figura 7 - Efeitos induzidos pelo ATZ no peso corporal ao longo do tratamento e peso corporal final de animais com SMet**

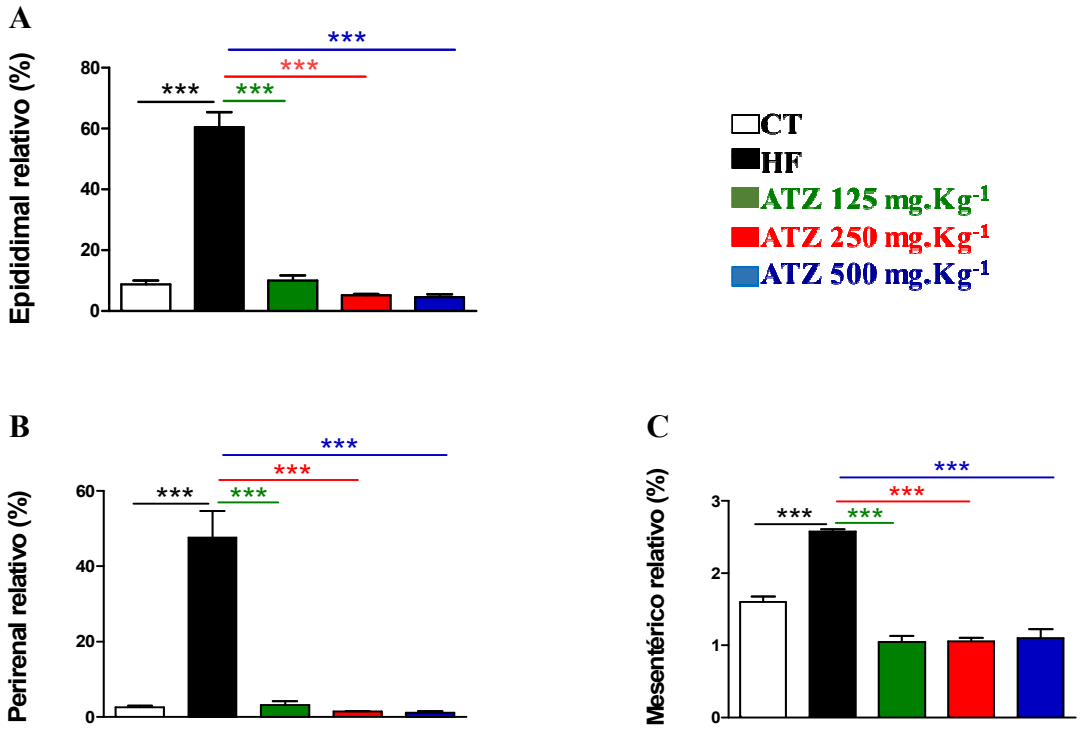



**A**: Acompanhamento de peso corporal (g) dos grupos experimentais (CT, HF e HF+ATZdieta) durante 20 semanas, desde o período de exposição dietética à intervenção com ATZ. **B**: Peso corporal (g) dos animais ao final do tratamento experimental. O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*; os gráficos em barras representam a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda**: CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.2 Peso relativo tecidual

No que corresponde à distribuição de gordura corporal, a dieta HF proporcionou aumento significativo no tecido adiposo epididimal, perirenal e mesentérico (Figuras 8 A, B e C, respectivamente), no grupo HF comparado ao CT ($p<0,001$), ao passo que o uso do ATZ foi efetivo na diminuição desses parâmetros, em todas as doses estudadas, quando comparadas ao grupo HF ($p<0,001$), observando-se medidas semelhantes ao CT (Figuras 8 A, B e C).

**Figura 8 - Efeitos induzidos pelo ATZ no peso relativo tecidual de animais com SMet.**



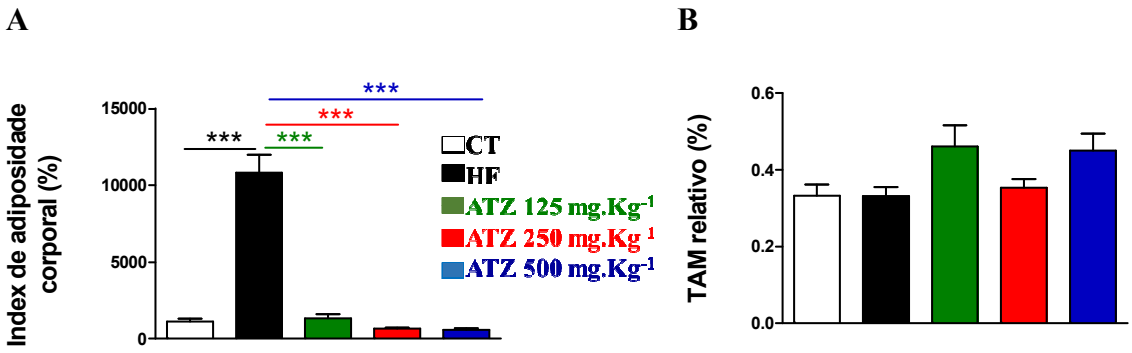

**A**: Peso relativo (%) de tecido adiposo epididimal. **B**: Peso relativo (%) de tecido adiposo perirenal. **C**: Peso relativo (%) de tecido adiposo mesentérico. Os gráficos em barras representam a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda**: CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.3 Índice de adiposidade visceral e peso relativo do tecido adiposo marrom

O índice de adiposidade aumentou significativamente no grupo HF comparado ao controle (p<0,001), e o tratamento com o ATZ foi efetivo em promover diminuição deste parâmetro, em todas as doses utilizadas (p<0,001, Figura 9A).

Por outro lado, não ocorreram mudanças significativas no peso relativo do tecido adiposo marrom entre os grupos estudados, ressaltando-se que este se manteve semelhante ao CT, mesmo após a dieta HF (Figura 9B).

**Figura 9 - Índice de adiposidade visceral e tecido adiposo marrom**

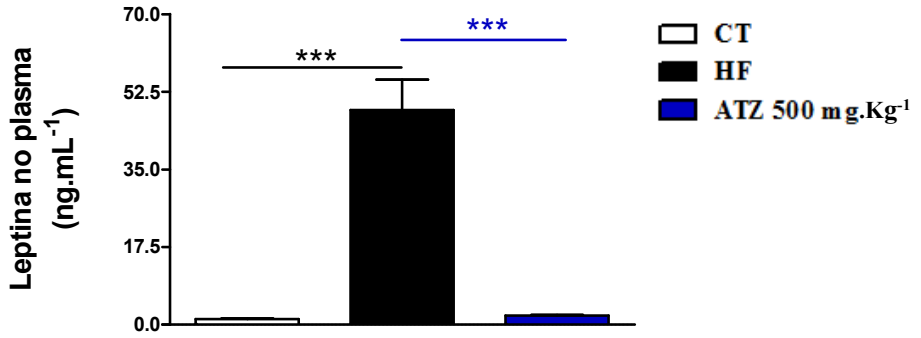



**A:** Índex (%) de tecido adiposo branco. **B**: Peso relativo (%) de tecido adiposo marrom. Os gráficos em barras representam a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda**: CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.4 Níveis de leptina no plasma

A concentração de leptina plasmática aumentou significativamente no grupo HF (p<0,001), em aproximadamente 8 vezes comparado ao grupo controle (Figura 10), suscitando uma possível resistência à leptina ligada à obesidade. Interessantemente, o tratamento com o ATZ na dose de 500 mg.Kg$^{-1}$ foi efetivo em restaurar os níveis basais desse hormônio peptídico (p<0,001) a valores próximos ao grupo controle, corroborando a efetividade desse composto na redução geral de gordura corporal (Figuras 8 A-C e 9A), uma vez que os níveis de leptina estão diretamente ligados a quantidade de tecido adiposo.

**Figura 10 - Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão proteica plasmática de leptina em animais com SMet**

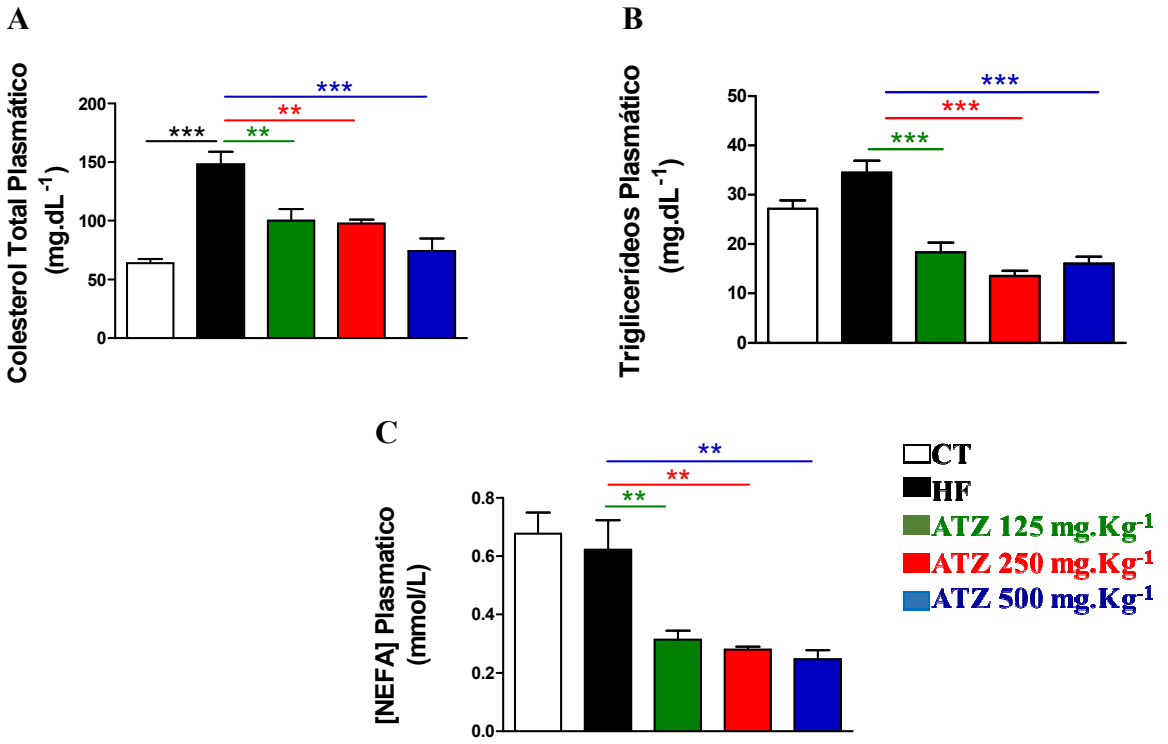



Expressão proteica plasmática (ng.mL$^{-1}$) de leptina dos grupos experimentais ao final do tratamento. Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via), *** P <0,001. n=5-6. **Legenda**: CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.5 Perfil lipídico plasmático

Com a ingestão diária da dieta HF, outras mudanças incrementais fenotípicas para a SMet surgiram. Observa-se um aumento significativo do colesterol total plasmático (Figura 11A) no grupo HF comparado ao CT ($p<0,001$). O tempo de indução da SMet e a manutenção da dieta HF não foram suficientes para se observar alterações significativas de triglicerídeos plasmáticos (Figura 11B) e NEFAs plasmáticos (Figura 11C), grupo HF *vs* CT. Ainda assim, o uso do ATZ foi efetivo em reduzir, de forma significativa, todos esses parâmetros: colesterol total ($ATZ_{125,\ 250}$, $p<0,01$; $ATZ_{500,}$ $p<0,001$), triglicerídeos ($ATZ_{125,\ 250,\ 500}$, $p<0,001$) e NEFAs plasmáticos ($ATZ_{125,\ 250,\ 500}$, $p<0,01$), (Figuras 11A – C), quando comparados ao grupo HF.

**Figura 11 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil lipídico plasmático de animais com SMet.**

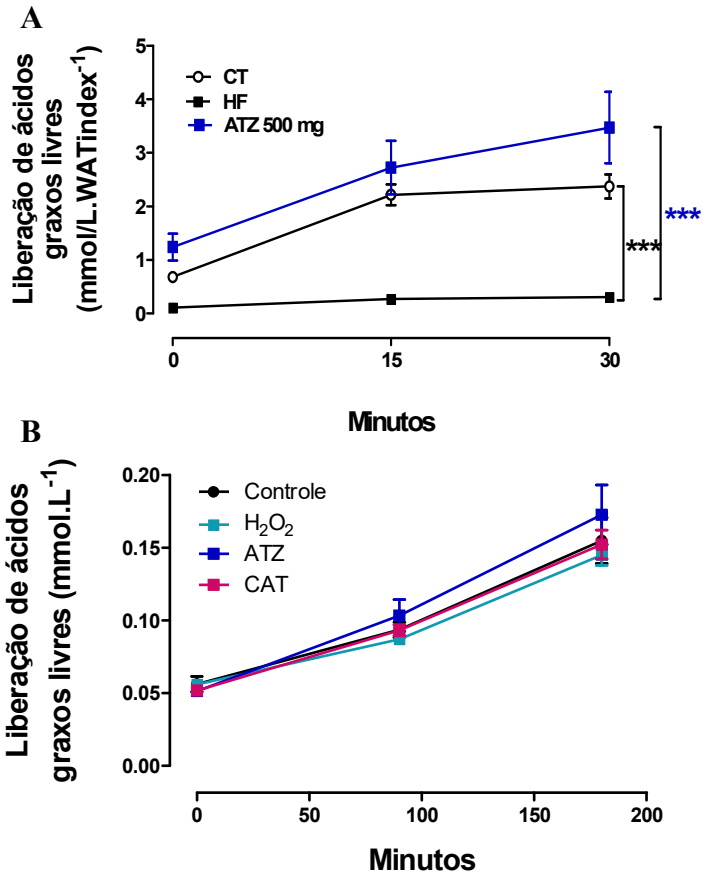



**A**: Concentração de colesterol total no plasma (mg.dL-1). **B:** Concentração de triglicerídeos no plasma (mg.dL-1). **C:** Concentração de ácidos graxos não esterificados – NEFA no plasma (mmol/L). Todas as avalições foram realizadas ao final do tratamento experimental. Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via); ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana. Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.6 Lipólise *in vivo* e *in vitro*

Os efeitos centrais e o mecanismo de ação induzidos pelo ATZ na melhora do perfil lipídico necessitam ser observados e comparados *in vivo* e *in vitro*, em busca de respostas *in loco* que registrem em tempo real qualquer alteração existente. Durante a avaliação da lipólise *in vivo,* a administração de agonista β3-adrenérgico ao grupo tratado com ATZ (dose de 500mg), promoveu liberação de NEFA em proporção semelhante ao grupo CT, sendo significativamente maior quando comparado ao grupo HF (p<0,001, Figura 12A). O que suscita uma ação permissiva do ATZ à via β3-adrenérgica. O mesmo não ocorreu na lipólise *in vitro,* em que, a quantidade de NEFAs liberados do tecido adiposo isolado de camundongos controle, por estimulação do agonista lipolítico, foi semelhante no tecido incubado separadamente com PBS, $H_2O_2$, ATZ e CAT, ressaltando-se que todos apresentaram liberação crescente ao longo do tempo de estimulação (Figura 12B).

