

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DE DUAS DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDIOS SATURADOS
ASSOCIADAS À BEBIDA ENRIQUECIDA COM FRUTOSE INTRODUZIDAS EM FASE
PRECOCE DA VIDA DE RATOS**

Thiago da Rosa Lima

CUIABÁ
2018

**EFEITO DE DUAS DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDIOS SATURADOS
ASSOCIADAS À BEBIDA ENRIQUECIDA COM FRUTOSE INTRODUZIDAS EM FASE
PRECOCE DA VIDA DE RATOS**

Thiago da Rosa Lima

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nair Honda Kawashita

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, Área de Concentração Cirurgia e Metabolismo.

CUIABÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

L732e Lima, Thiago da Rosa.
EFEITO DE DUAS DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE
LIPÍDIOS SATURADOS ASSOCIADAS À BEBIDA ENRIQUECIDA
COM FRUTOSE INTRODUZIDAS EM FASE PRECOCE DA VIDA DE
RATOS / Thiago da Rosa Lima. -- 2018
49 f. ; 30 cm.

Orientadora: Nair Honda Kawashita.
Co-orientadora: Suélen Aparecida de França Lemes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de
Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Cuiabá, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Obesidade. 2. Dieta hiperlipídica/hipercalórica. 3. Insulina. 4.
Leptina. 5. Frutose. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
Avenida Fernando Corôa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78062900 - CUIABÁ/MT
Tel : (65)3615-6221 - Email : msfcm@gmail.com

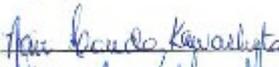
FOLHA DE APROVAÇÃO

Doutorando Thiago da Rosa Lima.

" EFEITO DE DUAS DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDIOS SATURADOS ASSOCIADAS À BEBIDA ENRIQUECIDA COM FRUTOSE INTRODUZIDAS EM FASE PRECOCE DA VIDA DE RATOS. "

Tese, apresentada a Universidade Federal de Mato Grosso, aprovada pela banca examinadora, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor.

Composição da Banca Examinadora:

1.  _____ Doutor(a) Nair Honda Kawashita (Presidente Banca / Orientador)
2.  _____ Doutor(a) Fabrício Azevedo Voltarelli (Examinador Interno)
3.  _____ Doutor(a) Carlos Alexandre Fett (Examinador Interno)
4.  _____ Doutor(a) Samyra Lopes Buzelle (Examinador Externo)
5.  _____ Doutor(a) Quessi Irias Borges (Examinador Externo)
6. _____ Doutor(a) Amílcar Sabino Damazo (Examinador Suplente)

LISTA DE ABREVIATURAS

SM	Síndrome Metabólica
IL6	Interleucina 6
SNC	Sistema Nervoso Central
DCNT	Doença Crônica não Transmissível
TAG	Triacilglicerol
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
AGs	Ácidos graxos
LPL	Lipase Lipoproteica
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
GLUT	Transportador de Glicose
SREBP1	Proteína Ligada aos Elementos reguladores de esteróis 1
NADPH⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
ATP-CL	Adenosina Trifosfato – Citrato Liase
ACX	Acetil CoA Carboxilase
TAMI	Tecido Adiposo Marrom Interescapular
NPY	Neuropeptídeo Y
AgRP	Proteína Relacionada ao Gene Agout
CART	Transcrito Regulado por Cocaína ou Anfetamina
α-MSH	α -Melanócito Estimulante
POMC	Pró-Opiomelanocortina
Ob-Rb	Receptor de Leptina
RBP-4	Proteína Ligada Ao Retinol – 4
<i>Ppar-γ</i>	Receptores Ativados Por Proliferador De Peroxissoma
UCP-1	Proteína Desacopladora Do Tipo 1
ETA	Efeito Térmico Do Alimento

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DA LITERATURA	12
Tecido adiposo / Obesidade	12
Lipogênese / Adipogênese	13
Tecido adiposo como órgão secretório endócrino	15
Músculo Estriado Esquelético.....	17
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
Acompanhar diariamente o desenvolvimento dos animais por meio do registro dos parâmetros:..	18
Caracterização da obesidade:	18
Determinar a massa dos tecidos internos:	18
Determinar a massa dos tecidos de gordura:.....	19
Determinar a massa dos tecidos musculares:.....	19
Analisar a morfologia e morfometria do tecido adiposo:.....	19
Avaliar a concentração sérica dos hormônios e interleucinas:	19
Determinar os seguintes parâmetros Bioquímicos:.....	19
Avaliar de modo indireto a atividade funcional das células β -pancreáticas o nível de resistência e sensibilidade à insulina por meio dos modelos:.....	19
REFERÊNCIAS	21

RESUMO

INTRODUÇÃO: Dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (HC/HL) adicionadas de bebidas açucaradas, altamente palatáveis, são utilizadas na indução da obesidade experimental, simulando a estreita associação desta com o aumento da obesidade mundial. A obtenção destes modelos contribui para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença. Entretanto, os resultados presentes na literatura são bastante contraditórios e de difícil comparação, especialmente devido aos diferentes teores de lipídios saturados, os quais variam em torno de 45 a 60% do valor calórico total, o que confere distintos protocolos utilizados nos estudos. Por outro lado, a ingestão de bebidas açucaradas parece ter maior consenso a respeito de sua participação na obesidade. **OBJETIVO:** Estabelecer um modelo de obesidade, com causas e características similares a obesidade humana, por meio de dieta HC/HL adicionada a uma solução de frutose introduzida em fases precoces da vida. **MÉTODOS:** Vinte e sete ratos machos Wistar (21 dias de idade; 43 ± 2 g) foram divididos em 3 grupos ($n=9$ /grupo): Controle (C): receberam dieta AIN93/G + água; Hipercalórica/hiperlipídica contendo 45% de lipídeos + solução com frutose 10% (HC/HL1); Hipercalórica/hiperlipídica contendo 60% de lipídeos + solução com frutose 10% (HC/HL2). As dietas foram administradas durante 70 dias ininterruptos. A massa corporal (MC) e ingestões alimentar (IA) e hídrica (IH) foram determinadas 3x/sem. Ao final do experimento, após jejum alimentar de 12h, os animais foram anestesiados por inalação com excesso de CO_2 , pesados e medidos quanto ao comprimento corporal (naso-anal) e eutanasiados por meio de exsanguinação via decapitação em guilhotina específica para esse fim. A confirmação da obesidade foi realizada por meio da eficiência energética (EE), pelo índice de Lee (IL) e pelo índice de adiposidade (IAV) calculado pela soma dos tecidos adiposos: epididimal+retroperitoneal+omental+perirrenal. A análise morfológica do tecido adiposo subcutâneo inguinal foi realizada em cortes histológicos corados em HE e a área de adipócitos analisada por meio do *software* ImageJ. Os músculos sóleo, gastrocnêmio, tibial anterior, EDL e quadríceps foram excisados e pesados. Amostras sanguíneas (8mL) foram coletadas para a determinação da concentração sérica de citocinas e hormônios, bem como dos parâmetros bioquímicos por meio de *kits* comerciais. Os parâmetros clínicos foram obtidos por meio dos índices HOMA2-IR, HOMA- β e QUICKI. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA-One-way) ou Kruskal Wallis e, quando diferenças foram observadas, utilizou-se *post hoc* de Tukey ou Dunn's, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas em *software* (SPSS[®] 21), e os resultados foram expressos como média \pm DP ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** MC foi maior no HC/HL1 se comparado a HC/HL2, sendo ambos maiores que C ($p < 0,001$). IA foi maior em HC/HL1 do que em HC/HL2 ($p=0,02$), sem diferença para C. No que se refere à IH, não houve diferença entre HC/HL1 e HC/HL2, mas ambos foram maiores que C ($p=0,02$). A EE ($p < 0,001$) e o IAV ($p < 0,001$) foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 quando comparados ao C. O IL foi maior em HC/HL1 comparado ao C ($p=0,02$), e sem diferença comparado a HC/HL2. A massa relativa do fígado foi maior em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C ($p < 0,001$). As massas relativas do coração ($p=0,003$) e dos rins ($p=0,016$) foram menores em HC/HL1 comparado aos demais grupos. A massa relativa dos músculos sóleo ($p=0,01$), gastrocnêmio ($p < 0,001$), tibial anterior ($p < 0,001$), EDL ($p < 0,001$) e quadríceps ($p < 0,001$) foram menores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C. As massas relativas dos tecidos adiposos retroperitoneal ($p < 0,001$), perirrenal ($p < 0,001$), omental ($p=0,004$), epididimal ($p=0,002$) e subcutânea inguinal ($p < 0,001$) foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C. A área dos adipócitos do tecido subcutâneo inguinal de HC/HL1 ($3828,0 \pm 1047,0$) foi maior quando comparada a C ($1516,0 \pm 591,8$) e HC/HL2 ($2644,0 \pm 552,1$) ($p < 0,0001$), sendo HC/HL2 maior que C. Os níveis séricos de triglicérides, VLDL-c e HDL-c foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C ($p < 0,001$); HC/HL1 apresentou maiores valores ($p=0,007$) de colesterol se comparado aos demais grupos. O colesterol não HDL foi menor em HC/HL1 e HC/HL2 comparado ao C ($p=0,004$). HC/HL1 apresentou maior concentração de leptina ($2563,0 \pm 1444$ pg/mL, $p=0,001$) e insulina ($950,0 \pm 346,0$ pg/mL ($p=0,001$) se comparado ao C (leptina= $337,4 \pm 168,9$ pg/mL e insulina= $535,6 \pm 277,2$ pg/mL) e ao HC/HL2 (leptina= $1263,0 \pm 937,6$ pg/mL e insulina= $332,0 \pm 264,5$

pg/mL). O grupo HC/HL1 não apresentou diferença no HOMA2-IR ($4,5\pm 1,9$) e HOMA- β ; ($121,1\pm 39,6$) quando comparado ao grupo C ($2,7\pm 1,9$; $89,3\pm 53,1$), porém, em ambos foram obtidos valores mais elevados quando comparados ao HC/HL2 (HOMA2-IR $1,8\pm 1,1$, $p=0,018$) e (HOMA- $\beta=36,4\pm 24,4$, $p=0,0007$). QUICKI foi significativamente maior em HC/HL2 ($0,35\pm 0,08$, $p=0,011$) comparado ao HC/HL1 ($0,28\pm 0,02$), no entanto, ambos não se mostraram diferentes em relação ao C ($0,30\pm 0,03$). **CONCLUSÃO:** Dieta HC/HL1 adicionada à solução com frutose 10% promoveu características similares à obesidade humana, uma vez que os ratos apresentaram aumento do Índice de Lee, hiperadiposidade subcutânea e visceral, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e sinais clínicos de sensibilidade à insulina (sem prejuízo às células- β). Embora não tenham apresentado alteração no Índice de Lee, os animais pertencentes a HC/HL2 denotaram menor hiperadiposidade subcutânea e visceral, e sinais clínicos de prejuízo à função das células- β . Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo permitem concluir que dieta contendo 45% de lipídeos associada a solução de frutose 10% foi eficiente em induzir um modelo de obesidade com características semelhantes à obesidade humana.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta hipercalórica/hiperlipídica. Insulina. Leptina. Frutose.

Abstract

INTRODUCTION: Hypercaloric and hyperlipidic diets (HC/HL), added with highly palatable sugary drinks, are used to induce experimental obesity, simulating its close association with increased obesity worldwide. Obtaining these models contributes to the understanding of the mechanisms involved in this disease. However, the results in the literature are quite contradictory and difficult to compare, especially due to the different saturated lipid contents, which vary around 45 to 60% of the total caloric value, which confers different protocols used in the studies. On the other hand, the ingestion of sugary drinks seems to have a greater consensus regarding their participation in obesity. **OBJECTIVE:** To establish a model of obesity, with causes and characteristics similar to human obesity, by means of HC/HL diet added to a solution of fructose introduced in the early stages of life. **METHODS:** Twenty-seven male Wistar rats (21 days of age, 43 ± 2 g) were divided into 3 groups ($n=9$ /group): Control (C): received diet AIN93/G + water; hypercaloric/hyperlipidic containing 45% lipids + 10% fructose solution (HC/HL1); hypercaloric/hyperlipidic containing 60% lipids + 10% fructose solution (HC/HL2). Diets were given for 70 uninterrupted days. Body mass (MC) and food (FI) and water intake (WI) were determined 3x /wk. At the end of the experiment, the animals were anesthetized by inhalation with excess CO₂, weighed and measured in terms of body length (naso-anal) and euthanized by means of exsanguination through a guillotine-specific decapitation for this purpose. Confirmation of obesity was performed through energy efficiency (EE), Lee's index (IL) and adiposity index (AI) calculated by the sum of adipose tissue: epididimal + retroperitoneal + omental + perirenal. Morphological analysis of subcutaneous inguinal adipose tissue was performed in histological sections stained in HE, and the area of adipocytes analyzed with the support of ImageJ software. The soleus, gastrocnemius, tibialis anterior, EDL and quadriceps muscles were excised and weighed. Blood samples (8mL) were collected for the determination of the serum concentration of cytokines and hormones, as well as biochemical parameters through commercial kits. Clinical parameters were obtained using the HOMA2-IR, HOMA- β and QUICKI indices. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA-One-way) or Kruskal Wallis and, when differences were observed, post-hoc of Tukey or Dunn's, respectively. Statistical analyzes were performed in software (SPSS® 21), and the results were expressed as mean \pm SD ($p<0.05$). **RESULTS:** MC was higher in HC/HL1 when compared to HC/HL2, both higher than C ($p<0.001$). FI was higher in HC/HL1 than in HC/HL2 ($p=0.02$), with no difference in C. Regarding WI, there was no difference between HC/HL1 and HC/HL2, but both were greater than C ($p=0.02$). EE ($p<0.001$) and AI ($p<0.001$) were higher in

HC/HL1 and HC/HL2 when compared to C. IL was higher in HC/HL1 compared to C ($p=0.02$), and without difference compared to HC/HL2. The relative liver mass was higher in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C ($p<0.001$). The relative masses of the heart ($p=0.003$) and the kidneys ($p=0.016$) were lower in HC/HL1 compared to the other groups. The relative mass of the soleus ($p=0.01$), gastrocnemius ($p<0.001$), anterior tibial ($p<0.001$), EDL ($p<0.001$) and quadriceps ($p<0.001$) muscles were lower in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C. The relative masses of the retroperitoneal ($p<0.001$), perirenal ($p<0.001$), omental ($p=0.004$), epididimal ($p=0.002$) and subcutaneous inguinal ($p<0.001$) adipose tissues were higher in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C. The area of adipocytes was higher in HC/HL1 (3828.0 ± 1047.0) compared to C (1516.0 ± 591.8) and HC/HL2 (2644.0 ± 552.1) ($p<0.001$), and HC/HL2 was higher than C. Serum triglyceride levels, VLDL-c and HDL-c were higher in HC / HL1 and HC/HL2 compared to C ($p<0.001$) ; HC/HL1 presented higher values ($p=0.007$) of cholesterol when compared to the other groups. Non-HDL cholesterol was lower in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C ($p=0.004$). HC/HL1 had a higher concentration of leptin (2563.0 ± 1444 pg/mL, $p=0.001$) and insulin (950.0 ± 346.0 pg/mL ($p=0.001$) compared to C (leptin= 337.4 ± 168.9 pg/mL and insulin= 535.6 ± 277.2 pg/mL) and HC/HL2 (leptin= 1263.0 ± 937.6 pg/mL and insulin= 332.0 ± 264.5 pg/mL). HC/HL1 group showed no difference in HOMA2-IR (4.5 ± 1.9) and HOMA- β (121.1 ± 39.6) when compared to group C ($2,7\pm1,9$; $89,3\pm53,1$), however, showed higher values when compared to HC/HL2 (HOMA2-IR 1.8 ± 1.1 , $p=0.018$) and (HOMA- β = 36.4 ± 24.4 , $p=0, 0007$). QUICKI was higher in HC/HL2 (0.35 ± 0.08 , $p=0.011$) compared to HC/HL1 (0.28 ± 0.02), however, both were not different in relation to C (0.30 ± 0.03). **CONCLUSION:** HC/HL1 diet added to the solution with 10% fructose promoted similar characteristics to human obesity, since the animals presented increase of the Lee Index, subcutaneous and visceral hyperadiposity, hyperleptinemia, hyperinsulinemia and clinical signs of insulin sensitivity to β -cells). Although there was no change in the Lee Index, the animals belonging to HC/HL2 showed lower subcutaneous and visceral hyperadiposity, and clinical signs of impaired β -cell function. Taken together, the results of the present study allow us to conclude that a diet containing 45% lipids associated with 10% fructose solution was efficient in inducing an obesity model with characteristics similar to human obesity.