**Figura 12 - Efeito induzido pelo ATZ sobre a lipólise *in vivo* e *in vitro*, em animais com SMet.**



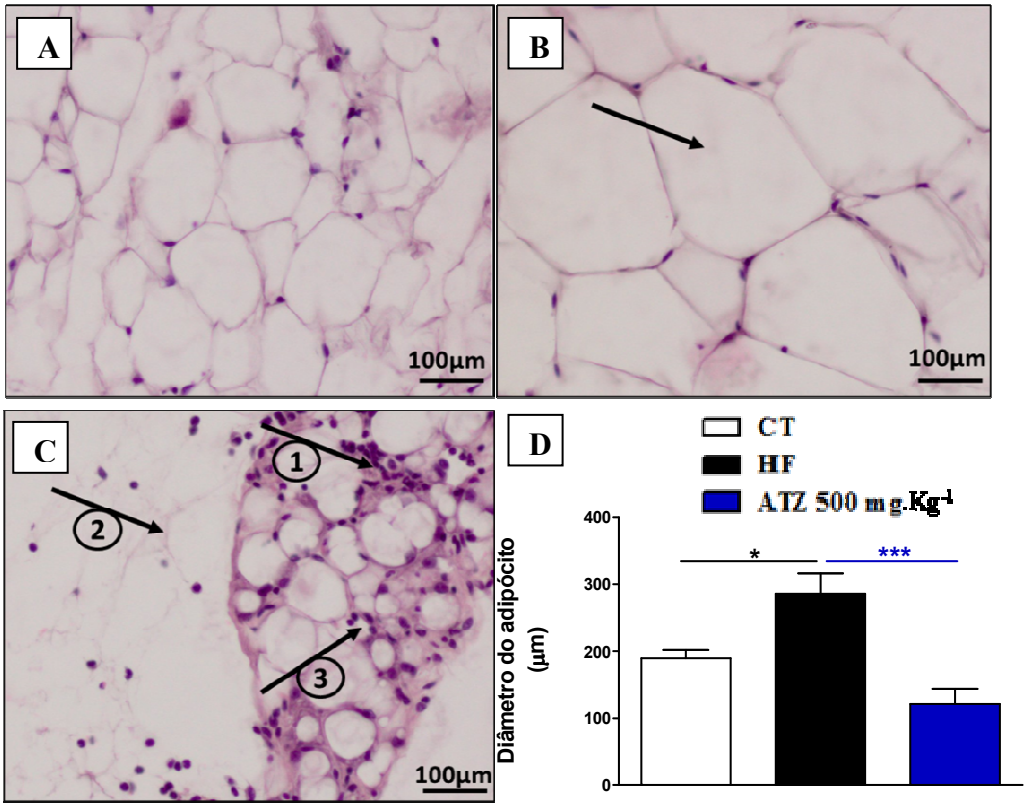

**A**: Liberação de ácidos graxos livres durante a lipólise *in vivo* (mmol/L.Index de adiposidade$^{-1}$). **B**: Liberação de ácidos graxos livres durante a lipólise *in vitro* (mmol.L-1). O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*. O gráfico em barras representa a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana. Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.7 Avaliação histológica

Somam-se a esses achados, a avaliação histológica dos adipócitos através de fotomicrografias (cortes de 100 µm), realizadas no tecido adiposo epididimal, que permitem melhor identificar os efeitos teciduais do ATZ. Na comparação do corte histológico do CT (Figura 13A) com o HF (Figura 13B), observaram-se nestes, grandes acúmulos de triglicerídeos, evidenciados pela presença de células com maior diâmetro (CT *vs* HF, p<0,05). O uso do ATZ (500mg) proporcionou redução significativa do tamanho dos adipócitos, comparados ao grupo HF (p<0,001), mostrando-se efetivo na readaptação celular (Figura 13C). Estes achados podem ser melhor observados a partir da indicação das setas que apontam vários núcleos dispersos sem membrana celular (seta 1); membrana celular mais fina (seta 2) e adipócito com um menor acúmulo de triglicerídeos ($ATZ_{500}$ *vs* HF, Figura 13C).

Estes achados são confirmados na Figura 13D que mostra, em micrômetros (µm), as diferenças no diâmetro celular (HF > CT, p<0,05; $ATZ_{500}$ < HF, p<0,001).

**Figura 13 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o diâmetro dos adipócitos e aspectos histológicos do tecido adiposo, em animais com SMet.**




**A, B e C**: Fotomicrografias (100 µm) de corte histológico do tecido adiposo epididimal mostrando adipócitos corados com hematoxilina-eosina (HE); a seta em (D) aponta adipócitos com acúmulos de triglicerídeos (maior diâmetro celular) no grupo HF, comparados ao grupo controle (C); as setas em (E): apontam vários núcleos dispersos sem membrana celular (seta 1); membrana celular mais fina (seta 2); adipócito com um menor acúmulo de triglicerídeos (vs grupo HF), confirmado pelo menor diâmetro da célula. **D**: diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo branco (µm) após o tratamento experimental, na dose de 500 $mg.kg^{-1}$. O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*. O gráfico em barras representa a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.8 Equilíbrio redox no tecido adiposo epididimal

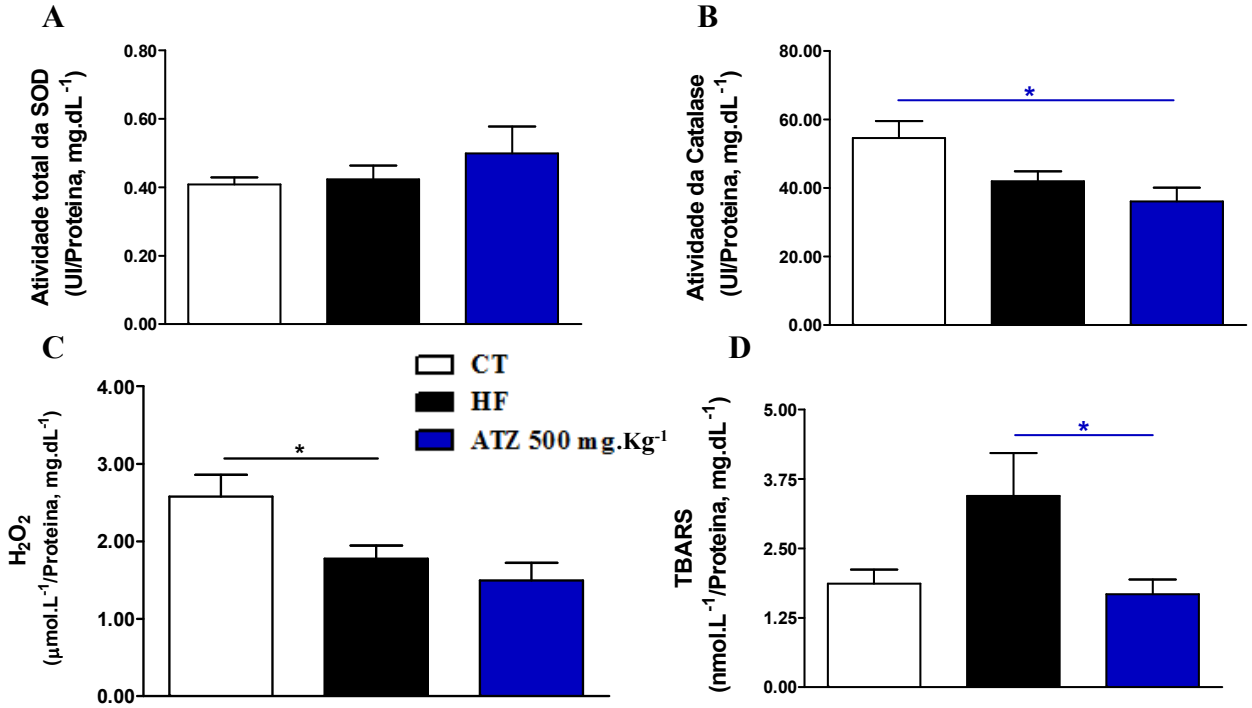
Uma vez que o efeito do ATZ foi bem eficaz em diminuir o acúmulo de gordura em diversos tecidos adiposos, como o perirenal, mesentérico e edipidimal, tornou-se interessante avaliar o equilíbrio redox no TAB, elegendo-se para tanto, este último.

A avaliação do equilíbrio REDOX no tecido adiposo epididimal permite observar o *status* oxidativo final após o *set* experimental, destacando-se quatro marcadores importantes:

as enzimas SOD e CAT, assim como, os níveis de TBARS e $H_2O_2$. A atividade da SOD foi semelhante entre os grupos, o que evidencia que mesmo após todo o período de ingestão de dieta hipercalórica, a atividade desta enzima não foi modificada (Figura 14A). Semelhantemente, não foram observadas diferenças na atividade da CAT entre os grupos HF e CT, porém, o ATZ ofertado na dose de 500mg promoveu redução significativa da atividade dessa enzima quando comparado ao grupo CT (P<0,05; Figura 14B). Observou-se uma diminuição significativa dos níveis de $H_2O_2$ no grupo HF (Figura 14C), sem modificações com o uso do ATZ em comparação aos demais grupos.

Além das enzimas antioxidantes, a mensuração do TBARS faz-se importante, visto ser um marcador de peroxidação lipídica, e, portanto, uma excelente estratégia no tocante a avaliação do equilíbrio REDOX. Nesse sentido, observou-se que o ATZ, na dose de 500mg, promoveu diminuição dos níveis de TBARS comparado ao CT (P<0,05), apesar de não ter ocorrido diferença estatística entre o CT e HF (Figura 14D).

**Figura 14 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o equilíbrio REDOX no tecido adiposo epididimal de animais com SMet**




**A**: Atividade total da superóxido dismutase (SOD) (UI/proteína,mg.dL-1) no tecido adiposo epididimal. **B**: Atividade total da catalase (CAT) (UI/proteína,mg.dL-1) no tecido adiposo epididimal. **C**: Níveis de peróxido de hidrogênio no tecido adiposo epididimal (µmol.$L^{-1}$ /protein, mg.mL-1). **D**: Peroxidação lipídica no tecido adiposo epididimal (nmol.$L^{-1}$/protein, mg.$mL^{-1}$) pela quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Todas as avalições foram realizadas ao final do tratamento experimental. Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via); *P<0,05. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

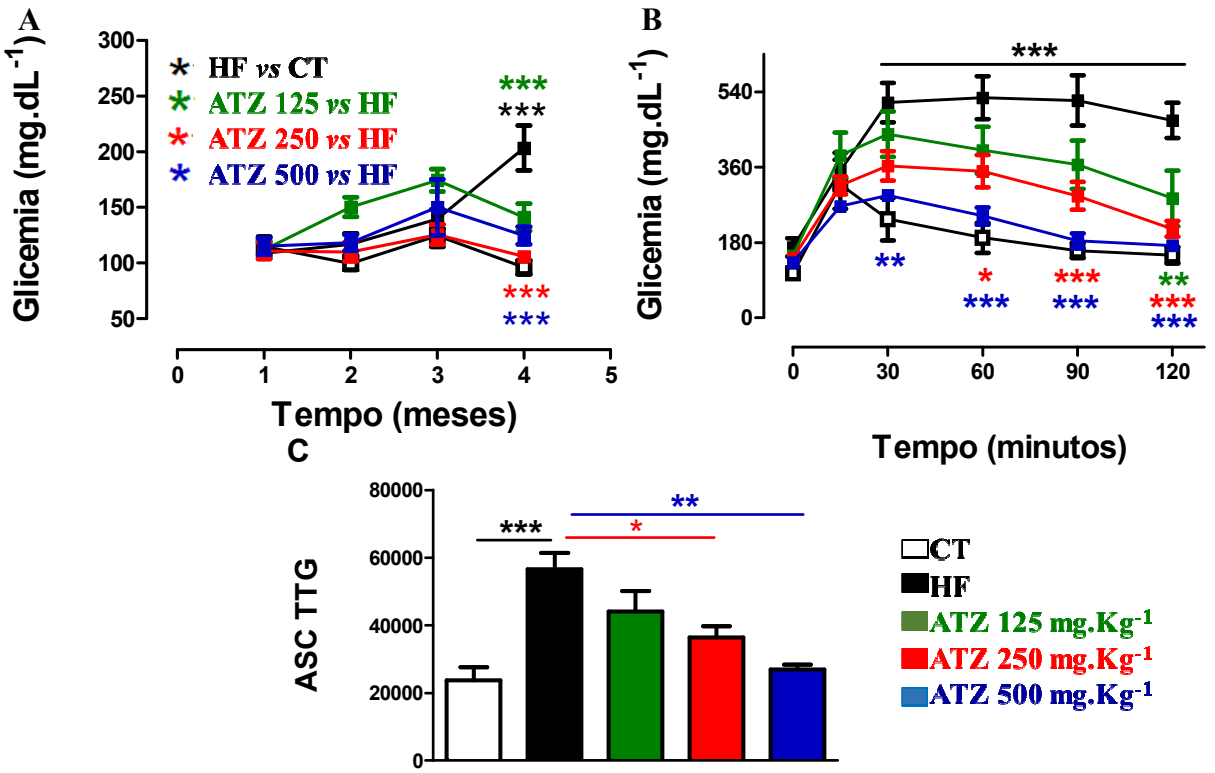
## 4.9 Perfil Glicêmico

Na avaliação da glicemia de jejum (Figura 15A), observa-se que não ocorreu variação entre os grupos até meados do quarto mês de dieta (14 semanas). Nesse período, três grupos experimentais já haviam começado o tratamento com ATZ há 6 semanas. No final do quarto mês de intervenção (16 semanas), os grupos tratados apresentaram diminuição significativa da glicemia comparados ao grupo HF ($ATZ_{125, 250, 500}$ *vs* HF $p<0,001$). O grupo HF manteve a glicemia elevada até o final do *set* experimental. Os resultados demonstram que, independente da dose, o ATZ preveniu, após um período de 8 semanas nesse set experimental, o aumento da glicemia de jejum induzido por dieta HF.

No teste de tolerância à glicose (Figuras 15B), todos os grupos apresentaram picos glicêmicos, decorrentes da infusão de glicose. Após os 30 minutos iniciais, conforme esperado, o grupo CT apresentou decaimento da curva glicêmica, de forma significativamente maior em relação ao HF (CT *vs* HF, $p<0,001$) e assim se manteve até o final do teste, aos 120 minutos. O mesmo ocorreu com o grupo $ATZ_{500}$, o qual iniciou o decaimento aos 30' ($ATZ_{500}$ *vs* HF, $p<0,01$), afastando-se ainda mais do HF aos 60', 90' e 120' minutos ($ATZ_{500}$ *vs* HF, $p<0,001$). O grupo $ATZ_{250}$ apresentou redução significativa a partir dos 60' ($ATZ_{250}$ *vs* HF, $p<0,05$), aumentando o decaimento aos 90 e 120 minutos finais ($ATZ_{250}$ *vs* HF, $p<0,001$). O grupo com a menor dose de ATZ (125 mg) apresentou decaimento significativo apenas aos 120 minutos ($ATZ_{125}$ *vs* HF, $p<0,01$).

Na avaliação da área sob a curva do TTG (Figura 15C), o grupo HF apresentou aumento significativo comparado ao CT ($p<0,001$) e os grupos $ATZ_{250}$ ($p<0,05$) e $ATZ_{500}$ ($p<0,01$) uma diminuição significativa comparados ao HF. O teste de tolerância à glicose corrobora a efetividade do ATZ na melhora do perfil glicêmico, nas doses de 500 e 250 mg.

**Figura 15 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil glicêmico em animais com SMet**




**A**: Acompanhamento da glicemia de jejum (mg.dL$^{-1}$) durante todo o intervalo experimental. **B**: Níveis glicêmicos durante o teste de tolerância à glicose, ao final do tratamento experimental (mg.dL$^{-1}$). **C**: Área sob a curva do teste tolerância à glicose ao final do tratamento experimental. O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*; os gráficos em barras representam a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.10 Perfil insulinêmico

Na sequência experimental, fez-se necessário avaliar a insulina, sua responsividade na manutenção da glicemia e a relação do perfil glicêmico e lipídico. No que corresponde ao teste de resistência à insulina (Figura 16A), foi observado que logo nos primeiros 15 minutos do teste, o grupo CT respondeu à infusão do hormônio, apresentando decaimento glicêmico satisfatório (CT *vs* HF, p<0,001) que se manteve até o final do teste. O grupo $ATZ_{250}$, neste mesmo intervalo, apresentou diminuição significativa a partir de 30 minutos ($ATZ_{250}$ *vs* HF, p<0,05) e isso se manteve durante todo os outros intervalos do teste. Não foram observadas mudanças estatisticamente significativas para as demais doses. O grupo HF não apresentou decaimento da curva glicêmica durante o período de avaliação do teste, mantendo-se significativamente maior que o CT (<0,001). Na avaliação da área sob a curva do TRI (Figura

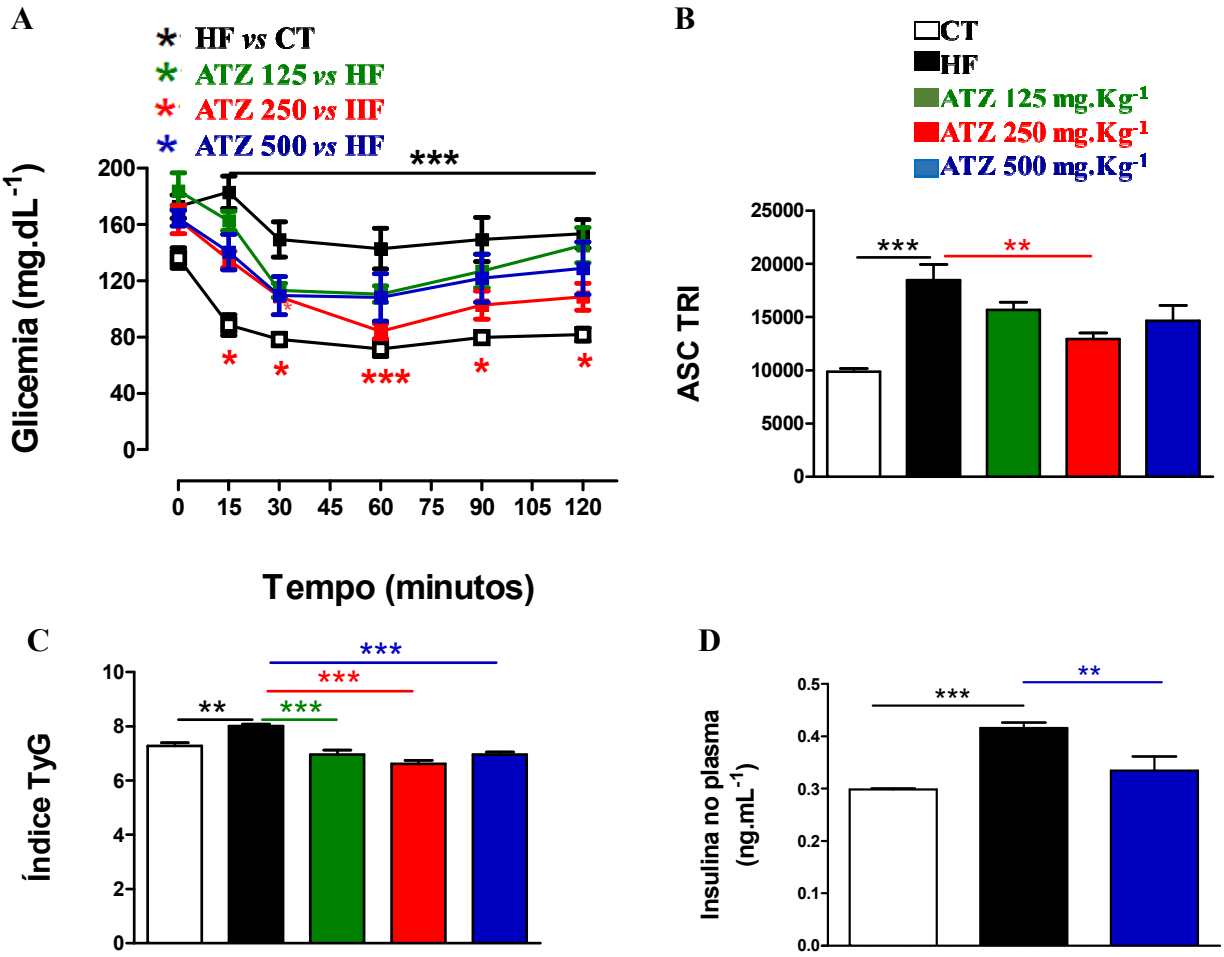
16B), o grupo HF apresentou um aumento significativo comparado ao CT ($p<0,001$) e apenas o grupo $ATZ_{250}$ ($p<0,01$) apresentou diminuição significativa quando comparado ao HF.

A avalição do TyG (Figura 16C) demonstra aumento significativo no grupo HF, comparado ao CT ($p<0,01$), o que corrobora com a intolerância à glicose (Figura 15B) e a resistência à insulina (Figura 16A) apresentadas pelo grupo HF. Ademais, o uso do ATZ, nas três doses utilizadas no presente estudo, mostrou-se efetivo em promover a diminuição desse parâmetro

A concentração plasmática de insulina (Figura 16D) aumentou significativamente no grupo HF comparado ao CT ($p<0,001$) e, após tratamento com ATZ na dose de 500mg, esta foi reduzida a níveis semelhantes ao controle ($ATZ_{500}$ *vs* HF, $p<0,01$). Apesar do grupo $ATZ_{500}$ não ter se mostrado responsivo no decaimento da glicemia durante o TRI, mostrou-se eficaz na redução dos níveis plasmáticos de insulina, o que provavelmente está associado a maior eficiência na captação da glicose, conforme demonstrado no TTG, em que a dose de 500mg de ATZ mostrou ser uma das mais efetivas.

O ATZ se mostrou eficaz em aumentar a sensibilidade à insulina na dose intermediária.

**Figura 16 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil insulinêmico de animais com SMet**



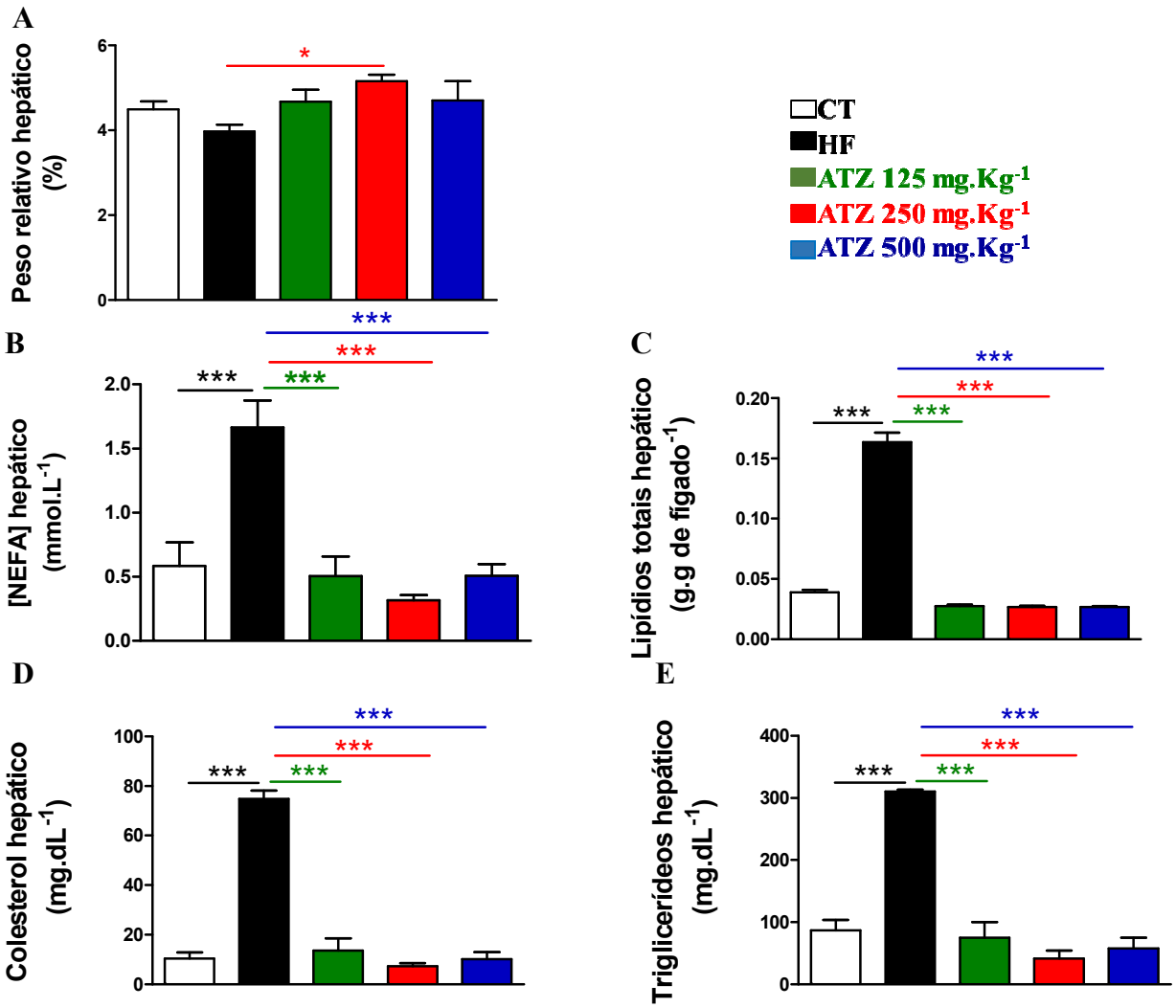

**A**: Níveis glicêmicos durante o teste de resistência à insulina (mg.dL-1), ao final do tratamento experimental. **B**: Área sob a curva do teste de resistência à insulina, ao final do tratamento experimental. **C**: Representa o índice triglicerídeos-glicose (TyG index). **D**: Níveis de insulina no plasma (ng/mL). O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*; os gráficos em barras representam a média ± EPM, ANOVA (uma via); * p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HFD – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.11 Perfil lipídico hepático

Associado a avaliação do perfil lipídico plasmático, fez-se importante observar também, o perfil lipídico hepático, no que corresponde: ao peso relativo tecidual do fígado, os níveis de NEFA, lipídios totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos. Em se tratando do peso relativo hepático, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos HF e CT (Figura 17A). Porém, o uso do ATZ na dose de 250mg promoveu aumento desse parâmetro, comparado ao grupo HF (p<0,05). Interessantemente, os níveis de NEFA, lipídios totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos (Figuras 17B - E) se mostraram

significativamente aumentados no grupo HF, comparados ao CT (p<0,001) e seguiram o mesmo padrão decrementar, em todos os grupos tratados com ATZ, comparados ao HF (p<0,001). A partir dos resultados apresentados, suscita-se que o ATZ, independente da dose, promoveu diminuição do fluxo de lipídios entre o plasma e o fígado, sem existir aparente prejuízos funcionais, conforme demonstrado pelo perfil glicêmico e TyG, outrora avaliados.

**Figura 17 - Efeito induzido pelo ATZ sobre o perfil lipídico hepático de animais com SMet**




**A**: Peso relativo (%) do tecido hepático, ao final do tratamento experimental. **B**: Níveis de ácidos graxos não esterificados - NEFA (mmol/L). **C**: Lipídios totais hepáticos (g/g de fígado). **D**: Níveis de colesterol hepático (mg/dL). **E**: Níveis de triglicerídeos hepático (mg/dL). Todas as avalições foram realizadas ao final do tratamento experimental. Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via); * P <0,05; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

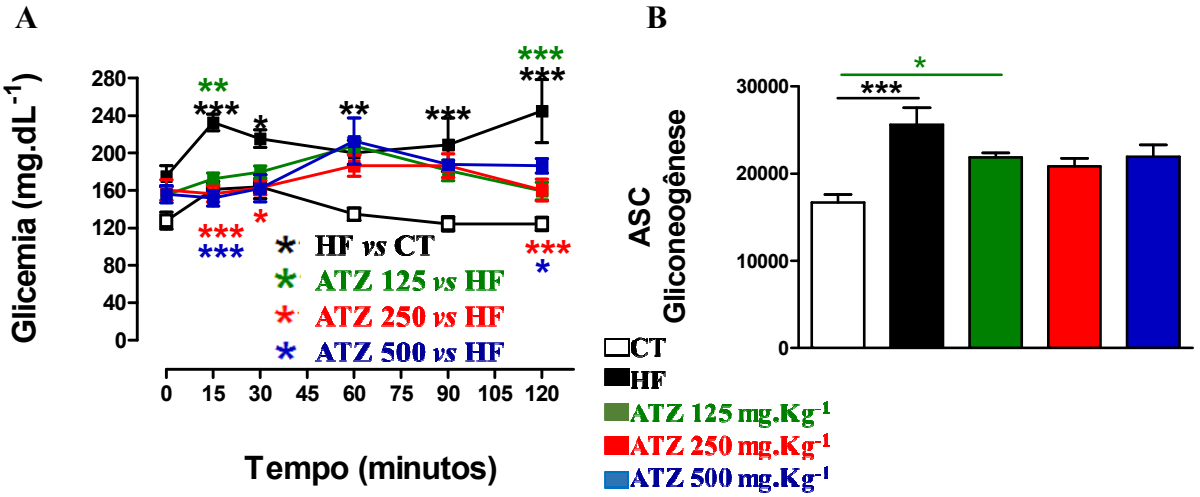
## 4.12 Gliconeogênese induzida pelo aumento do piruvato

A figura 18A mostra o acompanhamemto da curva glicêmica após a infusão do piruvato, uma via alternativa para a formação da glicose (gliconeogênese). Foi observado, um aumento significativo da glicemia no grupo HF em relação ao controle (p<0,001) que se manteve durante todo o teste, sem apresentar decaimento.