Keywords: Obesity. Hypercaloric / hyperlipidic diet. Insulin. Leptin. Fructose.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015), aproximadamente 1,6 bilhão de pessoas sofrem com o excesso de peso corporal, sendo que, dessa totalidade, cerca de 522 milhões estão na faixa considerada obesa em todo o mundo ^[1]. Dentre as prováveis causas, destacam-se tanto os fatores genéticos como os comportamentais ^[2, 3].

A obesidade pode ser definida como a condição onde ocorre aumento do peso corporal provocado pelo elevado acúmulo de gordura (triglicerídeos) nos tecidos adiposos (subcutâneo e visceral), sendo que valores de massa gorda acima de 25% em homens e de 30% em mulheres, em relação a massa corporal total, configuram a obesidade ^[1]. A Organização das Nações Unidas Para a Alimentação e Agricultura (FAO) e o Fundo Mundial para Pesquisa em Câncer (FMPC), destacam que os fatores mais relevantes na promoção do excesso de peso corporal e obesidade são as preferências dietéticas, caracterizadas pelo consumo exacerbado de alimentos de alta densidade energética (rica em lipídios e açúcares), e proporcionalmente baixos no que tange à qualidade nutricional (vitaminas, minerais e proporção adequada de macronutrientes) ^[4].

A epidemia de obesidade, observada nos países em desenvolvimento, tem afetado não apenas os indivíduos adultos, mas, também, crianças e adolescentes ^[3]. Embora sejam esperados períodos característicos de ganho de peso corporal, é possível identificar que o acúmulo de gordura tem ocorrido cada vez mais cedo e, ao invés de reduzir com o crescimento, vem sendo mantido por toda a infância e vida adulta ^[5-7]. Dessa forma, as chances para o desenvolvimento de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT's) tornam-se cada vez maiores.

O aumento da incidência de adiposidade em crianças e adolescentes eleva, precocemente, as chances de desenvolver problemas relacionados à inflamação crônica e, por consequência, condições fisiopatológicas, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2, osteoartrites, entre outras ^[3, 8]. Além disso, dietas ricas em gordura e açúcar estão associadas à atrofia do músculo esquelético com redução das proteínas miofibrilares, acarretando em alterações fenotipicamente caracterizadas por perda de massa e força muscular ^[9].

A inflamação crônica de baixo grau é outro desfecho importante da obesidade, afetando diretamente o funcionamento do tecido muscular ^[10]. Estudos apontam que o consumo de dieta

com elevado teor de lipídios e açúcares, padrão alimentar comum entre obesos, pode desencadear alterações nas concentrações de hormônios como adiponectina, leptina e insulina, e de marcadores pró-inflamatórias como as citocinas IL-6 e TNF- α [11-13].

É importante destacar que o aumento do sedentarismo e do consumo de alimentos cada vez menos nutritivos e mais calóricos, gerou um “Ambiente Obesogênico”, situação esta favorável ao acúmulo de gordura corporal e consequente surgimento da obesidade, iniciada já na infância [14, 15]. Indivíduos sedentários que adotam hábitos nutricionais na forma de dietas hiperlipídicas associada a bebidas açucaradas, normalmente na forma de refrigerantes, manifestam distúrbios metabólicos associados à resistência à insulina, podendo evoluir para diabetes *mellitus* e obesidade [16]. A patogênese desse processo envolve redução tanto na captação quanto na utilização de glicose pelo músculo, promovendo uma maior oxidação de ácidos graxos para o fornecimento de energia aos processos metabólicos e contráteis. Embora as causas que expliquem as alterações ligadas ao metabolismo energético ainda não estejam amplamente elucidadas, acredita-se que dieta rica em gordura associada a bebida açucarada possa colaborar efetivamente [9, 17].

Nesse sentido, a utilização de modelo animal, especialmente roedores, tem sido amplamente adotada a fim de mimetizar um ambiente obesogênico o qual tenha sucesso em reproduzir o atual panorama observado em seres humanos. Razões importantes, como o baixo custo de manutenção, facilidade de manipulação e reprodução em curto tempo, além da importante proximidade filogenética com o ser humano, justificam os estudos com animais [18, 19]. Embora existam importantes técnicas de manipulação genética empregadas em roedores para o estudo da obesidade, tais como cepas *knock-out/knock-in*, normalmente usadas para testar a funcionalidade de genes associados à obesidade [20], a reprodução de um ambiente de carácter semelhante ao do humano, porém, garantindo que as variáveis possam ser cuidadosamente controladas e acompanhadas e, além disso, que reproduzam o fenótipo metabólico propício ao desenvolvimento da obesidade, ainda é um desafio para a comunidade científica.

Mediante a relevância científica do assunto, o objetivo foi de estabelecer um modelo de obesidade em ratos com causas e características similares a obesidade em seres humanos por meio da administração de dieta hipercalórica e hiperlipídica adicionadas à uma solução de frutose, introduzida em fases precoces da vida.

REVISÃO DA LITERATURA

Tecido adiposo / Obesidade

A gênese da obesidade é altamente complexa e envolve múltiplos mecanismos fisiológicos celulares, neurais, moleculares, endócrinos e bioquímicos, atuando de maneira diferente, isolada ou conjuntamente, respeitando as diferenças biológicas e genéticas entre os indivíduos e seu ambiente [3, 21].

A obesidade, ou acúmulo de tecido adiposo em mamíferos, tem como principal causa a ingestão excessiva de alimentos em detrimento ao gasto de energia, possuindo relação direta com o sedentarismo [5, 21, 22]. Sobre esse contexto, é importante salientar que o organismo de crianças e adolescentes, ao longo da fase de crescimento e desenvolvimento, sofre hiperplasia e hipertrofia de células de gordura, ou seja, aumento no número e no tamanho dos adipócitos, respectivamente. Tal fato ocorre devido ao desequilíbrio energético pendulado para o lado positivo (consumo excessivo de energia). No entanto, estudos apontam que, ao alcançarem a fase adulta, é mais provável que a hipertrofia predomine sobre a hiperplasia [5, 23, 24].

É consenso na literatura que dietas hipercalóricas e hiperlipídicas elevam o peso corporal, causado pelo acúmulo exacerbado de lipídios corporais, o qual pode estimular a produção e secreção hormonal, resultando em hipertrofia cardíaca e renal seguida de elevação da pressão arterial sistêmica [21, 24, 25].

O percentual elevado de gordura corporal, em especial o acúmulo na região visceral, resulta em elevado risco para o desenvolvimento de DCNT's, hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica, entre outras [6, 26]. Mensurações simples, tais como circunferências corporais, massa corporal total, índice de massa corporal, e ainda mais específico, a determinação da gordura corporal, podem ser úteis não apenas para o diagnóstico, mas, também, na identificação dos riscos associados à obesidade ou excesso de adiposidade [27].

É sabido que o acúmulo de lipídios corporais é resultado do armazenamento excessivo de triacilgliceróis (TAG) nos diversos depósitos de tecidos adiposos brancos (TAB) [23, 28, 29]. Dessa forma, sabe-se que a quantidade de TAG armazenado no TAB é decorrente da razão entre as velocidades de síntese (lipogênese) e de degradação (lipólise) deste substrato. Períodos onde a razão lipogênese/lipólise é menor que 1, como durante o jejum ou exercícios físicos prolongados e/ou de alta intensidade, os adipócitos liberam ácidos graxos (AGs) livres e glicerol

a fim de serem utilizados como fonte de energia em diversos tecidos corporais, como o fígado, músculos esquelético e cardíaco e cérebro (apenas o glicerol). Os AGs não oxidados, ou não liberados pelos adipócitos, podem ser novamente reesterificados em TAG, reconstituindo-se como fonte de energia armazenada no TAB^[30,31]. Em contraste, períodos de balanço energético positivo, como o pós-prandial, onde a lipogênese está estimulada, os AGs são captados dos quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), com participação da enzima lipase lipoproteica (LPL), resultando na síntese de TAG nos tecidos.

Fatores ambientais/comportamentais têm sido considerados como principais condutores no desenvolvimento da obesidade em crianças, adolescentes, adultos e idosos. Não obstante, o sedentarismo é apontado como parte importante nesse processo, com destaque para a população ocidental^[3,25], a redução no gasto energético, ocasionada pela baixa necessidade de energia e, em muitos casos associada a ingestão excessiva de alimentos altamente energéticos (ricos em gordura e carboidratos) são, na maioria das vezes, considerados os fatores comportamentais mais determinantes para o desenvolvimento da obesidade^[2,3].

Lipogênese / Adipogênese

O metabolismo de lipídios nos tecidos corporais sofre regulação de diferentes fatores, tais como os hormonais, disponibilidade de substratos e, ainda, as necessidades energéticas do organismo. O acúmulo de energia na forma de gordura é determinado pelo balanço entre a síntese (lipogênese) e degradação (lipólise-oxidação dos ácidos graxos), sendo esse fenômeno denominado de *turnover* energético^[24].

O acúmulo elevado de tecido adiposo em humanos, inerente aos mamíferos, deve-se, entre outros fatores, à sobrevivência da espécie; no entanto, nas atuais condições da vida moderna, podemos dizer que esse aspecto é negativo se relacionado à evolução do ser humano. Atualmente, sabe-se que não só o maior consumo de calorias ingerida, mas, também, a composição de nutrientes, pode levar à obesidade^[24]. O aumento na proporção de carboidratos e gorduras (principalmente as saturadas) na dieta, é considerado a principal causa do maior estímulo à lipogênese (*i.e.* síntese aumentada de TGL); por outro lado, refeições contendo maior proporção de proteínas dietéticas vêm sendo utilizadas como estratégias moduladoras com o intuito de reduzir os estoques de lipídios, sobretudo por elevar a termogênese e a mobilização

de AGs e glicerol para oxidação nas células [24, 32-35].

O balanço energético positivo influencia fortemente a lipogênese, no entanto, dietas que contêm quantidades desproporcionais de nutrientes fornecedores de energia (carboidratos, proteínas e lipídios), como por exemplo, refeições ricas em carboidratos, estimulam a síntese de AGs tanto pelo fígado como pelos adipócitos, resultando em acúmulo plasmático desse substrato no período pós-prandial, o que eleva a captação hepática desses componentes; em conjunto, esses fenômenos configuram-se como fatores de risco para o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) [5, 36]. Além disso, a hiperglicemia estimula a lipogênese por meio da conversão glicolítica da glicose em acetil-CoA, substrato precursor da síntese de AGs, via Malonil-CoA, principalmente quando o excesso não é utilizado para a ressíntese de ATP via fosforilação oxidativa. Além disso, a hiperglicemia induz a produção e secreção de insulina em detrimento à de glucagon [5, 36, 37].

A insulina, por estimular a síntese de AGs, aumenta a possibilidade de desenvolvimento de DHGNA, além de elevar o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos. Dietas ricas em glicose estimulam, via humoral, as células β -pancreáticas a liberarem grandes quantidades de insulina para a corrente sanguínea, o que ocasiona aumento da ligação deste hormônio aos seus receptores de membrana, iniciando o estímulo para uma reação em cascata de fosforilação via tirosina quinase, com subsequente acionamento dos mecanismos de captação de nutrientes pelas células via proteínas de transporte de glicose GLUT (do acrônimo - OpenGL Utility Toolkit) [36]. Outro possível efeito advindo da hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia na lipogênese, tanto hepática quanto em adipócitos, se dá pelo estímulo à proteína ligada aos elementos reguladores de esteróis-1 (SREBP-1), conhecida por ser um fator de transcrição para a síntese de colesterol e de AGs, os quais atuam mediando os comandos para que ocorra lipogênese [24]. Sabe-se que dietas ricas em AGs poli-insaturados regulam negativamente a expressão de SREBP-1, podendo ser este um mecanismo eficiente na redução da lipogênese pelos tecidos adiposo e hepático [24].

A síntese *de novo* de AGs ocorre no citosol de células adiposas e hepáticas (principalmente) e necessita de unidades de dois carbonos na forma de acetil-CoA e de equivalentes redutores provenientes do $\text{NADPH}^+ \text{H}^+$. A principal forma de geração de acetil-CoA no citosol é por meio da enzima ATP-Citrato liase (ATP-CL), que atua sobre o citrato (forma de transporte destas unidades da mitocôndria para o citosol) proveniente da mitocôndria

(Figura 1). Parte do Acetil-CoA participa da formação de AG na forma de malonil-CoA numa reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACX) [38].

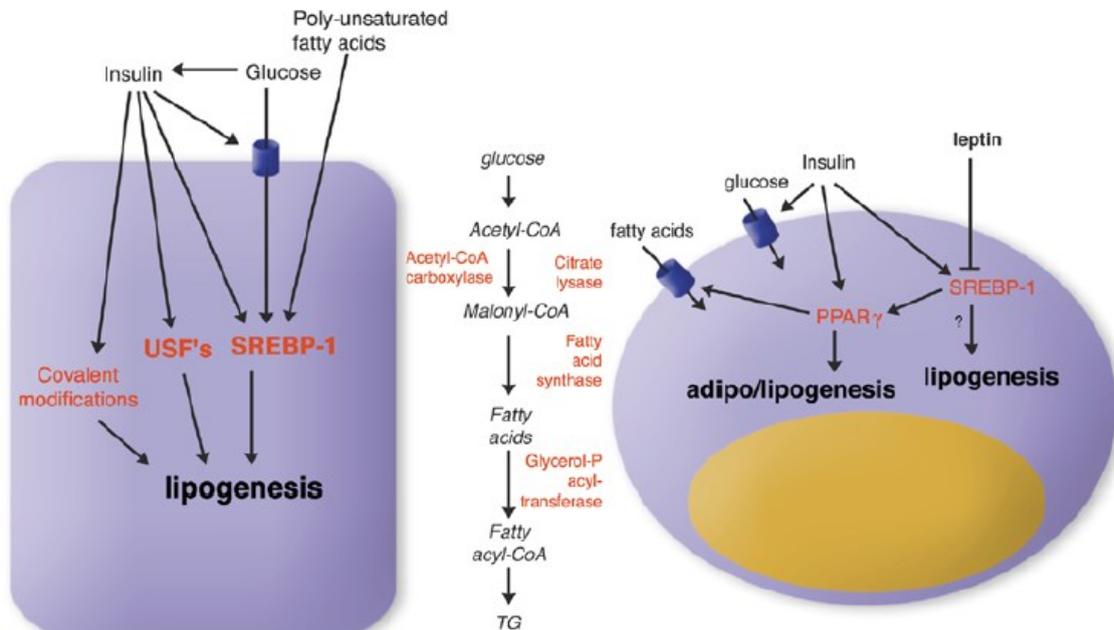


Figura 1. Mecanismos estimuladores da lipogênese e adipogênese: regulação da lipogênese pelo fígado (esquerda) e pelo adipócito (direita). SREBP-1 (Fator de Transcrição Regulador de Esteróis Ligado a Proteína – 1), USF's (Fator Estimulador de Síntese), PPAR- γ (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma) [23].

Tecido adiposo como órgão secretório endócrino

A ingestão alimentar é um ato fisiológico regulado por uma complexa maquinaria neuroendócrina, onde o centro de controle está no núcleo arqueado localizado no hipotálamo. Observa-se que existem distintos tipos de neurônios no núcleo arqueado, onde há populações de neurônios responsáveis pela produção de hormônios orexígenos, como o neuropeptídeo Y (NPY) e o AgRP (*agouti related protein*), e outras populações de neurônios responsáveis pela produção de hormônios anorexígenos, como por exemplo, o CART (transcrito regulado por cocaína ou anfetamina) e o α -MSH (peptídeo α -melanócito estimulante), derivado do POMC (pró-opiomelanocortina). Os neurônios responsáveis pela secreção dos neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos são capazes de elevar a expressão de receptores para a leptina (Ob-Rb), atuando como moduladores altamente responsivos aos efeitos deste hormônio [26, 39]. Dessa forma, situações que aumentam a concentração plasmática de leptina apresentam-se como inibidores dos neurônios orexígenos (NPY/AgRP) e estimuladores dos neurônios anorexígenos

(α -MSH/CART), proporcionando um estado de saciedade prolongado ou de menor consumo alimentar [40, 41].

O tecido adiposo passou a ser considerado um órgão secretório endócrino a partir da subsequente identificação e caracterização da leptina, uma molécula sinalizadora derivada dos adipócitos que atua principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo [26]. Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo secreta uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, tais como; adiponectina, resistina, proteína ligada ao retinol – 4 (RBP-4) e Interleucina 6 (IL-6) [26]. A partir dessa descoberta, novas funções do tecido adiposo foram apresentadas, como a capacidade de seus compostos em atuar a nível sistêmico, tanto autócrina como parácrina. Para tanto, além de desempenhar importante papel na homeostase energética, por meio da sua capacidade de armazenamento e liberação de energia, o tecido adiposo apresenta uma importante e eficiente maquinaria de comunicação entre os órgãos, incluindo o SNC.

Leptina (do Grego *Leptos*) significa magro, e é um polipeptídeo com peso molecular igual a 16-kDa composta por 167 aminoácidos com estrutura homóloga a outras citocinas. Vários fatores podem estimular a produção e liberação de leptina pelos adipócitos, dentre elas o estado nutricional, o tecido adiposo visceral e a massa total do tecido de gordura são considerados responsáveis diretos pela elevação dos níveis deste hormônio no plasma [26]. Inúmeros fatores podem regular a liberação e a inibição da leptina, como por exemplo insulina, glicocorticoides, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além de hormônios estrogênicos. Em contrapartida, a diminuição ocorre pela ação da atividade do agonista adrenérgico- β 3, hormônios androgênicos, presença de AGs livres, GH e o receptor ativado do proliferador de peroxossomo (Peroxisoma Proliferator-Activity Receptor- γ - *Ppar γ*). Estudos apontam que dietas hipercalóricas elevam os níveis plasmáticos de leptina, da mesma forma que dietas restritas em calorias reduzem bruscamente os seus níveis [21, 25, 36, 39].

A expressão de TNF- α mostra-se aumentada tanto em roedores quanto em seres humanos obesos, situação que pode ser correlacionada com a resistência à insulina. Uma outra influência advinda da maior expressão de TNF- α na obesidade é a modulação de genes envolvidos na captação e no estoque de AGs livres e glicose e, ainda, pela estimulação de fatores de transcrição (ex: SREBP-1) envolvidos na adipogênese e lipogênese tanto em adipócitos quanto no fígado [42]. Quanto ao aspecto inflamatório, sabe-se que há forte associação

entre obesidade e IL-6 plasmática, uma vez que os adipócitos são responsáveis pelos elevados níveis dessa citocina. É importante destacar que a IL-6 é considerada citocina pró-inflamatória quando produzida pelos adipócitos, o que também parece estar relacionado com o desenvolvimento da resistência à insulina e intolerância à glicose [39].

Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular esquelético possui diversas funções no organismo humano e é constituído de fibras que podem ser caracterizadas segundo suas propriedades morfológicas, contráteis e metabólicas. Sua morfologia é um importante fator da determinação da massa muscular esquelética, pois apresenta cerca de 75 a 90% do volume muscular. Estudos indicam que o tecido muscular possui características heterogêneas e, por isso, apresenta distinções, principalmente em relação ao seu poder de contração. A unidade funcional do tecido muscular é formada por uma unidade motora (motoneurônio) e um grupo de filamentos musculares, onde a união desses formam a fibra muscular [43, 44].

As fibras musculares esqueléticas, também denominadas de fibras estriadas esqueléticas ou células musculares estriadas, possuem conformação alongada e estreita, são células multinucleadas com os núcleos concentrados na periferia da fibra próximo à membrana sarcoplasmática que, por sua vez, possui citoesqueleto constituído principalmente por miofibrilas presentes em todo o comprimento da fibra. As miofibrilas são fortemente organizadas, formadas por filamentos proteicos chamados sarcômeros. Os sarcômeros são formados por proteínas contráteis como a actina e a miosina, responsáveis pela contração muscular e pela formação de estriações vistas transversalmente à fibra [44, 45].

O músculo estriado esquelético possui um potencial de crescimento intimamente relacionado com sua morfologia, que pode ser representado através do comprimento da fibra, da área de secção transversa e do número total de fibras musculares [43, 44, 46]. As características contráteis e metabólicas do tecido muscular são determinadas pelo tipo de fibra e isso gerou um grande interesse da comunidade científica, pois diversos pesquisadores tomaram como objetivo estudar suas características. Conhecidamente, há 4 tipos de fibras musculares esqueléticas: fibra muscular de contração lenta ou do tipo I, com característica oxidativa e coloração avermelhada devido à alta presença de mioglobinas e maior vascularização; fibra muscular de contração rápida ou do tipo IIa, com característica oxido-glicolítica e coloração avermelhada determinada

pela presença de mioglobina; fibra muscular de contração rápida ou do tipo IIx ou IIb, com característica glicolítica e coloração esbranquiçada determinada pela menor presença de mioglobina e menor vascularização; e fibra de contração muito rápida ou do tipo IId, com características glicolítica e coloração esbranquiçada. As fibras do tipo IId, também chamadas de fibras de contração muito rápida, são conhecidas por existir em coelhos, contudo, não são expressas em seres humanos [43-45].

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa estabelecer um modelo de obesidade em ratos com causas e características similares a obesidade em seres humanos por meio da administração de dieta hipercalórica e hiperlipídica adicionada à uma solução de frutose, introduzida em fases precoces da vida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Acompanhar diariamente o desenvolvimento dos animais por meio do registro dos parâmetros:

- Massa corporal;
- Ingestão alimentar;
- Ingestão hídrica.

Caracterização da obesidade:

- Determinação do índice de Lee;
- Determinação da ingestão energética total;
- Determinação da eficiência energética;
- Determinação do índice de adiposidade visceral.

Determinar a massa dos órgãos:

- Rins;
- Fígado;
- Coração.

Determinar a massa dos tecidos de gordura:

- Epididimal;
- Perirrenal;
- Retroperitoneal;
- Omental;
- Subcutâneo Inguinal.

Determinar a massa dos tecidos musculares:

- Sóleo;
- Gastrocnêmio;
- Tibial anterior;
- Extensor longo dos dedos;
- Quadriceps.

Analisar a morfologia e morfometria do tecido adiposo:

- Subcutâneo inguinal.

Avaliar a concentração sérica dos hormônios e citocinas:

- Leptina;
- Adiponectina;
- Insulina;
- IL-6;
- TNF- α .

Determinar os seguintes parâmetros bioquímicos:

- Glicemia de jejum;
- Triglicerídeos;
- Colesterol total e Frações.

Avaliar, de modo indireto, a atividade funcional das células β -pancreáticas bem como o nível de resistência e sensibilidade à insulina por meio dos modelos:

- *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (Homa-IR);
- Homeostasis Model Assessment of B-Cell Function (Homa-CF β);
- *Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index* (QUICKI).

REFERÊNCIAS

1. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation (WHO Technical Report Series 894). WHO Geneva; 2015.
2. Batch J, Baur L. Behaviour change involving the whole family is more likely to be successful. *MJA*. 2005;182(3):130-5.
3. Kelly AS, Barlow SE, Rao G, Inge TH, Hayman LL, Steinberger J, et al. Severe obesity in children and adolescents: identification, associated health risks, and treatment approaches a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;128(15):1689-712.
4. Organization WH. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf. 2003.
5. Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
6. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, et al. Obesity-related hypertension: Pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—A position paper of the The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *Obesity*. 2013;21(1):8-24.
7. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 2000. WHO Technical Report Series. 2013;894.
8. Xavier H, Izar M, Faria Neto J, Assad M, Rocha V, Sposito A, et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013;101(4):1-20.
9. Rasool S, Geetha T, Broderick TL, Babu JR. High Fat With High Sucrose Diet Leads to Obesity and Induces Myodegeneration. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1054-.
10. Xu H. Obesity and metabolic inflammation. *Drug discovery today Disease mechanisms*. 2013;10(1-2).
11. Park SY, Choi GH, Choi HI, Ryu J, Jung CY, Lee W. Depletion of mitochondrial DNA causes impaired glucose utilization and insulin resistance in L6 GLUT4myc myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):9855-64.
12. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;297(5):E999-e1003.
13. Putti R, Migliaccio V, Sica R, Lionetti L. Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics and Morphology in High Fat Diet Induced Obesity and Insulin Resistance: Focus on Dietary Fat Source. *Frontiers in physiology*. 2016;6:426.
14. Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Preclinical models for obesity research. *Disease models & mechanisms*. 2016;9(11):1245-55.
15. Leech RM, McNaughton SA, Timperio A. The clustering of diet, physical activity and sedentary behavior in children and adolescents: a review. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*. 2014;11:4.
16. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2007;15(4):798-808.
17. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015;26(4):193-200.

18. Lee AW, Cox RD. Use of mouse models in studying type 2 diabetes mellitus. *Expert reviews in molecular medicine*. 2010;12.
19. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology*. 2007;9(9).
20. Cox RD, Church CD. Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(2):155-64.
21. Rosini TC, da Silva ASR, de Moraes C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2012;58(3):383-7.
22. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public health reports*. 1985;100(2):126.
23. Cinti S. The adipose organ. *Adipose tissue and adipokines in health and disease*: Springer; 2007. p. 3-19.
24. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*. 2001;2(4):282-6.
25. King BM. The modern obesity epidemic, ancestral hunter-gatherers, and the sensory/reward control of food intake. *American Psychologist*. 2013;68(2):88.
26. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(2):129-39.
27. Sahra E. Expert Committee Recommendations Regarding the Prevention, Assessment, and Treatment of Child and Adolescent Overweight and Obesity: Summary Report. 2007.
28. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2001;60(03):319-28.
29. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. *Comprehensive Physiology*. 1964.
30. Ruud J, Brüning JC. Metabolism: Light on leptin link to lipolysis. *Nature*. 2015;527(7576):43-4.
31. van Hall G. The Physiological Regulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Supply and Oxidation During Moderate-Intensity Exercise. *Sports Medicine*. 2015;45(1):23-32.
32. Paddon-Jones D, Westman E, Mattes RD, Wolfe RR, Astrup A, Westerterp-Plantenga M. Protein, weight management, and satiety. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(5):1558S-61S.
33. Pedrosa RG, Donato Junior J, Tirapegui J. Dieta rica em proteína na redução do peso corporal. *Revista de Nutrição*. 2009;22(1):105-11.
34. Jeor STS, Howard BV, Prewitt TE, Bovee V, Bazzarre T, Eckel RH. Dietary Protein and Weight Reduction. *kidney*. 2001;19:22.
35. Weigle DS, Breen PA, Matthys CC, Callahan HS, Meeuws KE, Burden VR, et al. A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(1):41-8.
36. Pereira LO, Francischi RPD, Lancha Jr AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47(2):111-27.
37. Klusek J, Witek B, Klusek J, Tomasik E, Kaminska A, Kolataj A. The influence of glucagon on the concentration of triacylglycerols and cholesterol in the liver and kidney of mice. *ARCHIV FUR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING*. 2013;56.

38. Volpe JJ, Marasa JC. Hormonal regulation of fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthesis in mammalian adipose tissue and liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1975;380(3):454-72.
39. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
40. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-95.
41. Souza GF, Solon C, Nascimento LF, De-Lima-Junior JC, Nogueira G, Moura R, et al. Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Scientific reports*. 2016;6:29290.
42. Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α implications for insulin resistance. *Diabetes*. 2002;51(11):3176-88.
43. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011;91(4):1447-531.
44. Silva MDP, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2007;36:21-31.
45. Piovesan RF, Martins MD, Fernandes K, Bussadori SK, Selistre-de-Araújo HS, Mesquita-Ferrari RA. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. *Fisioter Mov*. 2009;22(2):211-20.
46. Lee S, Joo S, Ryu Y. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat science*. 2010;86(1):166-70.

ADMINISTRAÇÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA CONTENDO GORDURA SATURADA ASSOCIADA À SOLUÇÃO DE FRUTOSE, EM FASES PRECOSES DA VIDA, SIMULOU A OBESIDADE HUMANA EM RATOS EUTRÓFICOS

Thiago da Rosa Lima¹, Nair Honda Kawashita¹

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso.