Os grupos tratados com ATZ apresentaram diminuição da curva glicêmica já nos primeiros 15 minutos do teste: ($ATZ_{125}$ *vs* HF, p<0,01; $ATZ_{250,500}$ *vs* HF, p<0,001), aos 30': ($ATZ_{250}$ *vs* HF, p<0,05) e aos 120' finais: ($ATZ_{125}$ *vs* HF, p<0,001; $ATZ_{250}$ *vs* HF, p<0,001; $ATZ_{500}$ *vs* HF, p<0,05), retornando a linha de base, de forma semelhante ao grupo controle (Figura 18A).

Na avaliação da área sob a curva da gliconeogênese (Figura 18B), observa-se que o grupo HF apresenta um aumento significativo comparado ao CT (p<0,001). O mesmo ocorreu com o grupo $ATZ_{125}$ (p<0,05).

**Figura 18 - Efeito induzido pelo ATZ sobre a gliconeogênese em animais com SMet**




**A:** Níveis glicêmicos durante o teste do piruvato (gliconeogênese) (mg.dL-1), ao final do tratamento experimental. **B**: área sob a curva da gliconeogênese, ao final do tratamento experimental. O gráfico ponto a ponto representa a média ± EPM, ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*; O gráfico de barra representa a média ± EPM. ANOVA (uma via); * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.13 Expressão gênica em vias metabólicas glicêmicas no tecido hepático

No intuito de analisar a dinâmica funcional hepática no controle do fluxo glicêmico e lipídico, fez-se importante avaliar a expressão gênica das principais proteínas/enzimas relacionadas às vias gliconeogênicas, glicolíticas e lipídica.

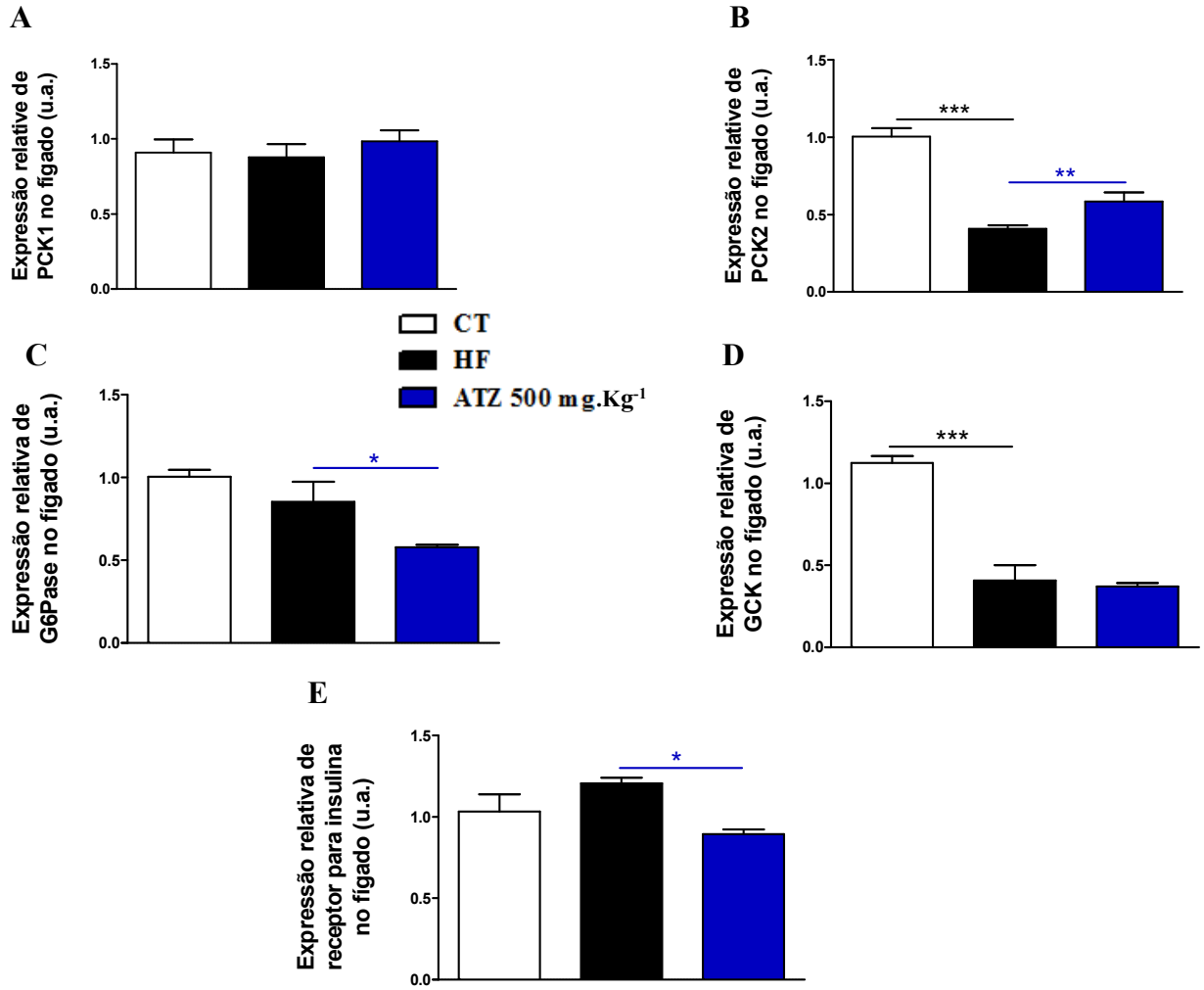
Dessa forma, além do teste de gliconeogênese, a expressão gênica de três proteínas envolvidas nesta via foi determinada. A expressão para a PcK1 (citosólica), não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 19A), mostrando-se aparentemente em níveis normais. Por outro lado, sua análoga, a PcK2 (mitocondrial), mostrou-se significativamente reduzida (Figura 19B) no grupo HF, comparada ao CT ($p<0,001$), o que indica menor utilização dessa via para a formação de glicose. O ATZ, na dose de 500mg, aumentou significativamente a expressão de PcK2 (Figura 19B), comparado ao grupo HF ($p<0,01$). Não houve diferença significativa na expressão gênica de G6Pase (Figura 19C) entre os grupos HF e CT. Contudo, o tratamento com $ATZ_{500}$ promoveu redução nesta expressão, comparado ao grupo HF ($p<0,05$).

Na via glicolítica, observou-se a expressão da enzima GCK (Figura 19D), a qual se apresentou diminuída no grupo HF, comparada ao controle ($p<0,001$) e não houve alterações estatisticamente significativas com o uso do $ATZ_{500}$.

A expressão proteica para o receptor para a insulina também foi avaliada, mostrando-se semelhante entre os grupos HF e CT. O uso do $ATZ_{500}$ predispôs redução significativa comparado ao HF ($p<0,05$), (Figura 19E).

Os dados sugerem que o uso do ATZ pode contra regular a expressão gênica de receptores insulínicos e da G6Pase, enzima evolvida no processo final de liberação da glicose para o sangue, em condição de alta ingestão calórica. O que pode ser corroborado pela melhora na ação periférica da insulina, diminuição da glicemia de jejum e aumento da sensibilidade aos TRI e TTG, outrora apresentados.

**Figura 19 - Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão gênica em vias metabólicas glicêmicas no tecido hepático de animais com SMet.**



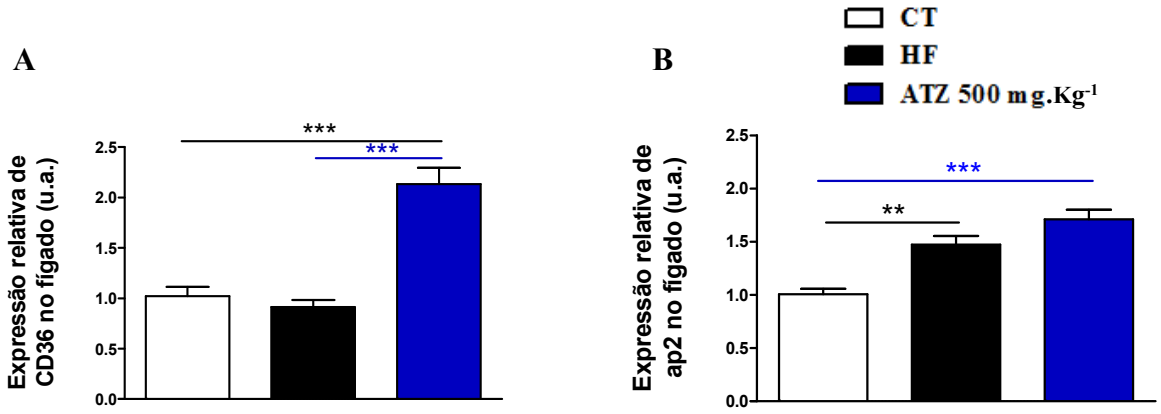

**A**: Expressão gênica relativa de PCK1 no fígado. **B**: Expressão gênica relativa de PCK2 no fígado. **C**: Expressão gênica relativa de glicose-6-fosfatase no fígado. **D**: Expressão gênica relativa de glicoquinase no fígado. **E**: Expressão gênica relativa do receptor para a insulina no fígado**.** Todas as avalições foram realizadas ao final do tratamento experimental. Os gráficos representam a média ± EPM. ANOVA (uma via); * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

## 4.14 Expressão gênica em vias metabólicas lipídicas no tecido hepático

Em se tratando da via lipídica, avaliaram-se duas proteínas transportadoras, CD36 e aP2, ambas necessárias ao transporte de lipídios ao fígado.

A expressão gênica de CD36 se mostrou semelhante entre os grupos HF e CT. Contudo, a oferta de ATZ em 500mg aumentou significativamente essa expressão ($ATZ_{500}$ *vs* HF ou CT, $p<0,001$) (Figura 20A). Associado a isso, o grupo HF apresentou aumento da expressão de aP2, comparado ao controle ($p<0,01$) e o tratamento com 500mg de ATZ auxiliou nesse aumento ($p<0,001$) (Figura 20B).

**Figura 20 - Efeito induzido pelo ATZ sobre a expressão gênica em vias metabólicas lipídicas no tecido hepático de animais com SMet**




**A**: Expressão gênica relativa de CD36 no fígado. **B:** Expressão gênica relativa de ap2 no fígado. Todas as avalições foram realizadas ao final do tratamento experimental. Os gráficos de barras representam a média ± EPM. ANOVA (uma via); * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. n=5-6. **Legenda:** CT – grupo controle alimentado com dieta "chow" – ração Nuvilab®; HF – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura; ATZdoses – grupo com síndrome metabólica induzida por dieta com alto teor de gordura e tratado com ATZ a partir da 8ª semana.
Fonte: Autor, 2016 - Dados da pesquisa.

# 5 DISCUSSÃO

Os resultados demonstram, pela primeira vez, que o tratamento (em 3 diferentes doses, 125mg, 250mg e 500mg) com o ATZ, um inibidor irreversível da atividade da CAT, diminuiu a obesidade induzida por dieta HF em camundongos com SMet, promovendo a redução do peso corporal, menor deposição de gordura visceral, e também melhora do perfil glicêmico, da dislipidemia e controle do estresse oxidativo. O que faz despontar este clássico inibidor, como um potente indutor lipolítico, apresentando efeitos terapêuticos antiobesidade.

Ressalta-se, no presente estudo, que a obesidade e o perfil fenotípico da SMet foram induzidos por dieta, mimetizando a doença que ocorre em humanos, resultando em dislipidemia, hiperleptinemia, resistência à insulina e alterações glicêmicas (YIANNIKOURIS et al., 2012). Conforme descrito nos resultados, ao final da intervenção experimental, os animais HF sem tratamento, permaneceram com o peso significativamente maior comparado ao grupo controle, salientando-se a efetividade da dieta ofertada. Além disso, os animais tratados com ATZ, nas três doses utilizadas, mantiveram a redução obtida no peso, de forma significativa, até o final do experimento. Isso demonstra que o peso corporal, visto como um dos principais fatores de risco para o aparecimento da obesidade, SMet e outros agravos associados, foi responsivo a todas as doses de ATZ ofertadas na dieta, promovendo-se redução significativa na distribuição de gordura tecidual (Figuras 7, 8 e 9).

Nesse contexto, um dos hormônios mais importantes no controle do armazenamento metabólico é a leptina (TARTAGLIA et al., 1995). Esta possui um papel-chave na regulação da ingestão calórica e do gasto energético, sendo diretamente correlacionada com a massa de tecido adiposo, principalmente, o TAB (FREDERICH et al., 1995; MAFFEI et al., 1995).

Interessantemente, o tratamento com ATZ (500mg.$Kg^{-1}$) promoveu diminuição dos níveis desse hormônio peptídico (Figura 10), a valores semelhantes aos do grupo controle; o que sugere que estas melhoras estejam principalmente associadas à efetividade do ATZ na redução geral de gordura corporal e, consequentemente, do peso corporal e do índice de adiposidade.

Dessa forma, no presente estudo, os níveis de leptina diminuíram significativamente, na mesma proporção que diminuíra a quantidade de gordura epididimal, perirenal e mesentérica, observado já a partir da dose mínima do ATZ (125 mg.$Kg^{-1}$). Isso corrobora com a redução efetiva no índice de adiposidade, considerado mais preciso do que o peso corporal na avaliação de risco cardiovascular (Figuras 8, 9 e 10).

A leptina circulante também pode ser produzida pelo TAM em menores quantidades (DISILVESTRO et al., 2016), passando a apresentar maior atividade celular, expressividade secretória e aumento celular, principalmente em situações de redução expressiva de TAB. Em trabalhos do grupo utilizando ATZ, a quantidade desse tecido aumentou após o período de tratamento (dados não publicados). Contudo, nessa série experimental, não foi observada diferença no peso relativo do TAM em nenhum dos grupos experimentais, mantendo-se níveis semelhantes ao CT (BOON; VAN MARKEN LICHTENBELT, 2016; NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2010).