INTRODUÇÃO: Dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (HC/HL) adicionadas de bebidas açucaradas, altamente palatáveis, são utilizadas na indução da obesidade experimental, simulando a estreita associação destas com o aumento da obesidade mundial. Entretanto, os resultados presentes na literatura são bastante contraditórios e de difícil comparação, especialmente devido aos diferentes teores de lipídios saturados, os quais variam de 45 a 60% do valor calórico total. **OBJETIVO:** Estabelecer um modelo de obesidade, com causas e características similares a obesidade humana, por meio de dieta HC/HL adicionada a uma solução de frutose introduzida em fases precoces da vida. **MÉTODOS:** Vinte e sete ratos machos Wistar (21 dias de idade; 43±2g) foram divididos em 3 grupos (n=9/grupo): Controle (C): receberam dieta AIN93/G + água; Hipercalórica/hiperlipídica contendo 45% de lipídeos + solução com frutose 10% (HC/HL1); Hipercalórica/hiperlipídica contendo 60% de lipídeos + solução com frutose 10% (HC/HL2). As dietas foram administradas durante 70 dias ininterruptos. A massa corporal (MC) e ingestões alimentar (IA) e hídrica (IH) foram determinadas 3x/sem. Ao final do experimento, após jejum alimentar de 12h, os animais foram anestesiados por inalação com excesso de CO₂, pesados e medidos quanto ao comprimento corporal (naso-anal) e eutanasiados por meio de exsanguinação via decapitação em guilhotina específica para esse fim. A confirmação da obesidade foi realizada por meio da eficiência energética (EE), pelo índice de Lee (IL) e pelo índice de adiposidade (IAV) calculado pela soma dos tecidos adiposos: epididimal+retroperitoneal+omental+perirrenal. A análise morfológica do tecido adiposo subcutâneo inguinal foi realizada em cortes histológicos corados em HE, e a área de adipócitos analisada com apoio do software ImageJ. Os músculos sóleo, gastrocnêmio, tibial anterior, EDL e quadríceps foram excisados e pesados. Amostras sanguíneas (8mL) foram coletadas para a determinação da concentração sérica de citocinas e hormônios, bem como dos parâmetros bioquímicos por meio de kits comerciais. Os parâmetros clínicos foram obtidos por meio dos índices HOMA2-IR, HOMA-CF β e QUICKI. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA-One-way) ou Kruskal Wallis e, quando diferenças foram observadas, utilizou-se post hoc de Tukey ou Dunn's, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas em software (SPSS[®] 21), e os resultados foram expressos como média±DP (p<0,05). **RESULTADOS:** MC foi maior no HC/HL1 se comparado a HC/HL2, sendo ambos maiores que C (p<0,001). IA foi maior em HC/HL1 do que em HC/HL2 (p=0,02), sem diferença para C. No que se refere à IH, não houve diferença entre HC/HL1 e HC/HL2, mas ambos foram maiores que C (p=0,02). A EE (p<0,001) e o IAV (p<0,001) foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 quando comparados ao C. O IL foi maior em HC/HL1 comparado ao C (p=0,02), e sem diferença comparado a HC/HL2. A massa relativa do fígado foi maior em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C (p<0,001). As massas relativas do coração (p=0,003) e dos rins (p=0,016) foram menores em HC/HL1 comparado aos demais grupos. A massa relativa dos músculos sóleo (p=0,01), gastrocnêmio (p<0,001), tibial anterior (p<0,001), EDL (p<0,001) e quadríceps (p<0,001) foram menores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C. As massas

relativas dos tecidos adiposos retroperitoneal ($p < 0,001$), perirrenal ($p < 0,001$), omental ($p = 0,004$), epididimal ($p = 0,002$) e subcutânea inguinal ($p < 0,001$) foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C. A área dos adipócitos foi maior em HC/HL1 ($3828,0 \pm 1047,0$) comparado a C ($1516,0 \pm 591,8$) e HC/HL2 ($2644,0 \pm 552,1$) ($p < 0,0001$), e HC/HL2 foi maior do que C. Os níveis séricos de triglicérides, VLDL-c e HDL-c foram maiores em HC/HL1 e HC/HL2 comparados ao C ($p < 0,001$); HC/HL1 apresentou maiores valores ($p = 0,007$) de colesterol se comparado aos demais grupos. O colesterol não HDL foi menor em HC/HL1 e HC/HL2 comparado ao C ($p = 0,004$). HC/HL1 apresentou maior concentração de leptina ($2563,0 \pm 1444$ pg/mL, $p = 0,001$) e insulina ($950,0 \pm 346,0$ pg/mL ($p = 0,001$) se comparado a C (leptina= $337,4 \pm 168,9$ pg/mL e insulina= $535,6 \pm 277,2$ pg/mL) e a HC/HL2 (leptina= $1263,0 \pm 937,6$ pg/mL e insulina= $332,0 \pm 264,5$ pg/mL). O grupo HC/HL1 não apresentou diferença no HOMA2-IR ($4,5 \pm 1,9$) e HOMA-CF β ; ($121,1 \pm 39,6$) quando comparado ao grupo C ($2,7 \pm 1,9$; $89,3 \pm 53,1$), porém, em ambos foram obtidos valores mais elevados quando comparados ao HC/HL2 (HOMA2-IR $1,8 \pm 1,1$, $p = 0,018$) e (HOMA-CF β = $36,4 \pm 24,4$, $p = 0,0007$). QUICKI foi maior em HC/HL2 ($0,35 \pm 0,08$, $p = 0,011$) comparado ao HC/HL1 ($0,28 \pm 0,02$), no entanto, ambos não se mostraram diferentes em relação ao C ($0,30 \pm 0,03$).

CONCLUSÃO: Dieta HC/HL1 adicionada à solução com frutose 10% promoveu características similares à obesidade humana, uma vez que os animais apresentaram aumento do Índice de Lee, hiperadiposidade subcutânea e visceral, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e sinais clínicos de sensibilidade à insulina (sem prejuízo às células- β). Embora não tenham apresentado alteração no Índice de Lee, os animais pertencentes a HC/HL2 denotaram menor hiperadiposidade subcutânea e visceral, e sinais clínicos de prejuízo à função das células- β . Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo permitem concluir que dieta contendo 45% de lipídeos associada a solução de frutose 10% foi eficiente em induzir um modelo de obesidade com características semelhantes à obesidade humana.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta hipercalórica/hiperlipídica. Insulina. Leptina. Frutose.

Abstract

INTRODUCTION: Hypercaloric and hyperlipidic diets (HC/HL), added with highly palatable sugary beverages, are used to induce experimental obesity, simulating their close association with increased obesity worldwide. However, the results in the literature are quite contradictory and difficult to compare, especially due to the different levels of saturated lipids, which vary from 45 to 60% of the total caloric value. **OBJECTIVE:** To establish a model of obesity, with causes and characteristics similar to human obesity, by means of HC/HL diet added to a solution of fructose introduced in the early stages of life. **METHODS:** Twenty-seven male Wistar rats (21 days of age, 43 ± 2 g) were divided into 3 groups ($n = 9$ /group): Control (C): received diet AIN93/G + water; hypercaloric/hyperlipidic containing 45% lipids + 10% fructose solution (HC/HL1); hypercaloric/hyperlipidic containing 60% lipids + 10% fructose solution (HC/HL2). Diets were given for 70 uninterrupted days. Body mass (MC) and food (FI) and water intake (WI) were determined 3x /wk. At the end of the experiment, the animals were anesthetized by inhalation with excess CO₂, weighed and measured in terms of body length (naso-anal) and euthanized by means of exsanguination through a guillotine-specific decapitation for this purpose. Confirmation of obesity was performed through energy efficiency (EE), Lee's index

(IL) and adiposity index (AI) calculated by the sum of adipose tissue: epididimal + retroperitoneal + omental + perirenal. Morphological analysis of subcutaneous inguinal adipose tissue was performed in histological sections stained in HE, and the area of adipocytes analyzed with the support of ImageJ software. The soleus, gastrocnemius, tibialis anterior, EDL and quadriceps muscles were excised and weighed. Blood samples (8mL) were collected for the determination of the serum concentration of cytokines and hormones, as well as biochemical parameters through commercial kits. Clinical parameters were obtained using the HOMA2-IR, HOMA-CF β and QUICKI indices. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA-One-way) or Kruskal Wallis and, when differences were observed, post-hoc of Tukey or Dunn's, respectively. Statistical analyzes were performed in software (SPSS® 21), and the results were expressed as mean \pm SD ($p < 0.05$). **RESULTS:** MC was higher in HC/HL1 when compared to HC/HL2, both higher than C ($p < 0.001$). FI was higher in HC/HL1 than in HC/HL2 ($p = 0.02$), with no difference in C. Regarding WI, there was no difference between HC/HL1 and HC/HL2, but both were greater than C ($p = 0.02$). EE ($p < 0.001$) and AI ($p < 0.001$) were higher in HC/HL1 and HC/HL2 when compared to C. IL was higher in HC/HL1 compared to C ($p = 0.02$), and without difference compared to HC/HL2. The relative liver mass was higher in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C ($p < 0.001$). The relative masses of the heart ($p = 0.003$) and the kidneys ($p = 0.016$) were lower in HC/HL1 compared to the other groups. The relative mass of the soleus ($p = 0.01$), gastrocnemius ($p < 0.001$), anterior tibial ($p < 0.001$), EDL ($p < 0.001$) and quadriceps ($p < 0.001$) muscles were lower in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C. The relative masses of the retroperitoneal ($p < 0.001$), perirenal ($p < 0.001$), omental ($p = 0.004$), epididimal ($p = 0.002$) and subcutaneous inguinal ($p < 0.001$) adipose tissues were higher in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C. The area of adipocytes was higher in HC/HL1 (3828.0 ± 1047.0) compared to C (1516.0 ± 591.8) and HC/HL2 (2644.0 ± 552.1) ($p < 0.001$), and HC/HL2 was higher than C. Serum triglyceride levels, VLDL-c and HDL-c were higher in HC / HL1 and HC/HL2 compared to C ($p < 0.001$) ; HC/HL1 presented higher values ($p = 0.007$) of cholesterol when compared to the other groups. Non-HDL cholesterol was lower in HC/HL1 and HC/HL2 compared to C ($p = 0.004$). HC/HL1 had a higher concentration of leptin (2563.0 ± 1444 pg/mL, $p = 0.001$) and insulin (950.0 ± 346.0 pg/mL ($p = 0.001$) compared to C (leptin= 337.4 ± 168.9 pg/mL and insulin= 535.6 ± 277.2 pg/mL) and HC/HL2 (leptin= 1263.0 ± 937.6 pg/mL and insulin= 332.0 ± 264.5 pg/mL. HC/HL1 group showed no difference in HOMA2-IR (4.5 ± 1.9) and HOMA- β (121.1 ± 39.6) when compared to group C ($2,7 \pm 1,9$; $89,3 \pm 53,1$), however, showed higher values when compared to HC/HL2 (HOMA2-IR 1.8 ± 1.1 , $p = 0.018$) and (HOMA-CF β = 36.4 ± 24.4 , $p = 0, 0007$). QUICKI was higher in HC/HL2 (0.35 ± 0.08 , $p = 0.011$) compared to HC/HL1 (0.28 ± 0.02), however, both were not different in relation to C (0.30 ± 0.03). **CONCLUSION:** HC/HL1 diet added to the solution with 10% fructose promoted similar characteristics to human obesity, since the animals presented increase of the Lee Index, subcutaneous and visceral hyperadiposity, hyperleptinemia, hyperinsulinemia and clinical signs of insulin sensitivity to β -cells). Although there was no change in the Lee Index, the animals belonging to HC/HL2 showed lower subcutaneous and visceral hyperadiposity, and clinical signs of impaired β -cell function. Taken together, the results of the present study allow us to conclude that a diet containing 45% lipids associated with 10% fructose solution was efficient in inducing an obesity model with characteristics similar to human obesity.

Keywords: Obesity. Hypercaloric / hyperlipidic diet. Insulin. Leptin. Fructose.

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma patologia de ocorrência pandêmica [47-50], tendo seu desenvolvimento derivado de múltiplas etiologias [50, 51]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 38 milhões de pessoas vão a óbito anualmente em razão de doenças crônicas não-transmissíveis, dentre as quais, grande parte delas está associada à obesidade, incluindo doenças cardiovasculares [52] e componentes da síndrome metabólica (SM), tais como dislipidemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 [18], além de lesão renal [51], doenças respiratórias e câncer [53]. Portanto, nota-se que a obesidade representa um dos maiores desafios para a saúde pública em todo o mundo e, sobretudo, possui papel importante na redução na expectativa de vida *per se* em decorrência de suas comorbidades [50, 51, 54].

Embora inevitavelmente haja participação genética quanto ao desenvolvimento da obesidade, a maior parcela de responsabilidade está associada ao estilo de vida [55]. A ingestão excessiva de alimentos e bebidas altamente energéticos, ricos em gordura saturada e carboidratos de alto índice glicêmico, associada à falta de atividade física voluntária caracterizam, atualmente, o denominado ambiente “*obesogênico*” [47, 56]. Dessa forma, a despeito da origem da obesidade, um desequilíbrio positivo sustentado entre a quantidade de energia consumida e energia dispendida durante o dia é um fator determinante para o acúmulo excessivo de gordura corporal (hiperadiposidade) [57, 58].

Por outro lado, o aumento da síntese bem como do armazenamento de triacilgliceróis nos adipócitos, denotado pela aumento do tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) dos mesmos [59-61], assim como de doenças associadas à obesidade, frequentemente ocorrem de forma concomitante às alterações nas secreções de hormônios, como insulina e glucagon, e de adipocinas, tais como leptina, adiponectina, TNF- α e IL6 [62]. O tecido adiposo, ao secretar essas substâncias na corrente sanguínea, adquire papel importante tanto na atividade metabólica quanto na regulação do gasto energético, pois atua de forma local (ação autócrina, i.e., sobre o próprio tecido adiposo) e sistêmica (ação parácrina) sobre diversos tecidos alvo, incluindo o músculo estriado esquelético e o sistema nervoso central (SNC) [63].

A utilização de modelo animal, especialmente roedores, tem sido amplamente adotada a fim de mimetizar um ambiente obesogênico o qual tenha sucesso em reproduzir o atual panorama observado em seres humanos. Razões importantes, como o baixo custo de manutenção, facilidade de manipulação e reprodução em curto tempo, além da importante

proximidade filogenética com o ser humano, justificam os estudos com animais [18, 19]. Embora existam importantes técnicas de manipulação genética empregadas em roedores para o estudo da obesidade, tais como cepas *knock-out/knock-in*, normalmente utilizadas para testar a funcionalidade de genes associados à obesidade [20], a reprodução de um ambiente de carácter semelhante ao do humano, porém, garantindo que as variáveis possam ser cuidadosamente controladas e acompanhadas e, além disso, que reproduzam o fenótipo metabólico propício ao desenvolvimento da obesidade, ainda é um desafio para a comunidade científica.

Para tanto, uma gama variada de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas altamente palatáveis têm sido utilizadas com tal finalidade [54, 64-70]. Algumas características são esperadas por modelos de obesidade induzidos por dieta, tais como a hiperfagia, redução das taxas metabólicas, acúmulo de gordura corporal, inflamação sistêmica de baixo grau com elevação dos níveis de citocinas inflamatórias, como por exemplo, TNF- α e IL6, aumento da lipólise e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [71], além de menor atividade nervosa simpática [56, 64-66]. Embora a elevada ingestão de gorduras saturadas desempenhe um papel importante no desenvolvimento da obesidade [55, 66], alguns modelos ainda respondem de forma heterogênea aos estímulos fornecidos [72].

Na expectativa de validar um modelo de obesidade de baixo custo, de fácil reprodutibilidade e, ainda, com características semelhantes às do ser humano com o intuito de ser utilizado em proposições terapêuticas futuras, White et al. (2013) avaliaram, durante 10 semanas, ratos da linhagem Swiss, machos, saudáveis e recém desmamados (idade entre 21 e 23 dias), os quais foram alimentados com dieta padrão normolipídica (DP) ou dieta (DH) contendo 57,6% de lipídios (hiperlipídica). Os principais resultados deste estudo mostraram que os animais alimentados com DH apresentaram maiores valores de massa corporal, de acúmulo de gordura corporal e de índice de adiposidade, mesmo com os animais alimentados com DP tendo apresentado menores ingestões alimentar e hídrica. Além disso, a glicemia foi maior nos animais DH, o que favoreceu o desenvolvimento de resistência à insulina e de intolerância à glicose [66].

A heterogeneidade observada nos diferentes modelos de indução à obesidade por dieta justifica o grande número de trabalhos realizados, os quais visam compreender melhor os aspectos que envolvem a obesidade e a SM. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um modelo de obesidade com causas e características similares a obesidade humana

por meio da administração de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas adicionadas de solução de frutose em fases precoces da vida de ratos eutróficos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) postulado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*U.S. National Institute of Health*) e conforme determinado pelas resoluções brasileiras específicas em relação à bioética em experimento com animais (Lei n.º. 11.794, de 8 de outubro de 2008 sob o Decreto n.º. 6.899 de 15 e julho de 2009). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá (Protocolo n.º. 23108.169089/2016-09).

Desenho experimental

Foram utilizados 27 ratos albinos machos (*Rattus Novergicus*), da linhagem Wistar, logo após o desmame, com 21 ± 1 dias de idade, massa corporal inicial de 43 ± 2 g, procedentes do Biotério Central da UFMT. A duração do experimento foi de 70 dias ininterruptos, onde os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos ($n=9/\text{grupo}$), conforme a dieta e hidratação ofertada: grupo alimentado com dieta controle e água (C); grupo alimentado com dieta hipercalórica/hiperlipíca contendo 45% de gordura saturada e hidratação incluindo 10% de frutose (HC/HL1); e grupo alimentado com dieta hipercalórica/hiperlipíca contendo 60% de gordura saturada e hidratação incluindo 10% de frutose (HC/HL2). Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso livre à alimentação e à hidratação, permaneceram em gaiolas coletivas com 5 e 4 ratos/gaiola por grupo e foram mantidos sob condições ambientais controladas no que se refere à temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), à umidade relativa do ar (45% a 55%) e ao fotoperíodo, com ciclo claro/escuro de 12/12h. A massa corporal (MC) e as ingestões alimentar (IA) e hídrica (IH) foram mensurados 3 vezes por semana, sempre em horários fixos (12:00 h), durante todo o experimento, por meio de balança digital (Denver Instruments® -

modelo P8001 com graduação de 0,1g). A IH foi verificada com auxílio de uma proveta de polipropileno com graduação mínima de 5 mL e capacidade total de 1000 mL.

Preparação e composição da dieta

A preparação das dietas foi realizada por empresa especializada no ramo de ração para animais de experimentação (PRAGSOLUÇÕES® biociências) e ofertadas na forma de *pellets* a fim de respeitar as características de roedores dos animais. A dieta controle foi elaborada de acordo com recomendação pelo *American Institute of Nutrition* (AIN93G) para ratos em crescimento, totalizando um valor de 3,86 kcal/g. As dietas HC/HL1 e HC/HL2 tiveram como base a AIN93G adicionada, em diferentes proporções, de gordura saturada (banha) conforme se segue: dieta HC/HL1 recebeu 45% de banha de porco do valor energético total, totalizando 4,71 kcal/g e, a dieta HC/HL2 recebeu 60% de banha de porco valor energético total totalizando 5,27 kcal/g (tabela 1).

Tabela 1 Composição das dietas purificadas ofertadas ao grupo controle e aos grupos hipercalórica/hiperlipídica.

Componentes da dieta	Controle		HC/HL1		HC/HL2	
	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹
Teor proteico (caseína > 85%)	200,0 ¹	680,0	200,0 ²	680,0	200,0 ²	680,0
Amido de milho	395,9 ¹	1583,6	225,9 ²	903,6	113,5 ²	454,0
Dextrina	132,0 ¹	528,0	132,0 ¹	528,0	132,0 ¹	528,0
Sacarose	100,0 ¹	400,0	100,0 ¹	400,0	100,0 ¹	400,0
Óleo de soja	70,0 ¹	630,0	40,0 ²	360,0	40,0	360,0
Gordura de porco (saturada)	-	-	200,0 ²	1800,0	312,5	2812,5
Fibras	50,0 ¹	-	50,0 ¹	-	50,0 ¹	-
Mistura mineral (AIN – 93G-MX)	35,0 ³	7,73	35,0 ³	7,73	35,0 ³	7,73
Mistura vitamínica (AIN-93-VX)	10,0 ⁴	9,74	10,0 ⁴	9,74	10,0 ⁴	9,74
L-metionina	1,6 ⁵	6,40	1,6 ⁵	6,40	1,6 ⁵	6,40
L-cistina	3,0 ⁴	12,0	3,0 ¹	12,0	3,0 ¹	12,0
Birtartarato de colina	2,5 ¹	-	2,5 ¹	-	2,5 ¹	-
TBHQ	0,001 ¹	-	0,004 ¹	-	0,007 ¹	-
Total	1000,0	3857,5	1000,0	4707,5	1000,0	5270,4

Grupos controle (C), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2).

¹ Purified Rodent Diet AIN-93G [73]; ³ Mix de mistura mineral AIN-93-MX [73]; ⁴ Mix de mistura vitamínica AIN-93-VX [73]; ⁵ Correção de AA essenciais (metionina) [74]. Antioxidante Tert-butil-hidroquinona (TBHQ).

Eutanásia e coleta sanguínea

Após jejum alimentar de 12 h, com manutenção da hidratação (somente água), os animais foram previamente aclimatizados em ambiente tranquilo, com incidência luminosa reduzida, a fim de minimizar o estresse; feito isso, os mesmos foram anestesiados por inalação com excesso de CO₂, pesados e medidos quanto ao comprimento corporal (naso-anal)^[75] e eutanasiados por meio de exsanguinação via decapitação em guilhotina específica para esse fim (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O sangue coletado foi mantido por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado a 3.000 rpm, durante 10 minutos, para obtenção do soro. As amostras de soro foram aliqüotadas em volumes adequados em microtubos de polipropileno (Eppendorf[®]) e preservadas pelo armazenamento à temperatura de -86°C (Ultra Freezer da marca COLDLAB; modelo CL58086V) a fim de evitar descongelamentos repetidos e degradação dos analitos em futuras análises. Imediatamente após a eutanásia e coleta sanguínea, os diferentes tecidos adiposos intra-abdominais (viscerais) e subcutâneo (inguinal), musculares de membro inferior (sóleo, gastrocnêmio, tibial anterior, extensor longo dos dedos, quadríceps) e os órgãos fígado, coração e rins foram completamente excisados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, com subsequente transferência para o Ultra Freezer à temperatura de -86°C para análises futuras.

Caracterização da obesidade

A caracterização da obesidade foi definido por meio das medidas de MC (g) e complementadas pelo índice de Lee (LEE index), calculado da seguinte forma: [Index Lee = $\sqrt[3]{MC \text{ (g)}/CNA \text{ (cm)} \times 1000}$]; MC=massa corporal; CNA=comprimento naso-anal; e índice de adiposidade visceral (IAV) *post-mortem* utilizando a fórmula: IAV=[Tecido adiposo visceral (TAV)/MC] x 100. O TAV (g) foi medido pela soma dos seguintes constituintes do tecido adiposo: epididimal + retroperitoneal + omental + perirrenal (denota o estoque de gordura corporal total) ^[76]. A ingestão energética total (kcal/dia) foi obtida por meio da fórmula: Ingestão alimentar média (IA) x Energia dietética metabolizável (adotado valores de 4 kcal para carboidratos e proteína e 9 kcal para lipídios). A partir dos dados supracitados, foi calculada a eficiência energética (EE) considerando a razão do ganho de peso (g) pela ingestão energética

(kcal) x 100 ^[77].

Preparação para análise histológica e área do adiposo subcutâneo inguinal

Uma pequena porção do tecido adiposo subcutâneo inguinal de cada animal foi fixada em solução tamponada de paraformaldeído (4%) por 24h; feito isso, a mesma foi submetida ao processamento histológico (desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina) para análises morfológica e da celuridade (área dos adipócitos). Os cortes histológicos foram realizados com auxílio de aparelho criostato (Carl Zeiss modelo HYRAX modelo C 25 UV) com espessura de 4 µm e corados com hematoxilina e eosina (H/E) ^[78].

As fotomicrografias em lente objetiva de 10x foram obtidas por meio de câmera monocromática AxioCAM MrC acoplada a microscópio Carl ZEISS Axio ScopeA1. Um total de 10 imagens representativas de cada grupo foram utilizadas para quantificação individual da área dos adipócitos e, para determinação da área dos adipócitos, foi adotado protocolo de análise de imagem semi-automatizado utilizando *software* de acesso livre ImageJ (link para download: www.imagej.net/Downloads) ^[79].

Análises clínicas e bioquímicas

As determinações bioquímicas e hormonais foram realizadas a partir das amostras de soro. Os níveis hormonais de insulina e leptina (pg/mL) e das citocinas TNF- α e IL6 (pg/mL) foram determinados por luminescência (Luminex 200TM) pelo método xMap - Multiple Analyte Profiling, por meio de *kits* comerciais (Millipore[®]) específicos para ratos (St Charles-Missouri-USA). A adiponectina (ng/mL) foi determinada pelo método de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando *kits* comerciais Millipore[®] (St Charles-Missouri- USA).

As concentrações de glicemia, triacilglicerol (TG), colesterol total (CT) e frações HDL-c, LDL-c e VLDL-c e ureia foram determinadas utilizando reagentes comerciais padronizados (Bioclin[®] Quibasa Química Ltda. – Belo Horizonte/MG), com auxílio de aparelho espectrofotométrico (Modelo UV-mini 1240 da marca SHIMATZU) ou leitor de microplacas para teste de Elisa (Modelo SpectraMax[®] 190 UV-Vis da marca Molecular Devices).

As análises clínicas foram investigadas por meio da avaliação de risco e predição para

o desenvolvimento de doenças associadas à obesidade, e foram realizadas por determinação da resistência à insulina (RI) e da capacidade de funcional das células beta (CF- β) utilizando técnicas de medidas estáticas relativas aos constituintes plasmáticos insulinemia de jejum e glicemia de jejum, representadas pelos índices *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA2-IR), *Homeostatic Model Assessment of β -cell function* (HOMA-CF β) e *Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index* (QUICKI). A RI foi avaliada pelo índice HOMA2-IR, obtido por meio do programa HOMA calculator versão 2.2.3. (<http://www.dtu.oxac.uk/> acessado em março de 2018), o índice QUICKI por meio da equação (QUICKI=1/ Log insulina jejum (μ U.L) + Glicemia de jejum (mg/dL))^[80], e a CF- β foi determinada por meio da equação ([HOMA-CF β =20 x insulina (μ U.L)/Glicose (mmol.L) – 3,5])^[81].

Análise Estatística

Os dados que atenderam a prerrogativa de normalidade foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA one-way), ou Kruskal Wallis, realizados por *Statistical Analysis Software Package* (SPSS[®] versão 22). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e, quando observadas, utilizou-se *post hoc* de Tukey ou Dunn's, respectivamente. Resultados foram expressos como média \pm Desvio Padrão (DP). O tamanho da amostra (*A Priori test*) e tamanho do efeito (*Effect Size*) foram determinados com auxílio do pacote Gpower versão 3. As classificações respeitaram a convenção da seguinte forma: $f = 0,10$ Pequena (S) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (L).

RESULTADOS

Massa corporal Inicial e final, Ganho de Massa Corporal e Índice de Lee

Os resultados referentes à MC inicial e final, ganho de MC e Índice de Lee estão descritos na tabela 2. A MC inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,999$). MC final ($p < 0,001$) e ganho de MC ($p < 0,001$) foram significativamente maiores em HC/HL1 em relação a HC/HL2, sendo ambos maiores que o C. IA em HC/HL1 foi estatisticamente maior que HC/HL2 ($p = 0,024$), e não houve diferença entre HC/HL1 e HC/HL2

quando comparados ao C. Não houve diferença na IH entre HC/HL1 e HC/HL2, sendo ambos significativamente maiores que C ($p=0,02$). A ingestão calórica não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,129$). A EE foi maior em HC/HL1 e HC/HL2 se comparados ao C ($p<0,001$). O Índice de Lee foi estatisticamente maior em HC/HL1 se comparado ao C ($p=0,02$), entretanto, não houve diferença quando ambos foram comparados ao HC/HL2.

Tabela 2 Massa corporal inicial e final, ganho de massa corporal, ingestões alimentar, hídrica e calórica, eficiência energética e índice de Lee de ratos alimentados com dieta controle e dietas hipercalórica/hiperlipídica.

Parâmetros	Grupos			p-valor	Effect-Size
	C	HC/HL1	HC/HL2		
Massa corporal inicial (g)	44,6±9,0	44,5±9,4	44,6±9,5	0,999	0,25
Massa corporal final (g)	316,3±53,3 ^a	462,0±54,9 ^b	401,2±42,9 ^c	<0,001	9,16
Ganho de massa corporal (g)	271,7±45,3 ^a	417,5±48,8 ^b	356,6±37,5 ^c	<0,001	11,95
*Ingestão alimentar (g/sem)	297,2±82,5 ^{ab}	287,7±58,2 ^a	222,9±46,0 ^b	0,024	1,87
Ingestão hídrica (mL/sem)	193,3±51,6 ^a	374,3±161,6 ^b	373,1±209,0 ^b	0,020	1,11
*Ingestão calórica (kcal/sem)	1146,6±318,1	1353,3±273,7	1174,7±242,3	0,129	2,40
Eficiência energética (%)	2,37±0,37 ^a	3,08±0,34 ^b	3,04±0,30 ^b	<0,001	8,15
Índice Lee	315,6±8,9 ^a	331,5±10,5 ^b	322,6±12,8 ^{ab}	0,02	3,22

Grupos controle (C, n=9), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1, n=9); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2, n=9). Dados submetidos a análise de variância (Anova one-way) ou *Kruskal Wallis, e quando diferenças foram encontradas foi aplicado o *post hoc* de Tukey HSD ou *Dunn's, apresentado por letras sobrescritas ^{abc}; nível de significância de $p<0,05$. Valores expressos em Média±DP. Escala do tamanho do efeito (*Effect Size – teste f*) classificada conforme convenção: f = 0,10 Pequena (P) f = 0,25 Média (M) f = 0,40 Grande (G).

A evolução no ganho de MC (*time-course*) está apresentada na figura 1. Não houve diferença na MC entre os grupos até o final da segunda semana do estudo. A partir da terceira semana, o grupo HC/HL1 apresentou MC significativamente maior que HC/HL2, permanecendo até o final do estudo. A partir da sexta semana, HC/HL1 apresentou MC maior que o C, não havendo diferença em relação ao HC/HL2 até a nona semana do estudo. Ainda, O grupo HC/HL2 apresentou MC significativamente maior que o C somente a partir da nona semana, permanecendo assim até o final do estudo.