Notavelmente, a eficiência do ATZ na redução do índice de adiposidade e do peso corporal pode ter sido em decorrência da grande liberação de NEFAs, conforme evidenciado por lipólise *in vivo*, associada à significante melhora nos níveis plasmáticos e hepáticos de: lipídeos totais, colesterol, triglicerídeos e do próprio NEFA, principalmente na dose de 500mg.$Kg^{-1}$, o que destaca a ação marcadamente lipolítica do ATZ.

Portanto, no presente estudo, mostrou-se pela primeira vez, que o tratamento com o ATZ se mostra eficaz em melhorar o "status" hipercolesterolêmico que está diretamente associado à obesidade e aumento de gordura visceral na SMet, o que provavelmente contribuiu para a melhoria da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (SHI; BURN, 2004) nos grupos tratados nas três diferentes doses.

Em se tratando de lipídios, afirma-se que um conjunto de elementos interage mutuamente, promovendo um controle estrito entre lipogênese e lipólise (YOUNG; ZECHNER, 2013), mediado pela ação das enzimas lipoproteína lipase no plasma e HSL no TAB, permitindo um importante equilíbrio metabólico da deposição de lipídios hepáticos, da absorção intestinal de lipídios e da circulação lipídica no plasma, conforme demonstrado por Karavia e colaboradores (KARAVIA et al., 2012). Todas essas interações garantem o fluxo adequado de lipídios, principalmente entre o plasma, o fígado e o tecido adiposo.

Neste sentido, o tratamento com ATZ foi eficaz em reduzir os níveis de lipídios circulantes, principalmente colesterol, triglicerídeos e NEFA, não só na via plasmática, mas também no tecido hepático (Figuras 11 e 17). Além disso, o diâmetro dos adipócitos diminuiu significativamente com o uso do ATZ (500mg.$Kg^{-1}$), conforme observado no corte histológico da região epididimal, resultando em modificações morfológicas benéficas e funcionais (Figura 13).

Intrigantemente, tendo em vista a eficiente redução de gordura, acreditava-se, inicialmente, que havia ocorrido eliminação nas fezes, associada a uma baixa absorção

intestinal. No entanto, não foi observada nenhuma diferença estatística na análise do perfil lipídico, nesta via de excreção, durante todo o curso experimental (dados não mostrados).

Somado aos achados, fez-se importante investigar a relação do ATZ com a via β3 adrenérgica, uma vez que esta representa a principal via lipolítica. Isso foi realizado, no presente estudo, através da lipólise *in vivo* e *in vitro*, utilizando como agente lipolítico, o agonista do receptor β3, CL-316,243. Na lipólise *in vivo*, observou-se aumento significativo da liberação de NEFAs nos animais tratados com 500mg de ATZ (ver resultados). Por outro lado, na avaliação da lipólise *in vitro*, o mesmo não foi observado. Para isto, o agonista foi colocado em cultura celular com CAT, $H_2O_2$ e ATZ, separadamente, com coletas das amostras em diferentes tempos e observou-se que a lipólise, nestas condições, não foi influenciada por nenhum dos três agentes supracitados (Figura 12). Neste caso, leva-se a entender que a atuação do ATZ no aumento da lipólise, pode ser decorrente de uma ação indireta sob a via β3 adrenérgica ou de outras vias.

Nesse sentido, Ruiz-Ojeda e colaboradores (2016) investigaram a ação do $H_2O_2$ na regulação do metabolismo, incubando adipócitos humanos diferenciados com 10 mM de ATZ durante 24 horas, e observaram diminuição da atividade da CAT, GPx e peroxiredoxina com consequente aumento de $H_2O_2$, o que resultou em redução na captação de glicose basal, menor expressão de transportadores para a glicose do tipo GLUT4 (expresso em tecido adiposo) e diminuição da lipólise (RUIZ-OJEDA et al., 2016). Esses dados diferem do observado no presente estudo, uma vez que na lipólise *in vitro* não foram observadas diferenças entre os grupos, e na *in vivo,* ocorreu expressiva liberação de NEFA, o que provavelmente mediou todas as demais mudanças fisiológicas benéficas induzidas no animal com SMet.

Ressalta-se que a concentração (10 mM) de incubação do ATZ no estudo acima descrito, pode ter sido responsável por tais efeitos *in vitro*. No nosso estudo, incubou-se o TAB com 50 mM. Além disso, essa condição não mimetiza a dinâmica integrativa celular do organismo vivo, demonstrando a importância das investigações *in vivo.* Ademais, tendo-se em vista que os resultados dos testes de resistência à insulina, tolerância à glicose e piruvato mostraram uma eficiente captação de glicose nos grupos tratados, independente da dose de ATZ, fica claro que os receptores para a insulina estavam sendo expressos e ativos, e por isso, ocorreu a melhora efetiva na sensibilidade à insulina, o que mostra resultados opostos ao estudo de Ruiz-Ojeda e colaboradores (RUIZ-OJEDA et al., 2016).

Por outro lado, observou-se no presente estudo, uma diminuição da expressão de receptores para a insulina, sem, contudo, existir comprometimento na ação desse hormônio,

nem aumento da glicemia basal, haja vista as melhorias supracitadas. Diante do exposto, pensou-se em vias secundárias de utilização celular da glicose que pudessem corroborar os achados descritos acima mediados pelo ATZ que estivessem, ao mesmo tempo, ligados com o transporte do NEFA. Visto que, conforme relatado, nas fezes, não se observou diferenças nos níveis deste marcador entre os grupos experimentais.

Diante do exposto, faz-se importante destacar que o TAM, apesar de sua responsividade na geração de energia e controle de temperatura, não possui mitocôndrias que apresentem o complexo enzimático necessários para a formação do ATP. Dessa maneira, para produzir calor, estas organelas do TAM devem utilizar a energia liberada pela oxidação metabólica dos ácidos graxos (PORTER et al., 2015). Neste contexto, Lichtenbelt e colaboradores (2009), no intuito de avaliar a atividade do TAM estudaram 24 homens magros saudáveis e com sobrepeso, submetidos a diferentes temperaturas (16 a 22 °C), cuja atividade do TAM foi determinada através da tomografia por emissão de pósitrons com 18F-fluorodesoxiglucose (utilizada como radiotraçador a deoxi-2-D glicose marcada com fluor-18) (PET-CT). Foi observado que o aumento na atividade do TAM era proporcional à absorção de glicose registrada pelo PET (LICHTENBELT et al., 2009).

Os resultados acima mencionados esclarecem um importante mecanismo central, pois, uma vez que as mitocôndrias do TAM não produzem ATP, este necessita da glicose para produzi-lo e, portanto, realiza a captação da glicose através de transportadores do tipo GLUT4, o que pode representar uma futura linha de investigação. Por sua vez, o ATP é essencial para a oxidação contínua dos ácidos graxos (beta-oxidação) nas proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs), o que representa um mecanismo primário para a termogênese (LETTIERI BARBATO et al., 2015). Logo, provavelmente, os NEFAs provenientes da lipólise no TAB, mediado pelo tratamento com ATZ, podem estar sendo absorvidos pelo TAM para participar no processo de termogênese, o que representa uma ótima via metabólica final, o que será alvo de investigações futuras realizadas pelo grupo.

Lichtenbelt e colaboradores também mostraram que o índice de massa corporal, bem como o percentual de gordura corporal, apresentou correlações negativas significativas com o TAM, enquanto a taxa metabólica basal apresentou uma correlação positiva (LICHTENBELT et al., 2009). Corroborando com esses achados, no presente estudo, os animais apresentaram diminuição de peso corporal após o tratamento com o ATZ, mas não foram observadas mudanças no peso relativo do TAM, apesar de provavelmente ter existido aumento da captação de NEFA e glicose por este órgão.

Estes achados, em conjunto, podem ter se refletido na diminuição dos níveis de insulina e do índice Tyg observados após tratamento com o ATZ (Figura 16), e, possivelmente, seja a via pela qual o ATZ melhora os parâmetros glicêmicos, destacando o ATZ como uma importante via para o controle da glicemia, da resistência à insulina e da obesidade.

A intensa lipólise, associada à possível migração dos lipídios para o TAM, pode justificar a diminuição do diâmetro dos adipócitos diretamente mediada pelo ATZ, provavelmente determinado por um aumento da via da HSL, uma vez que esta é expressa tanto no TAB quanto no TAM, sendo responsável por clivar os triglicerídeos armazenados, convertendo-os em ácidos graxos livres, fornecendo energia e calor para os tecidos periféricos (LARGE et al., 1999). O aumento da HSL poderia ser explicado pela redução dos níveis de insulina, visto que esta é responsável por inibir sua ativação.

Associado a isso, faz-se importante destacar que os resultados obtidos pelo ATZ podem ser devidos à ação do $H_2O_2$ no TAB, (CUI et al., 2014). Esta ação, provavelmente, pode ser devido ao aumento da formação de $H_2O_2$ neste tecido e, consequentemente, a ação dessa molécula em evitar a obesidade induzida pela dieta. O ATZ atua através de uma ligação específica com o centro da CAT, aumentando a biodisponibilidade de $H_2O_2$ endógeno (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970; HARRISON, K. A.; MURPHY, 1995; MARGOLIASH; NOVOGRODSKY, 1958). Frisa-se que o grau de inibição induzida pelo ATZ sobre a enzima, correlaciona-se bem com a quantidade de $H_2O_2$ gerado (BAYLIAK et al., 2008).

No presente estudo, ocorreu diminuição estatisticamente significativas nos níveis de atividade CAT no grupo tratado, comparado ao controle, contudo, a produção de $H_2O_2$ foi significativamente menor no grupo HF e se manteve-se reduzida no grupo tratado na dose de 500mg.$Kg^{-1}$ (Figura 14).

Nesse sentido, é provável que alterações na expressão gênica possa contribuir para regular os níveis de $H_2O_2$ de maneira específica para cada órgão. Nesta linha de pensamento, Loh e colaboradores (LOH et al., 2009) demonstraram que camundongos com deleção para GPx1 foram protegidos da RI induzida por dieta HF. Uma vez que a GPx converte o $H_2O_2$ em oxigênio e água, camundongos $Gpx1^{-/-}$ apresentaram aumento da disponibilidade do referido peróxido. Este efeito evidenciado foi devido à sinalização do fosfatidilinositol-3-quinase (AKT) induzida pela insulina e captação de glicose no músculo, sugerindo que os aumentos sutis na produção de $H_2O_2$ no músculo, entre outras EROs, pode ser responsável por evitar a indução dos efeitos fisiopatológicos induzidos pela dieta. Além disso, ressalta-se que, no presente estudo, houve significativa diminuição na produção do TBARS no TAB, mediado

pelo efeito inibitório do ATZ sobre esta, e manutenção da atividade da SOD, melhorando o estresse oxidativo induzido pela dieta HF neste órgão (Figura 14).

Associado à melhora no perfil glicêmico, lipídico e oxidativo, observou-se que a resistência à insulina foi diminuída após o tratamento com o ATZ, evidenciado pela diminuição do TyG (Figuras 15 e 16).

De acordo com Margoliash & Novogrodsky (MARGOLIASH; NOVOGRODSKY, 1958), o ATZ é um inibidor da atividade da CAT no fígado e nos rins, mas não sistemicamente. No presente estudo, a atividade da CAT se mostrou diminuída no TAB. Dessa forma, observa-se que o ATZ também age de forma específica na inibição da atividade da CAT neste tecido.

Diante do exposto, evidencia-se que esse composto químico desempenha um papel chave no controle do estresse oxidativo sistêmico induzido pela dieta rica em gordura, principalmente, na diminuição da peroxidação lipídica, conforme observado pela mensuração de TBARS, resultando em efeito protetor contra a oxidação de lipídios, uma vez que os produtos gerados no processo de peroxidação lipídica também atuam como agentes reativos e ocasionam dano celular, amplificando, assim, os efeitos de desequilíbrio redox (NIKI, 2014; OTANI, 2011).

A obesidade e a gordura visceral são importantes determinantes do estresse oxidativo sistêmico em humanos (BYRNE; TARGHER, 2014; DA FONSECA et al., 2014) e animais (NUNES-SOUZA et al., 2016). Além disso, este desequilíbrio no "status" redox está diretamente relacionado a outros componentes da SMet, entre os quais, hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina (DA FONSECA et al., 2014; OTANI, 2011). Todos esses fatores são observados no presente estudo. Assim, é plausível considerar que essas condições contribuem para o aumento dos níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo sistêmico no modelo animal para a SMet.

Neste cenário, além da avaliação do equilíbrio REDOX, faz-se importante avaliar também, a expressão gênica diretamente envolvida na regulação lipolítica e glicêmica, em órgãos centrais de regulação metabólica, como o fígado.

Nesse sentido, o CD36 é um conhecido receptor de lipídios e ácidos graxos, atuando em várias células e tecidos. Ouwens e colaboradores (2007) afirmam que o transporte de ácidos graxos pela CD36 pode ser prejudicado quando a resistência à insulina se faz presente, diminuindo a expressão destes no tecido cardíaco de ratos com SMet (OUWENS et al., 2007). Por outro lado, Geloen e colaboradores (2012) relataram que o uso de inibidores do CD36, utilizados em diferentes modelos de roedores, promoveram redução: da deposição de lipídios

nos vasos arteriais, do trânsito intestinal de ácidos graxos, da concentração de triglicerídeos e glicose plasmáticos; além de melhora: da sensibilidade à insulina, tolerância à glicose e redução da concentração de HbA1c no plasma (GELOEN et al., 2012).

No presente estudo, a expressão de CD36 aumentou no fígado (Figura 20), o que deveria indicar maior captação de ácidos graxos, porém os níveis plasmáticos e hepáticos de NEFA se mostraram significativamente reduzidos após o ATZ (Figuras 11 e 17). Dessa forma, esta molécula parece possuir uma atividade pleiotrópica em várias células e tecidos.

Garcia- Monzón e colaboradores investigaram níveis de CD36 citosólico em pacientes com DHGNA e cirrose crônica, observando-se que os níveis plasmáticos dessa molécula estavam significativamente maiores em pacientes com DHGNA de forma proporcional ao grau de lesão tecidual, tornando-se este um marcador independente para estes agravos hepáticos (GARCIA-MONZON et al., 2014). Enquanto que no grupo com cirrose, os níveis de CD36 não se mostraram alterados, mesmo quando a esteatose se fez presente. Além disso, o CD36 presente nos macrófagos pode induzir a formação de células espumosas via LDL-oxidada, além de promover aumento dos níveis de glicose, resistência à insulina, diminuição do HDL e aumento dos ácidos graxos livres, e estes em conjunto, podem estar presentes na condição clínica do diabetes mellitus (GAUTAM et al., 2011), síndrome metabólica, DGHNA e aterosclerose (BYRNE; TARGHER, 2014).