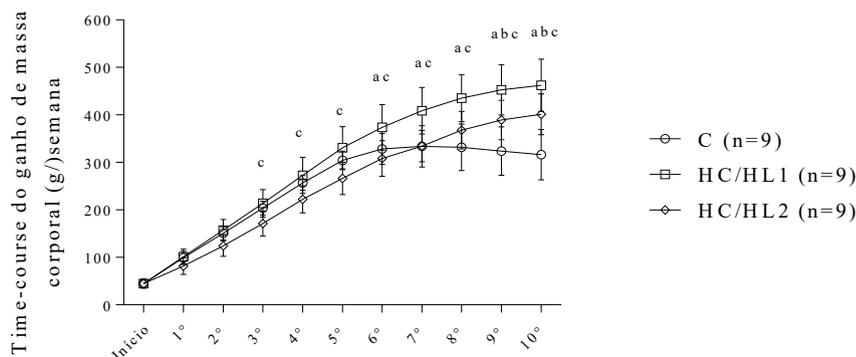


Figura 2 Ganho de massa corporal (time-course). Grupos controle (C), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2). Dados avaliados por análise de variância (Anova two-way), e quando diferenças foram encontradas aplicou-se Post hoc de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas: ^a para diferenças entre C vs. HC/HL1; ^b para diferenças entre C vs. HC/HL2; ^c para diferenças entre HC/HL1 vs. HC/HL2. Valores expressos em Média±DP e significância de $p < 0,05$.

Massa Relativa dos Tecidos

Os dados referentes à massa relativa dos órgãos, músculos e tecidos adiposos estão apresentados na tabela 3. O fígado foi significativamente maior em HC/HL2 e HC/HL1 se comparados ao C ($p < 0,001$). HC/HL1 apresentou massa relativa do coração significativamente menor que C e HC/HL2 ($p = 0,0036$). De forma semelhante, a massa relativa dos rins foi significativamente menor em HC/HL1 quando comparado a C e HC/HL2 ($p = 0,016$). Não houve diferença significativa na massa relativa do coração e dos rins entre HC/HL2 e C.

Sóleo ($p = 0,01$) e gastrocnêmio ($p < 0,001$) apresentaram massa relativa estatisticamente menor em HC/HL2 e HC/HL1 se comparados ao C. Tibial anterior foi menor em HC/HL1 comparado a C e HC/HL2, e HC/HL2 menor que C ($p < 0,001$). Não houve diferença no EDL entre HC/HL2 e HC/HL1, sendo ambos menores que o C ($p < 0,001$). Quadríceps foi significativamente menor em HC/HL1 quando comparado ao C e ao HC/HL2, sendo HC/HL2 menor que o C ($p < 0,001$).

A massa relativa das gorduras retroperitoneal ($p < 0,001$) e omental ($p = 0,004$) foram estatisticamente maiores em HC/HL1 e HC/HL2 se comparados ao C. Perirrenal foi significativamente maior em HC/HL1 quando comparado a C e HC/HL2, sendo HC/HL2 maior que C ($p < 0,001$). Epididimal foi maior em HC/HL1 comparado ao C ($p = 0,002$), sendo ambos semelhantes ao HC/HL2. O Índice de adiposidade visceral ($p < 0,001$) e a gordura subcutânea

inguinal ($p < 0,001$) foram estatisticamente maiores em HC/HL1 e HC/HL2 (não havendo diferença entre ambos) se comparados ao C.

Tabela 3 Massa relativa (%) dos órgãos, músculos e tecidos adiposos de ratos alimentados com dieta controle e dietas hipercalórica/hiperlipídica.

Massa dos órgãos (%)	Grupos			p-valor	ES
	C	HC/HL1	HC/HL2		
Fígado	2,4±0,2 ^a	2,8±0,2 ^b	2,9±0,2 ^b	<0,001	3,73
Coração	0,39±0,02 ^a	0,34±0,03 ^b	0,37±0,02 ^a	0,0036	2,05
Rins	0,71±0,08 ^a	0,62±0,05 ^b	0,67±0,05 ^a	0,0160	3,68
Massa dos músculos (%)	C	HC/HL1	HC/HL2	p-valor	ES
Sóleos	0,11±0,01 ^a	0,10±0,01 ^b	0,10±0,01 ^b	0,01	2,3
Gastrocnêmio	1,32±0,07 ^a	1,09±0,09 ^b	1,17±0,08 ^b	<0,001	13,6
Tibial anterior	0,40±0,03 ^a	0,32±0,03 ^b	0,36±0,03 ^c	<0,001	16,3
EDL	0,09±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,01 ^b	<0,001	14,1
Quadríceps	1,87±0,16 ^a	1,51±0,10 ^b	1,66±0,06 ^c	<0,001	2,8
Massa das gorduras (%)	C	HC/HL1	HC/HL2	p-valor	ES
Retroperitoneal	0,70±0,40 ^a	1,87±0,41 ^b	1,65±0,37 ^b	<0,001	25,4
Perirrenal	0,17±0,08 ^a	0,57±0,21 ^b	0,37±0,05 ^c	<0,001	2,0
Omental	0,07±0,03 ^a	0,13±0,04 ^b	0,11±0,03 ^b	0,004	2,5
Epididimal	1,00±0,42 ^a	1,82±0,46 ^b	1,47±0,46 ^{ab}	0,002	16,8
Índice de adiposidade	1,93±0,90 ^a	4,40±0,92 ^b	3,60±0,83 ^b	<0,001	20,6
Subcutânea inguinal	0,54±0,19 ^a	1,26±0,37 ^b	1,02±0,17 ^b	<0,001	2,7

Grupos controle (C, n=9), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1, n=9); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2, n=9). Dados avaliados por análise de variância (Anova one-way) e quando diferenças foram encontradas aplicou-se *Post hoc* de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas ^{abc}; Valores expressos em Média±DP e nível de significância de $p < 0,05$. Escala do tamanho do efeito (*Effect Size – teste f*) classificada conforme convenção: $f = 0,10$ Pequena (P) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (G).

Histologia e Área do Tecido Adiposo Subcutâneo Inguinal

A análise histológica do tecido adiposo subcutâneo inguinal denotou diferença no tamanho dos adipócitos entre os grupos (figura 2). A área dos adipócitos do grupo HC/HL1 (3828,0±1047,0) foi significativamente maior quando comparado aos grupos C (1516,0±591,8) e HC/HL2 (2644,0±552,1) ($p < 0,0001$), sendo HC/HL2 maior que C.

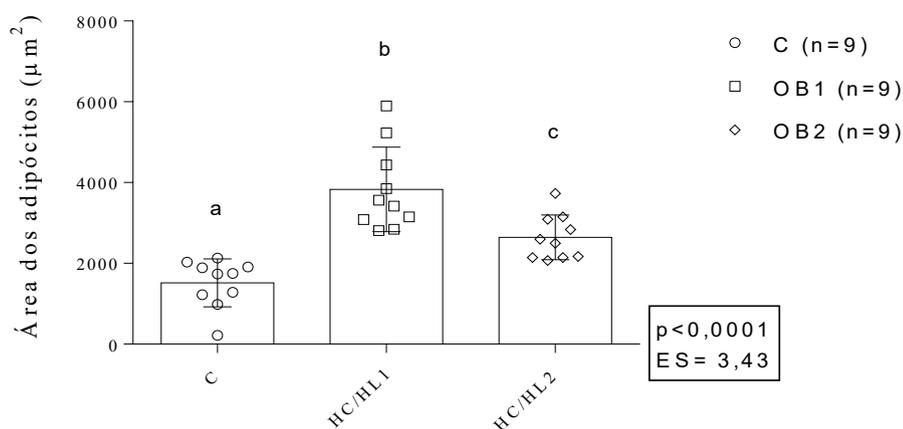
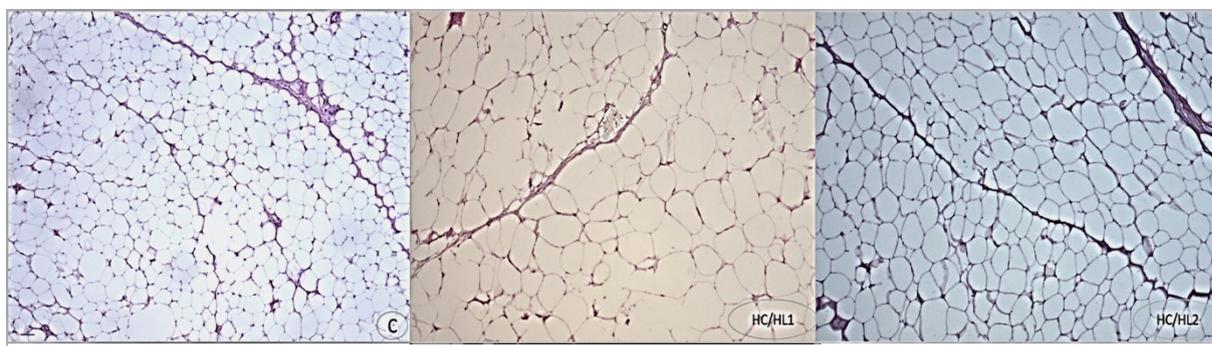


Figura 3 Fotomicrografia com coloração HE (Barra = 50 µm, objetiva 10x) do tecido adiposo subcutâneo inguinal dos Grupos controle (C), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2). A área dos adipócitos foi avaliada por análise de variância (Anova one-way) e quando diferenças foram encontradas aplicou-se o teste *Post hoc* de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas ^{ab}; Valores expressos em Média±DP e nível de significância de $p < 0,05$. Escala do tamanho do efeito (Effect Size – teste f) classificada conforme convenção: $f = 0,10$ Pequena (P) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (G).

Parâmetros bioquímicos

A tabela 4 apresenta os dados referentes ao perfil bioquímico (mg/dL). A glicemia não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,41$). Não houve diferença estatística na concentração de TG entre HC/HL1 e HC/HL2, no entanto ambos foram maiores que C ($p < 0,001$). O CT foi significativamente maior em HC/HL1 se comparado a C e HC/HL2. HDL-c não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,65$). LDL-c foi menor em HC/HL1 e HC/HL2 se quando comparados ao C ($p = 0,05$). VLDL-c foi estatisticamente maior em HC/HL1 e HC/HL2 quando comparados ao C ($p < 0,001$). O colesterol não HDL foi significativamente menor em HC/HL2 e HC/HL1 se comparados ao C ($p = 0,004$). A ureia não apresentou diferença entre os grupos ($p = 0,36$).

Tabela 4 Perfil bioquímico de ratos alimentados com dieta controle e dietas hipercalórica/hiperlipídica.

Perfil bioquímico (mg/dL)	Grupos			p-valor	Effect-Size
	C	HC/HL1	HC/HL2		
Glicemia	141±18	160±28	154±35	0,41	0,87
Triacilglicerol	45±10 ^a	62±11 ^b	73±10 ^b	<0,001	16,3
Colesterol Total	108±21 ^a	132±14 ^b	107±15 ^a	0,007	3,27
HDL-c	43±17 ^a	90±13 ^b	65±17 ^c	<0,001	7,04
LDL-c	56±10	34±20	38±13	0,05	1,67
VLDL-c	9,0±0,7 ^a	12,3±2,2 ^b	14,5±2,1 ^b	<0,001	17,01
Colesterol não HDL	68,6±19,7 ^a	42,3±15,0 ^b	41,9±11,1 ^b	0,004	2,85
Ureia	102,5±2,4	102,2±3,9	100,3±3,6	0,36	1,25

Grupos controle (C, n=8), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1, n=9); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2, n=9). Dados avaliados por análise de variância (Anova one-way) e quando diferenças foram encontradas aplicou-se *Post hoc* de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas ^{abc}; Valores expressos em Média±DP e nível de significância de $p < 0,05$. Escala do tamanho do efeito (*Effect Size – teste f*) classificada conforme convenção: $f = 0,10$ Pequena (P) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (G).

Parâmetros hormonais

Conforme apresentado na figura 2A, a concentração de insulina (pg/mL) foi estatisticamente maior em HC/HL1 (950,0±346,0) se comparado ao C (535,6±277,2) e ao HC/HL2 (332,0±264,5) ($p=0,001$). Glucagon (pg/mL) apresentou concentração significativamente menor em HC/HL2 (34,4±11,7) quando comparado ao C (73,2±46,2) ($p=0,047$), não havendo diferença quando ambos foram comparados ao HC/HL1 (50,9±26,0) (figura 2B). Não houve diferença estatística no que se refere à concentração de adiponectina (ng/mL) entre os grupos ($p=0,31$) (figura 2C). A figura 2D demonstra que HC/HL1 apresentou concentrações significativamente maiores de leptina (pg/mL) se comparado a C e HC/HL2 (337,4±168,9; 1263,0±937,6, respectivamente) ($p=0,001$). Não houve diferença nas concentrações de TNF- α (pg/mL) entre HC/HL1 (6,8±2,5) e HC/HL2 (7,2±1,6), sendo ambos estatisticamente menores que C (11,5±4,2) ($p=0,004$) (figura 2E). Não houve diferença nas concentrações de IL-6 entre HC/HL1 e HC/HL2 (337,5±293,8; 267,3±230,5, respectivamente), sendo ambos estatisticamente menores que C (886,3±595,1) ($p=0,007$) (figura 2F).

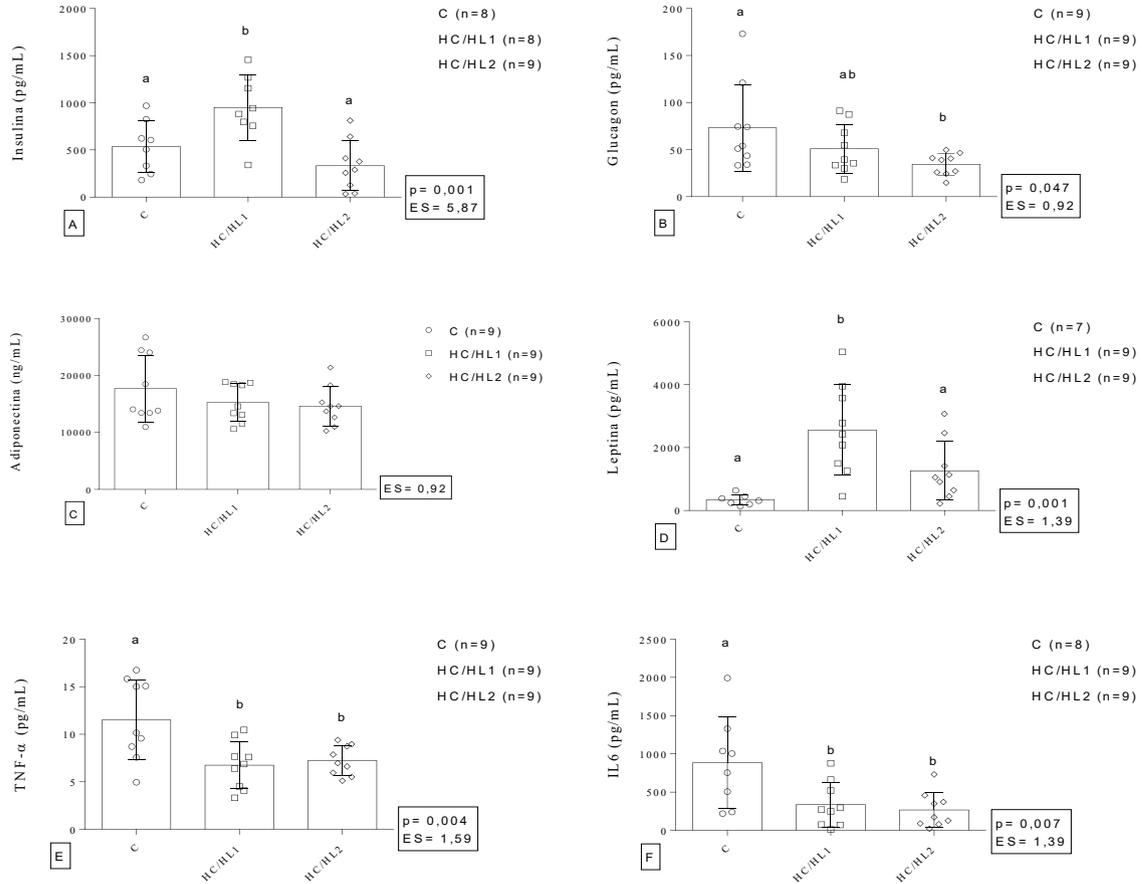


Figura 4 (A) Insulina; (B) glucagon; (C) adiponectina; (D) Leptina; (E) TNF- α ; (F) IL6. Grupos controle (C), hipercalórica/hiperlipídica1 (HC/HL1); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2). Dados avaliados por análise de variância (Anova one-way) e quando diferenças foram encontradas aplicou-se *Post hoc* de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas ^{ab}; Valores expressos em Média \pm DP e nível de significância de $p < 0,05$. Escala do tamanho do efeito (*Effect Size* – teste *f*) classificada conforme convenção: $f = 0,10$ Pequena (P) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (G).

Avaliação da resistência à insulina (HOMA2-IR), capacidade funcional das células β -pancreáticas (HOMA-CF β) e índice quantitativo da sensibilidade à insulina (QUICKI).

HOMA2-IR de HC/HL1 ($4,5 \pm 1,9$) foi significativamente maior que HC/HL2 ($1,8 \pm 1,1$) ($p = 0,018$), sendo ambos diferentes em relação ao C ($2,7 \pm 1,9$) (figura 3A). HOMA-CF β foi semelhante entre HC/HL1 ($121,1 \pm 39,6$) e C ($89,3 \pm 53,1$), sendo ambos maiores que HC/HL2 ($36,4 \pm 24,4$) ($p = 0,0007$) (figura 3B). QUICKI foi significativamente maior em HC/HL2 ($0,35 \pm 0,08$) quando comparado a HC/HL1 ($p = 0,011$), não havendo de ambos em relação ao C ($0,30 \pm 0,03$) (figura 3C).

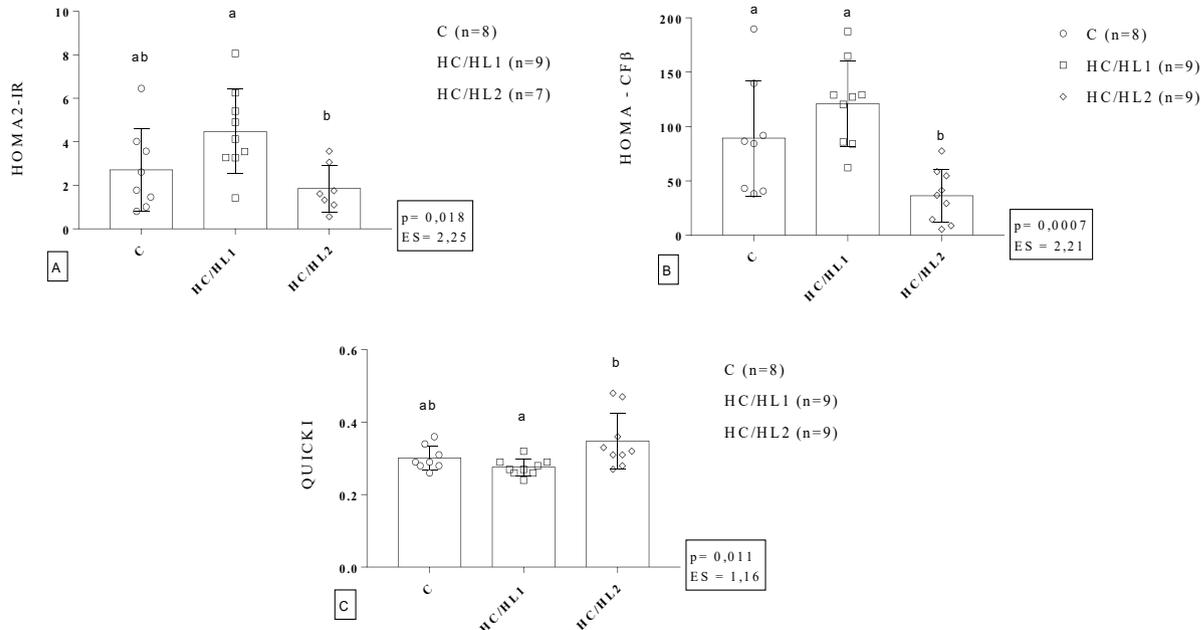


Figura 5 (A) Índice HOMA2-IR; (B) HOMA-CFβ; (C) QUICKI. Grupos controle (C), hipercalórica/hiperlipídica 1 (HC/HL1); hipercalórica/hiperlipídica2 (HC/HL2). Dados avaliados por análise de variância (Anova one-way) e quando diferenças foram encontradas aplicou-se o teste Post hoc de Tukey HSD, apresentado por letras sobrescritas ^{ab}; Valores expressos em Média±DP e nível de significância de $p < 0,05$. Escala do tamanho do efeito (*Effect Size – teste f*) classificada conforme convenção: $f = 0,10$ Pequena (P) $f = 0,25$ Média (M) $f = 0,40$ Grande (G).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo denotam que a dieta contendo 45% de gordura saturada, adicionada de solução de frutose, foi a que mais apresentou parâmetros similares aos comumente observados na obesidade e SM humanas. Essa afirmação é possível de ser feita, pois os animais apresentaram ganho progressivo de massa corporal, polidipsia, valores elevados índice de Lee, maior deposição de gorduras subcutânea e visceral associada à dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia), maior área de tecido adiposo inguinal, hiperinsulinemia e, ainda, hiperleptinemia, mesmo sem ter havido aumento na ingestão alimentar. Além disso, esses mesmos animais apresentaram aumento na massa relativa do fígado bem como redução na massa do coração e rins. Os animais alimentados com 60% de gordura saturada, adicionada de solução de frutose, apresentaram peso relativo do fígado e dos estoques de gordura visceral e subcutânea elevados (com exceção da gordura epididimal), redução no índice HOMA-CFβ e nas concentrações de glucagon, porém sem alterações em

insulina e leptina. Em contrapartida, ambas as dietas HC/HL, independentemente do percentual de gordura saturada ofertado, apresentaram maior eficiência energética bem como reduções da massa relativa dos músculos esqueléticos e dos marcadores inflamatórios (TNF- α e IL6).

É consenso que a oferta excessiva de gordura saturada, com elevado teor calórico, na dieta de animais associada ao baixo gasto energético, frequentemente resultam em aumento da massa corporal com acúmulo de gordura, bem como altera os perfis metabólico, bioquímico, hormonal e inflamatório, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e instalação da SM [72]. No presente estudo, pudemos observar que, nem sempre, o aumento no conteúdo de lipídios corporais e as alterações relacionadas às suas comorbidades têm relação direta com a quantidade de lipídios ingerida, visto que as alterações observadas no grupo HC/HL1 foram mais amplas e associadas à obesidade humana quando o mesmo foi comparado com o grupo HC/HL2.

A não alteração da IA, em termos quantitativos, observada em HC/HL1, e redução em HC/HL2, com aumento do Índice de Lee, sugere que o aumento na eficiência energética pode ter contribuído para este resultado, uma vez que a mesma está positivamente relacionada à capacidade de converter caloria ingerida em massa corporal [75]. O aumento do consumo hídrico, cuja solução continha 10% de frutose, observado nos dois grupos que receberam dieta HC/HL em relação ao grupo C, pode ter sido outro fator positivo para o aumento do índice de Lee, uma vez que a associação de dieta HC/HL com bebida contendo frutose pode proporcionar maior absorção de nutrientes e promover aumento na síntese e deposição de triglicerídeos no tecido adiposo [82, 83], contribuindo com o excesso do peso corporal, conforme observado no presente estudo.

Estudo semelhante, o qual utilizou ratos machos alimentados, durante duas semanas, com dietas ricas em lipídios (HL) ou rica em lipídios associada a frutose (HLF), demonstrou que HLF, mesmo gerando hipofagia, resultou em maior eficiência energética mitocondrial e aumento do fluxo lipídico para o músculo esquelético. Os autores relataram evidente economia de energia com elevada deposição de lipídios e redução da oxidação de ácidos graxos nos tecidos musculares, contribuindo, dessa forma, para a obesidade e o risco de desenvolvimento de RI [82].

Tem sido postulado que a oferta de dieta hiperlipídica pode causar anorexia e hipofagia [66, 84], conforme observado no grupo HC/HL2 do presente estudo. Esses achados demonstram que o desenvolvimento da obesidade ainda é mal compreendido e, portanto, gera lacunas ainda

não totalmente esclarecidas acerca de seu desenvolvimento. Embora haja crescente entendimento a respeito dos mecanismos atribuídos ao sistema nervoso central (SNC) e periférico sobre a IA ^[85], sendo estes comandados por complexas redes interconectadas entre sinais neuroendócrinos (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), hormonais (leptina, insulina, glucagon) e metabólicos (lipogênese, glicogênese, proteólise) ^[56, 67, 86], ainda são necessários estudos que investiguem as causas que expliquem porque mamíferos, mesmo ao serem submetidos a um balanço energético positivo associado ao baixo gasto energético, são fenotipicamente resistentes ao desenvolvimento da obesidade ^[87, 88].

O aumento dos estoques de gordura subcutânea e visceral bem como a maior área de adipócitos do tecido subcutâneo inguinal, conforme observado neste estudo, ocorrem comumente em resposta à ingestão crônica de dieta HC/HL, podendo ainda ser otimizado por meio da oferta de bebidas açucaradas ^[62, 83, 89-91]. O acúmulo de gordura visceral tem início quando o estoque de TG's no tecido adiposo subcutâneo, por ser limitado, excede sua capacidade de armazenamento ^[91]. Ainda que os adipócitos subcutâneos representem o local primariamente determinado para o armazenamento de lipídios, quando sobrecarregados, respostas coordenadas são realizadas para o controle e distribuição da energia adicional para novos locais. A partir disso, regiões específicas, incluindo compartimentos intra-abdominais (viscerais), fígado, miocárdio, músculo esquelético entre outros, tornam-se destino da energia excedente ^[17]. Para tanto, é importante ressaltar que todos estes compartimentos são considerados de elevado risco para alterações metabólicas e cardiovasculares ^[91]. Estudos realizados tanto em humanos ^[12] quanto em animais ^[14] mostraram que o aumento da massa e tamanho (hipertrofia), bem como do número de adipócitos (adipogênese), especialmente os intra-abdominais, favorecem disfunções metabólicas, o que está associado ao surgimento de fibrose tecidual, inflamação por meio da infiltração e ativação de células imunológicas nos tecidos, aumento da lipólise, elevação dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis e colesterol, além de resistência local e sistêmica à insulina acompanhada por secreção alterada de hormônios e adipocinas inflamatórias.

Evidências apontam que obesidade induzida por dieta de elevado conteúdo energético resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais ^[87], revelando-se mais eficiente quando iniciada precocemente ^[16]. O desequilíbrio metabólico positivo precoce, provido por ingestão crônica de ácidos graxos saturados de cadeia longa (AGSCL), igualmente realizado no presente

estudo, exerce risco adicional para alterações metabólicas, como por exemplo RI, intolerância à glicose, hipertrofia do tecido adiposo, aumento na síntese e deposição hepática de lipídios, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, podendo, ainda, elevar a produção e liberação de biomarcadores inflamatórios importantes, tais como TNF- α e IL6 [16, 72, 92].

No presente estudo, os animais induzidos à obesidade, em ambos os grupos, apresentaram dislipidemia aterogênica (DA), a qual pode ser traduzida como um conjunto de fatores de elevação potencial para DCV e metabólicas, manifestada por aumento dos níveis de TG's, colesterol total e fração VLDL-c [93]. Em adição, a DA tem relação com a elevação da toxicidade de neurônios e vasos cerebrais, induzindo à maior deposição de proteínas de caráter inflamatório com elevada capacidade de transpor a barreira hematoencefálica e causar danos ao cérebro, comprometendo, especialmente, a atividade hipotalâmica [94]. No entanto, resultados distintos têm sido reportados a respeito da quantidade e tipo de gordura ofertados de acordo com o predomínio de ácidos graxos saturados ou insaturados (mono ou poliinsaturados). Estudos demonstraram que os fatores de risco para obesidade e SM podem ser minimizados em razão do aumento no consumo de gordura mono e poli-insaturada em detrimento aos AGSCL [16, 95].

O tecido adiposo, uma vez saturado de TG's, altera a produção e liberação de peptídeos bioativos multifuncionais (adipocinas), os quais participam efetivamente da regulação do metabolismo energético corporal [87]. Nesta situação, a hiperadiposidade e excesso de TG livre estimula a migração e ativação de macrófagos do tipo 1 (M1) para o tecido adiposo, conduzindo hiperatividade inflamatória local por meio da maior concentração de adipocinas promotoras de inflamação crônica de baixo grau, tais como TNF- α e IL6 [87, 96, 97]. Apesar de, no presente estudo, não ter sido evidenciado ambiente inflamatório sistêmico denotado pela redução dos níveis de TNF- α e IL6, possivelmente em razão do tempo de indução à obesidade ou devido ao modelo adotado ter introduzido a dieta HC/HL em animais ainda em fase de crescimento e desenvolvimento, não descartamos a possibilidade de haver maior expressão desses marcadores inflamatórios diretamente nos tecidos mais afetados, tais como como adipócitos, músculo esquelético e fígado.

A hiperinsulinemia e hiperleptinemia, comumente presentes em obesos humanos, foram observadas no grupo HC/HL1, sendo alterações inerentes a modelos de indução à obesidade por dieta HC/HL [83, 98]. Concentrações elevadas desses hormônios derivam da baixa

sensibilidade, periférica ou central, de tecidos alvo ^[88]. Portanto, é sugerido que tal resposta decorra da ineficiência funcional intracelular dos mecanismos de transdução de sinal, ou, ainda, de prejuízos na interação hormônio-receptor.