Somados aos achados supracitados, Li e colaboradores (2010), utilizando-se de um modelo murino *knockout* para CD36 ($CD36^{-/-}$), submetidos à injúria arterial, observaram menos produção de ERONS nestes animais comparados ao grupo controle, sugerindo que o CD36 pode contribuir para a formação de ERONS nas células musculares lisas vasculares (VSMCs), além de diminuir a ação de enzimas antioxidantes e predispor a um estado protrombótico, proinflamatório e aterogênico (LI et al., 2010). Por outro lado, estudo realizado por Pietka e colaboradores (2012), em células miocárdicas de camundongos *knockout,* no estado alimentado e em jejum de até 22 hs, mostrou-se que, nesta condição, ocorria dificuldade de recaptação de cálcio para as SERCAs, associado à alteração na atividade da fosfolambana, comprometendo-se, assim, a homeostasia de cálcio no coração. Além disso, também verificou-se diminuição da captação de ácidos graxos para o coração, principalmente no período de jejum, uma vez o que o CD36 permite a mobilização destes, das VLDLs e triglicerídeos, o que pode comprometer a atividade cardíaca, principalmente em situações de estresse (PIETKA et al., 2012).

Associado a isto, o CD36 presente nos adipócitos são potentes indutores de lipólise e a gordura mobilizada pode ser transportada para o tecido hepático e muscular; quando inibidos, observa-se reduzida liberação de ácidos graxos (ZHOU et al., 2012).

Salienta-se que o transporte de ácido graxos de cadeia longa ao fígado promovido pelo CD36 pode induzir o aparecimento de DHGNA e/ou contribuir para sua progressão. Nesse sentido, Wang e colaboradores (2014) observaram, em camundongos com esteatose, que o uso da rapamicina, conhecido agente imunossupressor, foi eficaz em promover diminuição da esteatose hepática, cujo principal mecanismo de controle se deu através da diminuição da translação hepática eficiente do CD36 à membrana, afetando a expressão proteica desta molécula, muito embora, a expressão do seu RNAm permaneceu inalterada (WANG et al., 2014).

No presente estudo, a expressão do RNAm para o CD36 se mostrou aumentada pós tratamento com o ATZ. Contudo, não foi avaliada a expressão proteica deste. Além disso, lipídios totais, colesterol, triglicerídeos e NEFA diminuíram significativamente neste órgão, não parecendo estar propenso à esteatose, quando tratado com ATZ.

Dessa forma, observa-se que o CD36 corresponde a uma importante molécula transportadora de ácidos graxos em diversos tipos celulares, incluindo as hepáticas e frequentemente está associado a doenças como esteatose, havendo divergências se o papel exercido por este é como indutor desta condição patológica ou apenas um marcador.

Wilson e colaboradores (2016) estudaram dois modelos de esteatose hepática, um genético (hepatocyte-specific deletion of Janus kinase 2 (JAK2L), que proporciona aumento de ácidos graxos livres, da expressão de CD36 no fígado e a quantidade de gordura hepática; e outro modelo induzido por dieta HF. No modelo genético foi produzido um duplo *knockout*, com deleção para CD36, o que resultou diminuição significativa no armazenamento de diacilgliceróis, triglicerídeos e colesterol, melhorando a esteatose. O mesmo aconteceu com o grupo induzido por dieta com deleção do CD36, além de reduzir os marcadores inflamatórios hepáticos e plasmáticos, melhorou-se também a sensibilidade à insulina (WILSON et al., 2016). Dessa forma, o que se observa é que o CD36 aumenta a captação de ácido graxos para o fígado em situações de altas concentração de ácidos graxos livres, e nesse caso, a inibição dessa molécula pode trazer resultados benéficos em quadros de DHGNA e/ou SMet.

Assim, isso pode explicar o aumento da expressão gênica para essa molécula no presente estudo, pois pode ter sido decorrente da diminuição abrupta da receptação de lipídios para o fígado induzida pelo ATZ e, como efeito rebote, na tentativa de aumentar a captação de

NEFA e regular sua concentração, responde com uma super expressão. Ademais, pode estar havendo captação de gordura por outros órgãos, a exemplo, do TAM.

Outra importante proteína transportadora de ácidos graxos é aP2 (“adipocyte Protein 2”) presente nos adipócitos, fazendo parte do conjunto de adipocinas por estes secretadas. A aP2 ou FABP4 induz gliconeogênese e liberação de glicose pelo fígado, possuindo ação reguladora. Contudo, na obesidade, o aumento da secreção de aP2, diretamente proporcional ao número de adipócitos, pode determinar a presença de hiperglicemia; e quando já instalado o quadro de resistência à insulina, poderá facilitar a progressão para o DM2 (CAO et al., 2013).

Nesse sentido, Burak e colaboradores (2015) observaram o efeito do anticorpo monoclonal CA33, o qual possui grande afinidade pela aP2, e observaram diminuição da glicemia de jejum, melhora da sensibilidade à insulina, diminuição de gordura e da esteatose em camundongos obesos (BURAK et al., 2015). Nessa mesma linha de raciocínio, Queipo-Ortunõ e colaboradores (2012) avaliaram a expressão de aP2 no tecido adiposo, visceral e hepático de pacientes obesos, com resistência à insulina e com diferentes valores de IMC, sendo observada uma diminuição na expressão de aP2 inversamente associada à obesidade e à resistência à insulina. Contudo, os níveis no tecido hepático foram significativamente maiores em pacientes com resistência à insulina, comparados ao controle, o que pode significar que o tecido adiposo e o hepático interagem de diferentes maneiras em busca do equilíbrio energético-metabólico, em situações de resistência à insulina (QUEIPO-ORTUNO et al., 2012). Nesse sentido, o uso de inibidores para aP2 pode ser promissor no tratamento de alterações ligadas à obesidade, como a resistência à insulina.

No presente estudo foi observado aumento da expressão da aP2 após o tratamento com o ATZ, comparado ao grupo controle, sem diferenças significativas em relação ao grupo HF (Figura 20). Além disso, ocorreu melhora na sensibilidade à insulina, contribuindo para a diminuição dos níveis glicêmicos. Provavelmente, esse aumento conjunto da expressão gênica de CD36 e aP2 representa um mecanismo de contra regulação, especificamente uma “up” regulação, na tentativa de aumentar a tradução proteica dessas moléculas, decorrente da liberação lipolítica intensa promovida pelo ATZ, uma vez que estão comumente aumentadas na condição de obesidade. Esse fato pode ser corroborado pelo aumento da expressão gênica da HSL (Nelson-dias, dados não publicados), por ser alvo de ambas as moléculas.

Nessa mesma linha de pensamento, Ertunc e colaboradores (2015) mostraram que o bloqueio da atividade das enzimas lipase lipoprotéica e HSL diminui a liberação da aP2, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ERTUNC et al., 2015).

Em contraste, uma vez que vários estudos supracitados mostram existir aumentos na produção de glicose hepática, com consequente liberação para o plasma, acompanhado de resistência à insulina, diretamente proporcionais ao incremento da produção de CD36 e aP2, torna-se importante investigar vias envolvidas na regulação do metabolismo.

No que corresponde à regulação metabólica da glicose, observou-se uma redução significativa da glicemia de jejum, acompanhada de melhora da sensibilidade à insulina, conforme evidenciado no TTG e no TRI que apresentaram decaimentos semelhantes ao grupo controle, na utilização da dose de 500 mg de ATZ (Figuras 15 e 16). Além disso, observou-se que quando ofertado piruvato ao grupo HF não tratado, ocorre maior formação de glicose (gliconeogênese), conforme observado na figura 18.

Para confirmar a melhora no perfil glicêmico, realizou-se tanto a dosagem plasmática dos níveis de insulina, como a expressão gênica hepática para: glicoquinase, glicose-6-fosfatase, receptor para insulina, PcK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) e PcK2.

A expressão gênica dos receptores para a insulina foi significativamente diminuída após a utilização do ATZ (500 mg), comparado ao grupo HF, semelhante aos níveis plasmáticos de insulina, que decresceram significativamente comparados aos grupos controle e HF (Figura 19), o que mostra existir efetividade na produção deste hormônio, sem aparentemente ter sido afetado pela produção do CD36 ou aP2 mediado pelo tratamento; pelo contrário, o ATZ foi efetivo em diminuir a produção de insulina e restaurar a sensibilidade desta ao seu receptor.

Não foi observada alteração significativa na expressão gênica da glicoquinase quando comprada ao grupo HF, contudo, a expressão do RNAm para a glicose-6-fosfatase apresentou diminuições significativas comparadas ao grupo HF (Figura 19), isso reflete menor armazenamento de glicose na forma de glicogênio, mediado pela glicoquinase, como também menor liberação desse carboidrato pela glicose-6-fosfatase, o que não implicou prejuízos, uma vez que os níveis de insulina assumiram valores basais, após tratamento com ATZ. Além disso, a expressão gênica de Pck1 não se alterou com a dieta HF ou o tratamento com ATZ, enquanto PcK2 aumentou significativamente comparado ao grupo HF (Figura 19).

No estudo de Cao e colaboradores (2013), outrora citado na presente discussão, a expressão gênica da G6Pase e de PcK1 nos hepatócitos também foram avaliadas, apresentando diminuições significativas após estimulação com ap2 (CAO et al., 2013).

Faz-se interessante observar que em modelos *knockout* para a PcK1, ocorre sério comprometimento do ciclo tricarboxílico, reduzindo-se a 10% de sua função e naqueles que supra expressam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, ocorre aumento da produção de glicose,

induzindo diabetes, além de cursar com diferentes alterações metabólicas, entre elas, a obesidade, esteatose e lipodistrofia (BEALE et al., 2007).

Hayashi e colaboradores (2015), utilizando camundongos *knockout* para GCK, observaram intolerância à glicose, diminuição do glicogênio hepático e alteração da expressão gênica no fígado, indicando a importante ação desta enzima no metabolismo da glicose, com ações específicas no tecido hepático (HAYASHI et al., 2015).

Ressalta-se que apesar, de no presente estudo, a expressão gênica de ap2 ter se mostrado elevada (Figura 20), provavelmente, sua expressão proteica ou atividade possa estar "down" regulada, ratificando-se que houve melhoras no perfil glicêmico e sensibilidade à insulina no grupo tratado com ATZ.

Coletivamente, o presente estudo indica que o ATZ pode contribuir para melhorar alguns parâmetros do "status" sindrômico na SMet, principalmente devido ao seu grande poder lipolítico e seus efeitos no controle glicêmico e sobre a dislipidemia. No entanto, o mecanismo exato para o efeito lipolítico do ATZ ainda não está elucidado. Ademais, atenta-se para a compreensão desta nova ação do ATZ e a baixa toxicidade deste composto (DL50 superior a 2500 mg.Kg-1) (BUDAVARI, 1989), associada aos fortes efeitos lipolíticos e antioxidantes, tornando-o promissor como um novo tratamento para a obesidade e para os fenótipos da SMet.

Em resumo, o presente estudo fornece evidências do efeito lipolítico induzido pelo ATZ, o que permite atenuar outras complicações metabólicas induzidas pela dieta rica em gordura. As ações benéficas pleiotrópicas do ATZ contribuem para evitar a obesidade, SMet, e fatores correlacionados. No entanto, os mecanismos ainda necessitam ser plenamente explorados, incluindo, os efeitos colaterais que devem ser investigados em experimentos futuros de longa duração.

# 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento experimental de 12 semanas com o inibidor da CAT, o ATZ, em camundongos C57BL6 com SMet induzida por dieta HF, resultou em diversos efeitos significativos, tanto sistêmicos quanto hepáticos. Além disso, demostrou pela primeira vez, uma potente ação terapêutica na SMet.

Todos os grupos tratados, nas doses administradas (125 $mg.kg^{-1}$, $250mg.kg^{-1}$ e $500mg.kg^{-1}$), apresentaram diminuição significativa de peso corporal induzida por lipólise, manutenção da redução do peso, ao final de todo o tratamento, além de diminuição nos níveis de leptina e na distribuição de tecido adiposo, resultantes do aumento da lipólise**.**

Além disso, evidenciou-se melhora no perfil glicêmico com diminuição da glicemia de jejum e aumento da sensibilidade à insulina, associados a uma melhora significativa no perfil lipídico plasmático e hepático, apresentando diminuições nos lipídios totais, colesterol, triglicerídeos e NEFA, contribuindo, em conjunto, para a modulação no *status* REDOX no tecido adiposo epididimal, o qual, mostrou-se com redução nos níveis de TBARS.

Destaca-se ainda que as ações promovidas pelo ATZ também foram eficaz em promover a melhora na expressão gênica hepática, evidenciada pela diminuição para expressão do receptor para insulina, para a G6Pase e GCK, bem como, aumento da expressão para a PcK2, CD36 e aP2.

Assim, o ATZ demonstrou ser um potente indutor lipolítico capaz de melhorar os principais parâmetros relacionados ao fenótipo da SMet, especificamente, a obesidade, mostrando ter um importante potencial terapêutico antiobesidade.

# 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante do eficaz efeito apresentado pelo ATZ na SMet, faz-se importante que mais estudos sejam realizados no intuito de investigar todas as possíveis vias moduladas pelo ATZ. Dessa forma, intenta-se o desenvolvimento futuro de um animal “knockout” para a catalase, a fim de estudar todos os mecanismos advindos da administração do ATZ neste modelo.

# REFERÊNCIAS

ADIELS, M.; TASKINEN, M. R.; BOREN, J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports,** v. 8, n. 1, p. 60-64, Feb. 2008.

AL RIFAI, M. et al. The association of nonalcoholic fatty liver disease, obesity, and metabolic syndrome, with systemic inflammation and subclinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). **Atherosclerosis,** v. 239, n. 2, p. 629-633, Apr. 2015.

ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation,** v. 120, n. 16, p. 1640-1645, Oct. 2009.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-1062, Sept. e24-30 2005.

AMATO, M. C. et al. Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91969, 2014.

AMIRKHIZI, F. et al. Impaired enzymatic antioxidant defense in erythrocytes of women with general and abdominal obesity. **Obes. Res. Clin. Pract.,** v. 8, n. 1, p. 26-34, Jan.-Feb. 2014.

ANDERSON, L. M. et al. The effectiveness of worksite nutrition and physical activity interventions for controlling employee overweight and obesity: a systematic review. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 37, n. 4, p. 340-357, Oct. 2009.

ANTONENKOV, V. D. et al. Effect of chronic ethanol, catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole and clofibrate treatment on lipid peroxidation in rat myocardium. **The International Journal of Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1313-1318, 1989.

BALKISSON, R.; MURRAY, D.; HOFFSTEIN, V. Alveolar damage due to inhalation of amitrole-containing herbicide. **Chest**, v. 101, n. 4, p. 1174-1176, Apr. 1992.

BAYLIAK, M. et al. Inhibition of catalase by aminotriazole in vivo results in reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73, n. 4, p. 420-426, Apr. 2008.

BAYS, H. E. et al. National lipid association annual summary of clinical lipidology 2016. **J. Clin. Lipidol.**, v. 10, n. 1 Suppl, p. S1-S43, Jan./Feb. 2016.

BEALE, E. G.; HARVEY, B. J.; FOREST, C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 48, n. 2-3, p. 89-95, 2007.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol. Rev.**, v. 94, n. 2, p. 329-354, Apr. 2014.

BOON, M. R.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. Brown adipose tissue: a human perspective. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 233, p. 301-319, 2016.

BOUILLAUD, F. UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1787, n. 5, p. 377-383, May 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976.

BROWN, G. L. A solubility analysis of crystalline ox-liver catalase. **The Biochemical Journal**, v. 51, n. 4, p. 569-573, Jul. 1952.

BUDAVARI, S. E. Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. In: _____. (Ed.). **The merck index**. Rahway: Merck, 1989. cap. 81.

BURAK, M. F. et al. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. **Sci. Transl. Med.**, v. 7, n. 319, p. 1-18, Dec. 2015.

BURKE, L. K. et al. Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. **Mol. Metab.**, v. 5, n. 3, p. 245-252, Mar. 2016.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, p. 1155-1161, Apr. 2014.

CAI, H. et al. NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. **J. Biol. Chem.,** v. 277, n. 50, p. 48311-48317, Dec. 13 2002.

CANTO, C.; AUWERX, J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? **Pharmacological Reviews,** v. 64, n. 1, p. 166-187, Jan. 2012.

CAO, H. et al. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 768-778, May 7 2013.

CARDOSO, L. M. et al. Cardiovascular responses to hydrogen peroxide into the nucleus tractus solitarius. **American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,** v. 297, n. 2, p. R462-469, Aug. 2009.

CARR, M. C.; BRUNZELL, J. D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 89, n. 6, p. 2601-2607, Jun. 2004.

CHILUMURI, A.; ODELL, M.; MILTON, N. G. Benzothiazole aniline tetra(ethylene glycol) and 3-amino-1,2,4-triazole inhibit neuroprotection against amyloid peptides by catalase overexpression in vitro. **ACS Chemical Neuroscience,** v. 4, n. 11, p. 1501-1512, Nov. 2013.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. 1 Suppl, p. 25-30, Jul. 2007.

CRUZ, J. C. et al. Reactive oxygen species in the paraventricular nucleus of the hypothalamus alter sympathetic activity during metabolic syndrome. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 384, 2015.

CUI, R. et al. Overexpression of superoxide dismutase 3 gene blocks high-fat diet-induced obesity, fatty liver and insulin resistance. **Gene Therapy,** v. 21, n. 9, p. 840-848, Sept. 2014.

DA FONSECA, L. J. et al. Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. **Oxidative Medicine and cellular Longevity,** v. 2014, p. 898501, 2014.

DAI, Y. et al. Neck circumference and future cardiovascular events in a high-risk population--A prospective cohort study. **Lipids in Health and Disease,** v. 15, p. 46, 2016.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. **Biochemical Pharmacology,** v. 35, n. 20, p. 3642, Oct. 1986.

DE KREUTZENBERG, S. V. et al. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 1006-1015, Apr. 2010.

DEIS, F. H.; LIN, G. W.; LESTER, D. In vitro inhibition of catalase by 4-hydroxypyrazole, a metabolite of pyrazole. **FEBS letters**, v. 78, n. 1, p. 81-82, 1977.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 319-375, Jul. 1970.

DE MEIJER, V. E. et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. **Metabolism: Clinical and Experimental,** v. 59, n. 8, p. 1092-1105, Aug. 2010.

DENG, X. et al. Aminotriazole attenuated carbon tetrachloride-induced oxidative liver injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3073-3078, Sept. 2012.

DISILVESTRO, D. J. et al. Leptin production by encapsulated adipocytes increases brown fat, decreases resistin, and improves glucose intolerance in obese mice. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153198, 2016.

DUNNING, S. et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2027-2034, Dec. 2013.

ELEUTERIO-SILVA, M. A. et al. Short-term cardiovascular physical programme ameliorates arterial stiffness and decreases oxidative stress in women with metabolic syndrome. **Journal of Rehabilitation Medicine,** v. 45, n. 6, p. 572-579, Jun. 2013.

ERTUNC, M. E. et al. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. **Journal of Lipid Research,** v. 56, n. 2, p. 423-434, Feb. 2015.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology,** v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTERBAUER, H. et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 341-390, Oct. 1992.

FARGHALY, T. A.; ABDALLAH, M. A.; AZIZ, M. R. Synthesis and antimicrobial activity of some new 1,3,4-thiadiazole derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14625-14636, Dec. 2012.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. The Effect of inflammation and infection on lipids and lipoproteins. In: DE GROOT, L. J. et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth, 2000. p.78.

FEINSTEIN, R. N.; BERLINER, S.; GREEN, F. O. Mechanism of inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 76, n. 1, p. 32-44, Jul. 1958.

FEINSTEIN, R. N.; DAINKO, J. L. Use of 3-amino-1,2,4-triazole to reduce body catalase activity in cancer studies. **Cancer Research**, v. 19, n. 6, Part 1, p. 612-617, Jul. 1959.

FERNANDEZ-SANCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FISHER-WELLMAN, K. H. et al. Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H2O2-emitting source under conditions of nutrient overload. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 65, p. 1201-1208, Dec. 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat. Med.**, v. 1, n. 12, p. 1311-1314, Dec. 1995.

FUJITA, K. et al. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. **Circulation Journal**, v. 70, n. 11, p. 1437-1442, Nov. 2006.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, Dec. 2004.

GARCIA-MONZON, C. et al. Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Clinical Investigation,** v. 44, n. 1, p. 65-73, Jan. 2014.

GAUTAM, S. et al. Preliminary studies on CD36 gene in type 2 diabetic patients from north India. **Indian J. Med. Res.,** v. 134, p. 107-112, Jul. 2011.

GELOEN, A. et al. CD36 inhibitors reduce postprandial hypertriglyceridemia and protect against diabetic dyslipidemia and atherosclerosis. **PLoS One,** v. 7, n. 5, p. e37633, 2012.

GOGONEA, V. Structural insights into high density lipoprotein: old models and new facts. **Frontiers in Pharmacology,** v. 6, p. 1-30, Jan. 2016.

GRECO, D. et al. Gene expression in human NAFLD. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 5, p. G1281-1287, May 2008.

GREENWEL, P. et al. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. **Hepatology,** v. 31, n. 1, p. 109-116, Jan. 2000.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute / American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 2, p. e13-18, Feb. 2004a.

_____. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation,** v. 109, n. 3, p. 433-438, Jan. 2004b.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347-3351, Jul. 2010.

HARRISON, G. J.; JORDAN, L. R.; WILLIS, R. J. Deleterious effects of hydrogen peroxide on the function and ultrastructure of cardiac muscle and the coronary vasculature of perfused rat hearts. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 10, n. 8, p. 843-849, Oct. 1994.

HARRISON, K. A.; MURPHY, R. C. Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 270, n. 29, p. 17273-17278, Jul. 1995.

HASHIMOTO, T.; SATO, K.; IEMITSU, M. Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 2, p. 260-267, Jul. 2013.

HAYASHI, H. et al. Roles of hepatic glucokinase in intertissue metabolic communication: Examination of novel liver-specific glucokinase knockout mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 460, n. 3, p. 727-732, May 2015.

HONG, H. C. et al. The synergistic impact of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis. **Clinical Endocrinology**, v. 84, p. 203-209, Sept. 2015.

HUANG, L. H.; ELVINGTON, A.; RANDOLPH, G. J. The role of the lymphatic system in cholesterol transport. **Front. Pharmacol.**, v. 6, p. 182, 2015.

HUSAIN, K. et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. **World. J. Biol. Chem.**, v. 6, n. 3, p. 209-217, Aug. 26 2015.

IIDA, Y.; KATUSIC, Z. S. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. **Stroke; Journal of Cerebral Circulation**, v. 31, n. 9, p. 2224-2230, Sept. 2000.

ISHII, H. et al. Inhibition by 3-amino-1,2,4-triazole of fatty acid synthesis in cell free system. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** v. 26, n. 9, p. 2674-2678, Sept. 1978.

IWAKURA, H. et al. Establishment of leptin-responsive cell lines from adult mouse hypothalamus. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148639, 2016.

JAGANNADHAM, J. et al. Comprehensive map of molecules implicated in obesity. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0146759, 2016.

KAKIMOTO, P. A. et al. H2O2 release from the very long chain acyl-CoA dehydrogenase. **Redox Biol.**, v. 4, p. 375-380, 2015.

KARAVIA, E. A. et al. Apolipoprotein A-I modulates processes associated with diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Mol. Med.,** v. 18, p. 901-912, 2012.

KASTORINI, C. M. et al. Metabolic syndrome, adherence to the mediterranean diet and 10-year cardiovascular disease incidence: the ATTICA study. **Atherosclerosis**, v. 246, p. 87-93, Mar. 2016.

KASTORINI, C. M. et al. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA study. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD**, v. 26, n. 3, p. 223-231, Mar. 2016.

KHALIQ, A. et al. Relationships between components of metabolic syndrome and coronary intravascular ultrasound atherosclerosis measures in women without obstructive coronary artery disease: the NHLBI-sponsored women's ischemia syndrome evaluation study. **Cardiovasc. Endocrinol.**, v. 4, n. 2, p. 45-52, Jun. 2015.

KIM, S. H. et al. Relationship between deep subcutaneous abdominal adipose tissue and metabolic syndrome: a case control study. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, Feb. 2016.

KIM, S. H.; PLUTZKY, J. Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders. **Diabetes Metab. J.**, v. 40, n. 1, p. 12-21, Feb. 2016.

KLOTING, N.; BLUHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277-287, Dec. 2014.

KODYDKOVA, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biologica**, v. 60, n. 4, p. 153-167, 2014.

KOONEN, D. P. et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2863-2871, Dec. 2007.

LARGE, V. et al. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. **Journal of Lipid Research,** v. 40, n. 11, p. 2059-2066, Nov. 1999.

LEI, X. G. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. **Physiol. Rev.**, v. 96, n. 1, p. 307-364, Jan. 2016.

LETTIERI BARBATO, D. et al. Dietary fat overload reprograms brown fat mitochondria. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 272, 2015.

LI, W. et al. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 11, p. 3996-4006, Nov. 2010.

LIAW, F. Y. et al. Components of metabolic syndrome and the risk of disability among the elderly population. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22750, 2016.

LICHTENBELT, W. D. V. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 18, p. 1500-1917, Apr. 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods.,** v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LODHI, I. J.; SEMENKOVICH, C. F. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 380-392, Mar. 2014.

LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism,** v. 10, n. 4, p. 260-272, Oct. 2009.

LOPES, H. F. et al. Influence of acute hyperlipidemia to adipocyte-derived hormones in lean normotensive and subjects with metabolic syndrome. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 6, n. 1, p. 132, 2014.

LUNA-LUNA, M. et al. Adipose tissue in metabolic syndrome: onset and progression of atherosclerosis. **Archives of Medical Research,** v. 46, n. 5, p. 392-407, Jul. 2015.

MAFFEI, M. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat. Med.**, v. 1, n. 11, p. 1155-1161, Nov. 1995.

MARCHESINI, G. et al. WHO and ATPIII proposals for the definition of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine: Journal of the British Diabetic Association,** v. 21, n. 4, p. 383-387, Apr. 2004.

MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY, A. A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1:2:4:-triazole. **The Biochemical Journal,** v. 68, n. 3, p. 468-475, Mar. 1958.

MARGOLIASH, E.; SCHEJTER, A. Kinetics of the irreversible inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole in the presence of hydrogen peroxide and catalase-hydrogen peroxide complex I hydrogen donors. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 237, p. 2359-2363, Jul. 1962.

MIN, K. B.; MIN, J. Y. Android and gynoid fat percentages and serum lipid levels in United States adults. **Clinical Endocrinology**, v. 82, n. 3, p. 377-387, Mar. 2015.

MIQUILENA-COLINA, M. E. et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Gut,** v. 60, n. 10, p. 1394-1402, Oct. 2011.

MORIMOTO, S. et al. Effects of 3-amino,1,2,4-triazole on plasma renin activity and renal peroxisomal enzymes in rats. **Japanese Journal of Pharmacology,** v. 28, n. 5, p. 793-796, Oct. 1978.

MOSCAVITCH, S. D. et al. Comparison of adipokines in a cross-sectional study with healthy overweight, insulin-sensitive and healthy lean, insulin-resistant subjects, assisted by a family doctor primary care program. **Diabetol. Metab. Syndr.,** v. 8, p. 9, 2016.

MUSE, E. D. et al. The association of resistin with cardiovascular disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 101-108, Mar. 2015.

NADAL-CASELLAS, A. et al. Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats. **Stress**, v. 14, n. 2, p. 174-184, Mar. 2011.

NAKAMURA, A.; HARA, T.; MINAKAMI, S. Intracellular distribution of hepatic catalase activity in rats treated with aminotriazole and allylisopropylacetamide. **Journal of Biochemistry,** v. 73, n. 1, p. 47-53, Jan. 1973.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Three years with adult human brown adipose tissue. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1212, p. e20-36, Nov. 2010.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1840, n. 2, p. 809-817, Feb. 2014.

NOVOTNY, D. et al. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. **Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 63, n. 2, p. 219-228, 2014.

NUNES-SOUZA, V. et al. Aging Increases susceptibility to high fat diet-induced metabolic syndrome in C57BL/6 Mice: improvement in glycemic and lipid profile after antioxidant therapy. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2016, p. 1987960, 2016.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, n. 2, p. 351-358, Jun. 1979.

OKADA, R. et al. Upper-normal waist circumference is a risk marker for metabolic syndrome in normal-weight subjects. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD**, v. 26, n. 1, p. 67-76, Jan. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Programme on Chemical Safety Health and Safety Guide. **Health and safety guide for amitrole**. Geneve, 1994. Environmental Health Criteria, 85.

OSORIO, J. Diabetes: Absence of hormone-sensitive lipase associated with risk of T2DM. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 10, n. 8, p. 445, Aug. 2014.

OTANI, H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. **Antioxidants & Redox Signaling,** v. 15, n. 7, p. 1911-1926, Oct. 1 2011.

OUWENS, D. M. et al. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1938-1948, Sept. 2007.

PAN, X. et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. **Endocrine**, v. 48, n. 3, p. 834-847, Apr. 2015.

PEDERSEN, L. R. et al. Weight loss is superior to exercise in improving the atherogenic lipid profile in a sedentary, overweight population with stable coronary artery disease: a randomized trial. **Atherosclerosis**, v. 246, p. 221-228, Mar. 2016.