É sabido que a insulina desempenha papel chave não apenas na homeostase glicêmica, mas, também, no controle do apetite, lipogênese, lipólise e dos níveis de ácidos graxos não esterificados circulantes (AGNE) ^[99]. No entanto, em condições onde há sobrecarga crônica de nutrientes altamente energéticos (*i.e* dieta HC/HL), os tecidos periféricos, como músculo esquelético e adiposo, têm sua interação hormônio-receptor prejudicada, tendo como causa defeitos na sinalização insulina-receptor, o que promove declínio tanto na quantidade quanto na autofosforilação do receptor de insulina, ou na fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina e da proteína Akt, que irá culminar no impedindo da translocação de GLUT4 (dependente de insulina) até a membrana celular ^[16, 100]. Os mecanismos supracitados são tidos por reduzir o estímulo da captação de glicose, ou, ainda, por estimular o pâncreas a liberar quantidades elevadas de insulina como medida compensatória para o controle da homeostase energética ^[17], o que poderia explicar a hiperinsulinemia como mecanismo auxiliar no controle homeostático glicêmico verificado no presente estudo.

Em contrapartida, o principal papel fisiológico do glucagon é estimular a gliconeogênese e glicogenólise a fim de manter a homeostase glicêmica. Além disso, sua atuação contrarregulatória frente à insulina desempenha um papel chave sobre o metabolismo da glicose, o que favorece o aumento do catabolismo celular e gliconeogênese e, por outro, lado reduz a glicólise ^[101]. Estudo utilizando camundongos com deficiência na produção de peptídeos derivados de Pró-glucagon (glucagon e GLP-1), mesmo alimentados com dieta rica em gordura, foram resistentes à obesidade, no entanto, apresentaram intolerância à glicose ^[102]. Opostamente, nosso estudo mostrou que os animais alimentados com a dieta HC/HL2 tiveram redução na concentração de glucagon comparado ao controle, entretanto, apresentaram obesidade e componentes da SM sem alterar a glicemia. Acreditamos que a composição da dieta HC/HL2, devido ao elevado teor de lipídios saturados (60% de banha), e somado a hidratação enriquecida com frutose, tenha afetado o funcionamento pancreático, conforme visto pelo HOMA-CF β , o que sugere prejuízo na manutenção constante da síntese e liberação de glucagon para a corrente sanguínea.

É importante ressaltar que a infiltração de lipídios no interior das células e o desenvolvimento de RI, especialmente nos tecidos músculo esquelético, adipócitos e fígado, possuem relação íntima e explícita com a alimentação crônica por meio de dieta HC/HL, o que afeta a função e morfologia desses tecidos. Estudos demonstraram que o excesso de substratos dentro das mitocôndrias, sobretudo na ausência de aumento da demanda energética, exige maior aporte de oxigênio como aceptor final de elétrons, o que resulta em maior produção e emissão de substâncias oxidantes primariamente advindas da atividade mitocondrial [13, 71]. A produção elevada de substância oxidantes, em associação à inflamação crônica de baixo grau, pode iniciar alterações na estrutura e função cardiovascular, tais como disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca patológica, fibrose cardíaca e disfunção contrátil ventricular [96]. Em adição, o excesso de lipídios associado à frutose, tal como realizado neste estudo, eleva a lipogênese hepática e induz a DHGNA [83]. Ratos adultos alimentados com a dieta rica em gordura e frutose apresentaram elevado grau de DHGNA com necrose do tecido hepático, além de elevação dos níveis de triacilgliceróis plasmáticos, ácidos graxos não esterificados, hiperinsulinemia e índices de resistência à insulina hepática, comparados a ratos alimentados com uma dieta controle [103].

A redução nos pesos relativos dos músculos esqueléticos, rins e coração, observados em ambos os grupos alimentados com dieta HC/HL pode ser explicada, ao menos em parte, por um estilo de vida sedentário associado a um prejuízo do metabolismo mitocondrial provocado pela oferta excessiva de lipídios saturados [71, 87, 88]. A respeito disso, a redução na demanda energética associado a elevados níveis de AGSCL prejudicam a bioenergética mitocondrial denotada por alterações anormais da morfologia mitocondrial, redução na expressão proteica de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1) e prejuízos nos processos adaptativos de fusão e fissão mitocondriais [13, 71]. Outra possibilidade, por nós arbitrada, é a hipótese do prejuízo metabólico durante o processamento alternativo (*splicing*) de pré-mRNA's [104], sendo esse responsável por reduzir a síntese proteica celular. Dessa forma, a redução da expressão proteica poderia interferir de forma direta na renovação celular, além de alterar o metabolismo e controle homeostático do organismo.

Estudo recente avaliou possíveis alterações sobre a expressão gênica dos músculos esqueléticos gastrocnêmio e plantar de ratos Sprague-Dawley machos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica acrescida ou de banha ou de ácidos graxos mono e polinsaturados (60 ou

10%; 45 ou 10%; 30 ou 10% de lipídios). Os resultados mostraram redução de aproximadamente 8% no processamento alternativo de pré-mRNA's dos músculos esqueléticos de ratos alimentados com dieta contendo 60% de gordura durante 2 ou 8 semanas comparados aos animais com dieta de 10% de gordura. Ainda, os autores presumiram que o efeito encontrado foi dependente do tipo de gordura, uma vez que houve a redução no processamento alternativo de Troponina T (Tnnt3) de ratos alimentados com dieta de 30% de gordura por um período de 1 a 8 semanas; entretanto, somente ocorreu redução no processamento alternativo de Tnnt3 em dietas com 45% de gordura enriquecidas com banha, resultado não observado em dietas enriquecidas com ácidos graxos mono ou polinsaturados ^[104]. Com base nos achados supracitados, podemos inferir que a redução da massa relativa dos músculos esqueléticos e dos órgãos coração e rins tenha sido ocasionada pelo excesso de lipídios saturados, proporcionando, assim, um desequilíbrio entre substâncias pró e antioxidantes, bem como prejudicando a função do controle bioenergético mitocondrial e da expressão proteica, possivelmente, por meio da redução do processamento de préRNA's.

Os achados no presente estudo necessitam de investigações mais detalhadas para elucidar os mecanismos que os originaram. Nossas limitações estão apresentadas nesse sentido: 1) não avaliamos a presença das citocinas TNF- α e IL6, tampouco a infiltração de células do sistema imune nos tecidos de interesse (ex: tecidos adiposos, músculo e fígado) para confirmar a hipótese da inflamação local; 2) testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina não foram realizados, o que poderia esclarecer a RI e defeitos na função endócrina do pâncreas; 3) não avaliamos a morfologia dos tecidos adiposos, musculares e hepáticos, bem como não foram avaliadas proteínas relacionadas à fissão e fusão mitocondrial, ou mesmo proteínas indutoras da biogênese mitocondrial (por exemplo, IGF-1 e PGC-1 α). Por fim, os resultados obtidos são de suma importância no que se refere aos modelos de indução a obesidade e os próximos esforços demandados por nosso grupo de pesquisa serão em prol de esclarecer as indagações por nós levantadas neste estudo.

CONCLUSÃO

Embora tenha sido verificada redução dos biomarcadores inflamatórios, os animais alimentados com dieta HC/HL associada à bebida enriquecida com frutose, independente do

teor de lipídio ofertado, foram, com sucesso, induzidos à obesidade. Observamos que a ingestão crônica da dieta HC/HL1 foi mais eficiente em desenvolver obesidade e componentes da SM se comparada a HC/HL2, bem como apresentou maior prejuízo sobre o controle metabólico, este confirmado pela hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemia e excesso de gordura visceral e subcutânea, além da perda de massa muscular ligada à obesidade (indício de instalação de obesidade sarcopênica). Finalmente, as dietas HC/HL associadas a bebida com frutose apresentaram grande afinidade com às alterações e danos metabólicos observadas na obesidade e SM humana, apresentando-se como modelos vantajosos e promissores para estudos que almejam compreender a fisiopatologia e possíveis tratamentos que combatam esses problemas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*. 1998;280(5368):1371-4.
2. James PT, Rigby N, Leach R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2004;11(1):3-8.
3. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic: World Health Organization; 2000.
4. Yazdi FT, Clee SM, Meyre D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ*. 2015;3:e856.
5. Hall ME, do Carmo JM, da Silva AA, Juncos LA, Wang Z, Hall JE. Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2014;7:75.
6. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881-7.
7. Lee AW, Cox RD. Use of mouse models in studying type 2 diabetes mellitus. *Expert reviews in molecular medicine*. 2010;12.
8. Organization WH. Noncommunicable diseases country profiles 2014. 2014.
9. Rahmouni K. Obesity-associated hypertension: recent progress in deciphering the pathogenesis. *Hypertension*. 2014;64(2):215.
10. Assaad H, Yao K, Tekwe CD, Feng S, Bazer FW, Zhou L, et al. Analysis of energy expenditure in diet-induced obese rats. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2014;19:967.

11. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *International journal of obesity* (2005). 2008;32 Suppl 7:S109-19.
12. Ribeiro G, Santos O. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2013;8(2):82-8.
13. Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James W. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public health nutrition*. 2004;7(1a):123-46.
14. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods in enzymology*. 2014;537:93.
15. Chen HC, Farese RV, Jr. Determination of adipocyte size by computer image analysis. *Journal of lipid research*. 2002;43(6):986-9.
16. McLaughlin T, Craig C, Liu LF, Perelman D, Allister C, Spielman D, et al. Adipose Cell Size and Regional Fat Deposition as Predictors of Metabolic Response to Overfeeding in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Humans. *Diabetes*. 2016;65(5):1245-54.
17. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2004;20(2):218-24.
18. Khan M, Joseph F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica*. 2014;2014:328592.
19. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology*. 2007;9(9).
20. Cox RD, Church CD. Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(2):155-64.
21. Da Silva AS, Pauli JR, Ropelle ER, Oliveira AG, Cintra DE, De Souza CT, et al. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(12):2180-8.
22. Rosini TC, da Silva ASR, de Moraes C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)*. 2012;58(3):383-7.
23. White S, Cercato LM, Araujo D, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância a glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(5):339-45.
24. Leisegang K, Bouic PJ, Menkveld R, Henkel RR. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):34.
25. Francisqueti FV, Santos KC, Ferron AJ, Lo AT, Minatel IO, Campos DH, et al. Fructose: Toxic effect on cardiorenal risk factors and redox state. *SAGE Open Medicine*. 2016;4:2050312116684294.
26. Pereira RM, Botezelli JD, da Cruz Rodrigues KC, Mekary RA, Cintra DE, Pauli JR, et al. Fructose Consumption in the Development of Obesity and the Effects of Different Protocols of Physical Exercise on the Hepatic Metabolism. *Nutrients*. 2017;9(4):405.
27. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, et al. Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *European Journal of Nutrition*. 2014;53(2):413-9.
28. Togo M, Konari N, Tsukamoto M, Kimoto R, Yamaguchi T, Takeda H, et al. Effects of a high-fat diet on superoxide anion generation and membrane fluidity in liver mitochondria in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2018;15:13.

29. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Current protocols in pharmacology*. 2012;Chapter 5:Unit5.61.
 30. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J nutr*. 1993;123(11):1939-51.
 31. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition BoA, Council NR. National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995. Fourth Revised Edition ed*. Washington (DC): National Academies Press (US)
- (c) 1995 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.; 1995.
32. Novelli EL, Souza GA, Ebaid GM, Rocha KK, Seiva FR, Mani F, et al. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease in rats. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2010;18(9):1754-61.
 33. Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *The British journal of nutrition*. 2013;110(10):1803-9.
 34. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*. 2007;41(1):111-9.
 35. Culling CFA. *Handbook of histopathological and histochemical techniques: including museum techniques*: Butterworth-Heinemann; 2013.
 36. Galarraga M, Campion J, Munoz-Barrutia A, Boque N, Moreno H, Martinez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of lipid research*. 2012;53(12):2791-6.
 37. Cutfield WS, Jefferies CA, Jackson WE, Robinson EM, Hofman PL. Evaluation of HOMA and QUICKI as measures of insulin sensitivity in prepubertal children. *Pediatric diabetes*. 2003;4(3):119-25.
 38. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care*. 2004;27(6):1487-95.
 39. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, et al. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *European journal of nutrition*. 2015;54(2):183-92.
 40. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & metabolism*. 2016;13:15.
 41. Estadella D, Oyama LM, Bueno AA, Habitante CA, Souza GI, Ribeiro EB, et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids in health and disease*. 2011;10(1):168.
 42. de Carvalho FP, Moretto TL, Benfato ID, Barthichoto M, Ferreira SM, Costa-Junior JM, et al. Central and peripheral effects of physical exercise without weight reduction in obese and lean mice. *Bioscience reports*. 2018;38(2).
 43. Duca FA, Sakar Y, Covasa M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013;24(10):1663-77.

44. Wu P, Zhang F, Dai Y, Han L, Chen S. Serum TNF- α , GTH and MDA of high-fat diet-induced obesity and obesity resistant rats. *Saudi Pharmaceutical Journal* : SPJ. 2016;24(3):333-6.
45. Alwahsh SM, Dwyer BJ, Forbes S, Thiel DH, Lewis PJ, Ramadori G. Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2).
46. Rosini TC, Silva AS, Moraes C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992). 2012;58(3):383-7.
47. White PA, Cercato LM, Araujo JM, Souza LA, Soares AF, Barbosa AP, et al. [Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(5):339-45.
48. Smith U. Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(5):1790-2.
49. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015;26(4):193-200.
50. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;297(5):E999-e1003.
51. Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Preclinical models for obesity research. *Disease models & mechanisms*. 2016;9(11):1245-55.
52. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* (Silver Spring, Md). 2007;15(4):798-808.
53. Velloso LA. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):151-8.
54. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(1):36-49.
55. Yang W, Shi H, Zhang J, Shen Z, Zhou G, Hu M. Effects of the duration of hyperlipidemia on cerebral lipids, vessels and neurons in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):26.
56. Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, Brown L. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013;24(6):1041-52.
57. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57(5):611-24.
58. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise immunology review*. 2010;16:105-18.
59. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008;52(6):968-74.
60. Fruhbeck G, Mendez-Gimenez L, Fernandez-Formoso JA, Fernandez S, Rodriguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition research reviews*. 2014;27(1):63-93.
61. Tan SX, Fisher-Wellman KH, Fazakerley DJ, Ng Y, Pant H, Li J, et al. Selective insulin resistance in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(18):11337-48.

62. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2003;284(4):E671-8.
63. Takagi Y, Kinoshita K, Ozaki N, Seino Y, Murata Y, Oshida Y, et al. Mice Deficient in Proglucagon-Derived Peptides Exhibit Glucose Intolerance on a High-Fat Diet but Are Resistant to Obesity. *PloS one*. 2015;10(9):e0138322.
64. Putti R, Migliaccio V, Sica R, Lionetti L. Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics and Morphology in High Fat Diet Induced Obesity and Insulin Resistance: Focus on Dietary Fat Source. *Frontiers in physiology*. 2016;6:426.
65. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Tussellino M, Carotenuto R, et al. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. *Experimental physiology*. 2014;99(9):1203-13.
66. Black AJ, Ravi S, Jefferson LS, Kimball SR, Schilder RJ. Dietary Fat Quantity and Type Induce Transcriptome-Wide Effects on Alternative Splicing of Pre-mRNA in Rat Skeletal Muscle. *The Journal of nutrition*. 2017;147(9):1648-57.