PIETKA, T. A. et al. CD36 protein influences myocardial Ca2+ homeostasis and phospholipid metabolism: conduction anomalies in CD36-deficient mice during fasting. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 46, p. 38901-38912, Nov. 2012.

PORTER, C. et al. Severe burn injury induces thermogenically functional mitochondria in murine white adipose tissue. **Shock,** v. 44, n. 3, p. 258-264, Sept. 2015.

QIAO, L. et al. Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1519-1527, May 2011.

QUEIPO-ORTUNO, M. I. et al. FABP4 dynamics in obesity: discrepancies in adipose tissue and liver expression regarding circulating plasma levels. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48605, 2012.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sci.**, v. 148, p. 183-193, Feb. 2016.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, Dec. 1988.

_____. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annual review of Medicine,** v. 44, p. 121-131, 1993.

RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Impact of 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT)-Derived Increase in hydrogen peroxide levels on inflammation and metabolism in human differentiated adipocytes. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152550, 2016.

RUPEREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

SERPILLON, S. et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. **Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 297, n. 1, p. H153-162, Jul. 2009.

SHI, Y.; BURN, P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 695-710, Aug. 2004.

SIES, H. Role of metabolic H2O2 generation: redox signaling and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, Mar. 28 2014.

SIMENTAL-MENDIA, L. E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 6, n. 4, p. 299-304, Dec. 2008.

SPANIDIS, Y. et al. Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 3, p. 895-903, Mar. 2016.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell.**, v. 83, n. 7, p. 1263-1271, Dec. 1995.

TEPHLY, T. R. et al. Activation of a catalase peroxidative pathway for the oxidation of alcohols in mammalian erythrocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 14, p. 435-444, Apr. 1965.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, n. 1, p. 5-14, Jan. 2011.

UEDA, M. et al. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 93-98, Feb. 14 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). **Registration eligibility decision**: amitrole, 1996.

VAN DER BERG, J. D. et al. Associations of total amount and patterns of sedentary behaviour with type 2 diabetes and the metabolic syndrome: the maastricht study. **Diabetologia**, v. 59, n. 4, p. 709-718, Apr. 2016.

VAN DER ZWAN, L. P. et al. Hyperglycemia and oxidative stress strengthen the association between myeloperoxidase and blood pressure. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1366-1372, Jun. 2010.

VENTURINI, D. et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. **Obesity**, v. 20, n. 12, p. 2361-2366, Dec. 2012.

VIDELA, L. A. et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 261-268, Mar. 2004.

WANG, C. et al. Rapamycin-mediated CD36 translational suppression contributes to alleviation of hepatic steatosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 447, n. 1, p. 57-63, Apr. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, 1999. v. 1. p. 1-6,

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).. Global health indicators. **World Health Statistics**, v. 2015, n. 1, p. 160, 2015.

WILSON, C. G. et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-Fed mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 570-585, Feb. 2016.

WON, J. C. et al. Association of plasma levels of resistin with subcutaneous fat mass and markers of inflammation but not with metabolic determinants or insulin resistance. **J. Korean Med. Sci.**, v. 24, n. 4, p. 695-700, Aug. 2009.

WU, C. F. et al. Therapeutic modification of arterial stiffness: An update and comprehensive review. **World J. Cardiol.**, v. 7, n. 11, p. 742-753, Nov. 26 2015.

XAVIER, H. T. et al. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** v. 101, n. 4, p. 22, 2013.

XU, P. et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. **Hypertension,** v. 51, n. 2, p. 574-580, Feb. 2008.

YIANNIKOURIS, F. et al. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. **Hypertension**, v. 60, n. 6, p. 1524-1530, Dec. 2012.

YOUNG, S. G.; ZECHNER, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. **Genes Dev.**, v. 27, n. 5, p. 459-484, Mar. 1 2013.

YUBERO-SERRANO, E. M. et al. Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. **Experimental & Molecular Medicine,** v. 45, p. e28, 2013.

ZECHNER, R.; LANGIN, D. Hormone-sensitive lipase deficiency in humans. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 199-201, Aug. 2014.

ZHANG, G.; SUN, Q.; LIU, C. Influencing factors of thermogenic adipose tissue activity. **Frontiers in Physiology,** v. 7, p. 29, 2016.

ZHOU, D. et al. CD36 level and trafficking are determinants of lipolysis in adipocytes. **FASEB J.**, v. 26, n. 11, p. 4733-4742, Nov. 2012.

# ANEXO

## Anexo A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**PROJETO Nº 29/2014**

**TÍTULO**: Avaliações pré-clínicas cardiometabólicas e vasculares na síndrome metabólica: papel do eixo catalase/peróxido de hidrogênio/desequilíbrio REDOX

**RESPONSÁVEL / PESQUISADOR**: Luiza Antas Rabelo

**OBJETIVO**: Estudar os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial e no desequilíbrio REDOX em camundongos com fenótipo para a síndrome metabólica, por indução dietética, assim como avaliar os efeitos da inibição crônica da enzima catalase neste modelo.

**JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):**
O projeto utilizará um total de 60 animais (camundongos C57BL/6 machos) divididos em dois conjuntos de experimentos para atingir seus objetivos. O projeto contém o número amostral detalhado dentro de cada grupo experimental com o mínimo adequado para permitir validação estatística e o método de indução de morte (exanguinação dos animais sob anestesia com tiopental).

**SITUAÇÃO**: APROVADO

**PERÍODO DE VIGÊNCIA**: 22-08-2014 a 22-08-2016

**DADOS DO ANIMAL**:

| ESPÉCIE | LINHAGEM | QUANTIDADE |
|---|---|---|
| Camundongo isogênico | C57BL/6 | 60 |

Maceió, 26 de agosto de 2014.

Profª Drª Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no uso de Animais
SIAPE 1120868

**Anexo B - Documento de depósito patentário de invenção: "Uso do 3-Amino-1,2,4-triazol para o tratamento da obesidade, dislipidemias, diabetes, hipertensão, doenças hepáticas gordurosas não-alcoólica, síndrome metabólica e agravos associados"**

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

17/12/2015 870150007210 16:12

00.000.2.2.15.0858873.7

# Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

**Número do Processo:** BR 10 2015 031741 7

## Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica
**CPF/CNPJ:** 24464109000148
**Nacionalidade:** Brasileira
**Qualificação Jurídica:** Sociedade com intuito não econômico
**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins
**Cidade:** Maceió
**Estado:** AL
**CEP:** 57072-970
**País:** Brasil
**Telefone:** 82-3214-1064
**Fax:** 82-3214-1035
**Email:** sbuchoa@gmail.com

## Dados do Pedido

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Uso do 3-Amino-1,2,4-triazol para o tratamento da obesidade, dislipidemias, diabetes, hipertensão, doenças hepáticas gordurosas não-alcoólica, síndrome metabólica e agravos associados

**Resumo:** A presente invenção refere-se ao uso do 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) para o tratamento da obesidade, dislipidemias, diabetes, hipertensão, doenças hepáticas gordurosas não-alcoólica, síndrome metabólica, e agravos associados. Este é um composto orgânico heterocíclico classicamente reputado como um potente inibidor da catalase, uma enzima antioxidante que, por sua vez, age na decomposição do peróxido de hidrogênio. Apesar da conhecida ação inibitória sobre a catalase, não existe relatos, até a presente invenção, de trabalhos investigando e/ou comprovando o uso do ATZ como agente lipolítico em condições clínicas como as doenças supracitadas. Neste cenário, mostrou-se eficaz em promover a diminuição do peso corporal, adiposidade visceral, pressão arterial, peroxidação lipídica plasmática, glicemia, insulinemia, lipídios totais e frações lipídicas, como também, promoveu o aumento do tecido adiposo marrom e a modulação proteica e gênica do, transportador para glicose tipo 4, enzima lipase hormônio sensível, leptina e adiponectina. Em conjunto, estes dados conferem a presente invenção o impacto necessário para o uso do ATZ na terapêutica cardiometabólica.

## Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

**Nome:** LUIZA ANTAS RABELO

**CPF:** 89353870453

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Jorge Montenegro Barros, S/N Quadra A, lote 09. Condomínio Jardins de La Reina, Santa Amélia

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57063-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (82) 321 41095

**Fax:**

**Email:** luizaa.rabelo@gmail.com

Inventor 2 de 5

**Nome:** MARCOS ANTONIO ELEUTÉRIO DA SILVA

**CPF:** 04336603413

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Lourenço Moreira da Silva. Residencial Itália. Ed. Nápoli, 202, Ponta Verde

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57035-360

**País:** BRASIL

**Telefone:** (82) 321 41095

**Fax:**

**Email:** marcoseleuterio@gmail.com

Inventor 3 de 5

**Nome:** VALÉRIA NUNES DE SOUZA

**CPF:** 05852620475

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Av. Gustavo Paiva 2220. Bl. 07, Apt. 304, Mangabeiras

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57031-900

**País:** BRASIL

**Telefone:** (82) 998 210051

**Fax:**

**Email:** valeriansouza@hotmail.com

Inventor 4 de 5

**Nome:** NELSON MIGUEL DIAS JÚNIOR

**CPF:** 03847263480

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Profª Higia Vasconcelos, 61, ap. 202, Ponta Verde

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57035-140

**País:** BRASIL

**Telefone:** (82) 321 41095

**Fax:**

**Email:** nelson_fisio@hotmail.com

Inventor 5 de 5

**Nome:** TAMIRES ALVES DO NASCIMENTO

**CPF:** 07219986408

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Conjunto José Tenório, bloco 17 Apt 304, Bairro: Serraria

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57046-350

**País:** BRASIL

**Telefone:** (82) 999 157039

**Fax:**

**Email:** tamiresnasciment@gmail.com

## Documentos anexados

| Tipo Anexo | Nome |
|---|---|
| Comprovante de pagamento de GRU 200 | GRU.pdf |
| Relatório Descritivo | RELATÓRIO_FINAL.pdf |
| Desenho | 03 - 2015.12.03_Figuras.pdf |
| Resumo | 04 - 2015.12.03_Resumo - vers+úo final 1.pdf |
| Reivindicação | REIVINDICAÇÕES_FINAL2.pdf |

## Acesso ao Patrimônio Genético

☑ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

## Declaração de veracidade

☑ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

*PETICIONAMENTO ELETRÔNICO* Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 17/12/2015 às 16:12

**BANCO DO BRASIL** | **001-9** | **RECIBO DO SACADO**

Pagável em qualquer Banco

Contra-apresentação

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

2234-9/333.028-1

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 04/11/2015 | 1508588737 | RC | N | 04/11/2015 |
| | 18/027 | R$ | Quantidade | Valor |

00.000.2.2.15.0858873.7

R$ 104,00

RN Complementar | Peticionamento, Papel

Petição Vinculada RPI | Valor

R$ 104,00

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União, GRU - Cobrança

R$ 104,00

UNI RSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, BR/AL, 57072-970

*Autenticação mecânica - Controle Cedente*

---

**BANCO DO BRASIL** | **001-9** | **00199.53637 10000.022151 08588.737216 7 00000000010400**

Pagável em qualquer Banco

Contra-apresentação

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

2234-9/333.028-1

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 04/11/2015 | 1508588737 | RC | N | 04/11/2015 |
| | 18/027 | R$ | | |

00.000.2.2.15.0858873.7

R$ 104,00

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União, GRU - Cobrança

R$ 104,00

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, BR/AL, 57072-970

*Sacador/Avalista*

*Autenticação mecânica - Ficha de Compensação*

---

GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI como comprovante da retribuição deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento.- PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

SIAFI2015-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAC
30/11/15 13:27 USUARIO : IZABELLE
DATA EMISSAO : 24Nov15 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2015GR800121
UG/GESTAO EMITENTE : 153037 / 15222 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153037 GESTAO : 15222
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - G COMPETENCIA: NOV15 VENCIMENTO: 15Dez15
DOC. ORIGEM: 153037 / 15222 / 2015NF002012 PROCESSO : 23065.022529/2015
EVENTO : 3
(-)VALOR DOCUMENTO : ,04,00
(-)DESCONTO/ABATIMENTO:
(-)OUTRAS DEDUCOES :
(+)MORA/MULTA :
(+)JUROS/ENCARGOS :
(+)OUTROS ACRESCIMOS :
(=)VALOR TOTAL : 104,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00000000001508588737
CODIGO DE BARRAS : 89610000001 8 04000001010 4 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
PAGAMENTO REFERENTE A DEPÓSITO DA PATENTE QUE TEM COMO INVENTOR O PROF. JOSÉ
EDMUNDO ACCIOLY DE SOUZA CTEC/UFAL. CONF. PROCESSO 23065.022529/2015-10.
LANCADO POR : 05414550441 - CEZAR UG : 153037 24Nov2015 14:71
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e análogos diretos **caracterizadas por** tratar condições como obesidade, dislipidemias, diabetes, hipertensão, doenças hepáticas gordurosas não-alcoólicas (DHGNA) e síndrome metabólica (SMet) em mamíferos.
2. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e análogos diretos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas por** serem utilizadas pelas vias oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, enteral, parenteral, tópica e transdérmicas.
3. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas por** serem utilizadas na composição alimentícia de dietas iso e hipercalóricas.
4. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizadas por** conter ~0,0005-0,5 % de ATZ.
5. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na diminuição do peso corporal e adiposidade visceral, bem como as ações deste como agente lipolítico, na SMet (resistência à insulina, obesidade central e subcutânea, diabetes *mellitus* 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.
6. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na indução do aumento do tecido adiposo marrom na SMet (resistência à insulina, obesidade central e

subcutânea, diabetes *mellitus* 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.

7. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na indução da diminuição da pressão arterial na SMet (resistência à insulina, obesidade central e subcutânea, diabetes mellitus 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.
8. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na indução da diminuição da peroxidação lipídica plasmática na SMet (resistência à insulina, obesidade central e subcutânea, diabetes mellitus 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.
9. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na modulação e expressão protéica de leptina na SMet (resistência à insulina, obesidade central e subcutânea, diabetes mellitus 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.
10. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na melhora da intolerância à glicose e resistência à insulina, na SMet (resistência à insulina, obesidade central e subcutânea, diabetes mellitus 2, dislipidemias, hipertensão, aterosclerose e doenças hepáticas) e obesidade.
11. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 10, **caracterizadas por** serem utilizadas na modulação da expressão dos

genes para o transportador para glicose (GLUT4), enzima lipase hormônio sensível (HSL), leptina e adiponectina.

12. Uso de formulações farmacêuticas e/ou nutracêuticas do 3-Amino-1,2,4-triazol e seus análogos diretos, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizadas por** serem utilizadas na indução da diminuição de lipídios totais e frações (tais como triglicerídeos e colesterol, mas não restritos a estas), na doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA).