



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira**



**LUCIANA DE ALMEIDA ROCHA**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MIFEPRISTONA SOBRE HOMEOSTASE DA  
GLICOSE E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM  
CAMUNDONGOS OBESOS MSG**

MACAÉ

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira**



**LUCIANA DE ALMEIDA ROCHA**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MIFEPRISTONA SOBRE HOMEOSTASE DA  
GLICOSE E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM  
CAMUNDONGOS OBESOS MSG**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taís Fontoura de Almeida.  
Coorientadora: Janaina de Oliveira Chaves.

MACAÉ

2022

## Ficha Catalográfica

### CIP - Catalogação na Publicação

R672

Rocha, Luciana de Almeida

Efeito da administração da mifepristona sobre homeostase da glicose e doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos obesos MSG / Luciana de Almeida Rocha - Macaé, 2022.

52 f.

Orientador(a): Tais Fontoura de Almeida.

Coorientador(a): Janina de Oliveira Chaves.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

I. Obesidade. 2. Camundongos. 3. Mifepristona. 4. Corticosterona. 5. Insulina I. Almeida, Tais Fontoura de, orient. II. Chaves, Janaina de Oliveira, coorient. III. Título.

CDD 615.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé  
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

Luciana de Almeida Rocha

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MIFEPRISTONA SOBRE HOMEOSTASE DA  
GLICOSE E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM  
CAMUNDONGOS OBESOS MSG

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 19 janeiro de 2022.

Orientador(es):

*Taís Fontoura de Almeida*

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Taís Fontoura de Almeida.

UFRJ

*Janaina de Oliveira Chaves*

---

Janaina de Oliveira Chaves

Mestranda UFRJ

Banca Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Montani Raimundo

UFRJ

(CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5226925321575185>)

MSc. Letícia de Souza Figueiredo

Doutoranda Unicamp

(CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3851952622688326>)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Lúcia e Luciano,  
que sempre acreditam em meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, Lúcia e Luciano, pelo esforço para me oferecer a melhor educação possível, por serem exemplos de determinação, por me inspirar e apoiar nessa caminhada.

A minha irmã, Layza, parceira nas dificuldades e alegrias.

A minha avó, Denaci, por acreditar na educação e lutar por isso.

A minha tia, Patrícia, por custear minha educação básica, investindo nos meus sonhos quando ainda eu nem sabia juntar as letrinhas.

Aos meus professores. Aqueles que me ensinaram a caminhar, no Bom Passinho, aqueles professores da Escola Municipal Professora Vilma Tâmega que apesar das dificuldades e estigmas acreditam no potencial de seus alunos. Aos meus professores do IFF, por não apenas compartilhar conhecimento, mas formar cidadãos críticos. E aos professores da graduação por cada momento de aprendizagem e conhecimento adquirido.

A minha orientadora de Iniciação científica, Rosane. Admiro sua paixão pelo trabalho que realiza.

Aos meus coorientadores, Kênia e Joel, obrigada por dividir comigo seus conhecimentos e experiências laboratoriais, sempre de forma gentil e paciente. Irmãos científicos excepcionais.

A todos os integrantes do laboratório, pelo convívio, risadas e apoio sempre que necessário.

A todos que contribuíram para realização desse trabalho e a todos aqueles que sempre lutaram, acreditaram e fizeram ciência. Sinto-me agraciada por fazer parte desse time.

Ao Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP pelo apoio para realização de análises.

A FAPERJ, PIBIC/UFRJ e CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa.



*“A função da educação é ensinar pensar intensamente e pensar criticamente.*

*Inteligência mais caráter: esse é o objetivo da verdadeira educação.”*

(Martin Luther King Jr.)

*“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza.”*

(Marie Curie)

## RESUMO

Introdução: A obesidade hipotalâmica induzida pela administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) em roedores resulta em hipercorticonemia que contribui para a resistência à insulina e esteatose hepática. Assim, investigamos se o uso de mifepristona (MIFE), clássico antagonista do receptor de glicocorticóide (GR), poderia melhorar a homeostase da glicose e esteatose hepática em camundongos obesos MSG. Metodologia: Camundongos neonatos Swiss machos receberam MSG [4 g/kg de peso corporal (PC)] ou solução hipertônica de salina (CTL) por via subcutânea durante os primeiros cinco dias de vida. Após completar 30 dias de vida foram realizados testes de tolerância à glicose (IPGTT) e ao glucagon (IPGluTT) entre camundongos MSG e CTL. Em seguida, parte dos camundongos MSG foram subdivididos em dois grupos, o grupo MIFE30, nos quais foi administrado o antagonista GR (80 mg/kg PC), e o grupo MSG30, que receberam administração de veículo (5% DMSO em óleo de milho). A outra parte dos camundongos MSG, ao completar 60 dias de vida foram submetidos a um IPGTT e IPGluTT em comparativo a camundongos CTL com 60 dias de vida. Em seguida os camundongos MSG foram subdivididos nos grupos MIFE60 e MSG60, nos quais foi administrado MIFE ou veículo, respectivamente. Para os grupos MIFE30, MSG30, MIFE60 e MSG60 foi administrado MIFE ou veículo durante 30 dias. Após o tratamento foram realizados IPGTT e IPGluTT. Por fim, os estoques de gorduras e o fígado foram coletados para avaliação da adiposidade e esteatose, respectivamente. Nesse trabalho foi observado que camundongos MSG apresentam intolerância à glicose a partir dos 60 dias de vida. Ao término dos tratamentos com MIFE ou veículo, camundongos MIFE60 exibiram menor glicemia aos 60 min, 120 min e total da glicemia no IPGTT, quando comparados aos MSG60. A glicemia de camundongos MIFE30 e MSG30 não diferiu durante IPGTT. O tratamento com MIFE não modificou a produção hepática de glicose em resposta ao glucagon em camundongos MIFE30 ou MIFE60, em comparação a camundongos MSG30 e MSG60, respectivamente. O peso dos estoques de gordura permaneceu similar entre os camundongos do grupo MIFE30 e MEG30, assim como entre os camundongos dos grupos MIFE60 e MSG60. Ainda, a análise histológica hepática indicou uma prevalência de esteatose leve em 84% dos camundongos MIFE60, com 16% apresentando esteatose moderada. No grupo MSG60 foi observado que 50% dos camundongos apresentaram esteatose moderada e 50%



esteatose leve. Sem discrepâncias no grau de esteatose hepática entre camundongos MIFE30 e MSG30. Como conclusão observamos que a intolerância à glicose ocorreu em camundongos MSG a partir dos 60 dias de vida. A administração de MIFE não preveniu o estabelecimento da intolerância à glicose em camundongos MIFE30, porém melhorou a tolerância à glicose quando introduzida aos 60 dias de vida nos camundongos MSG. Além disso, apesar de uma menor prevalência de esteatose moderada em camundongos MIFE60, em comparação ao MSG60, são necessários adicionais estudos para avaliar e elucidar os efeitos do antagonismo GR na esteatose hepática em camundongos MSG.

Palavras-chaves: obesidade, MSG, Mifepristona, corticosterona, esteatose hepática, insulina.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular da mifepristona.....	20
<b>Figura 2:</b> Representação dos grupos experimentais CTL e MSG. ....	24
<b>Figura 3:</b> Representação dos grupos experimentais MSG30, MIFE30, MSG60 e MIFE60.. ....	25
<b>Figura 4:</b> Curva glicêmica durante a realização do ipGTT e ipGluTT de camundongos CTL e MSG aos 30 dias de vida. ....	29
<b>Figura 5:</b> Curva glicêmica durante a realização do ipGTT e ipGluTT de camundongos CTL e MSG aos 60 dias de vida.. ....	30
<b>Figura 6:</b> Curva glicêmica durante a realização do ipGTT e ipGluTT de camundongos MSG após 30 dias de tratamento com veículo ou MIFE, com início do tratamento aos 30 dias de vida. ....	32
<b>Figura 8:</b> Média $\pm$ EPM do peso corporal total, índice de Lee e peso dos estoques de gorduras retroperitoneal e periepididimal de camundongos MSG30 e MIFE30. ....	33
<b>Figura 9:</b> Média $\pm$ EPM do peso do fígado, tabela do grau de esteatose hepática de camundongos MSG30 e MIFE30. ....	34
<b>Figura 10:</b> Curva glicêmica durante a realização do ipGTT e ipGluTT após 30 dias de tratamento de camundongos MSG com veículo ou MIFE, com início do tratamento aos 60 dias de vida. ....	35
<b>Figura 11:</b> Média $\pm$ EPM da concentração plasmática de triglicerídeos, proteínas totais, albumina e colesterol de camundongos MSG60 e MIFE60 após a administração de veículo ou MIFE durante 30 dias. ....	36
<b>Figura 12:</b> Média $\pm$ EPM peso corporal final, índice de Lee e peso dos estoques de gordura retroperitoneal e gordura epididimal de camundongos MSG60 e MIFE60. ....	36
<b>Figura 13:</b> Média $\pm$ EPM do peso normalizado do fígado, classificação da esteatose hepática em camundongos MSG60 e MIFE60.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC1	Acetil-CoA Carboxilase 1
ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
CTEM	Complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CG	Glicocorticoides
COL	Colesterol
CPT-1	Carnitina Palmitoiltransferase-1
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FASN	Ácido Graxo Sintase
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HFD	Dieta Hiperlipídica
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
MCR2	Receptores de melanocortina tipo-2
MSG	Glutamato monossódico
MIFE	Mifepristona
PPAR $\alpha$	Proliferadores de peroxissoma alfa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboquinase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
SCD1	Estearoil-CoA Dessaturase
SREBP-1	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol
SOCS	Supressores de sinalização de citocina
TG	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Obesidade e a adiposidade induzida por glutamato monossódico em modelo experimental.....	14
1.2 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sua contribuição para obesidade e suas comorbidades .....	15
1.3 Doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) .....	17
1.4 Mifepristona .....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4. METODOLOGIA .....	22
4.1. Grupos Experimentais .....	22
4.2 Teste de tolerância à glicose (ipGTT) e ao glucagon (ipGLUTT) .....	25
4.2.1. Avaliação da homeostase da glicose em camundongos CTL e MSG ..	25
4.2.1. Avaliação da homeostase da glicose em camundongos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60 .....	26
4.3 Parâmetros bioquímicos séricos nutricionais .....	26
4.4 Avaliação da obesidade.....	26
4.5 Avaliação da deposição de gordura hepática.....	26
4.6 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS .....	28
5.1 Avaliação da homeostase da glicose em camundongos CTL e MSG .....	28
5.2 Efeitos do tratamento com MIFE em camundongos MSG a partir dos 30 dias de vida .....	31

5.3 Efeitos do tratamento com MIFE em camundongos MSG a partir dos 60 dias de vida .....	34
6. DISCUSSÃO .....	38
7. CONCLUSÃO .....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. ANEXOS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### ***1.1 Obesidade e a adiposidade induzida por glutamato monossódico em modelo experimental***

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que pode acarretar prejuízos à saúde do indivíduo e predispor ao desenvolvimento de outras doenças crônicas não transmissíveis, como Diabetes Mellitus (DM) do tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA; OMS, 2020; KANG *et al.*, 2010). A obesidade tem etiologia multifatorial, sendo decorrente de agentes genéticos, psicossociais, socioeconômicos e/ou ambientais (ZUKIEWICZ-SOBCZAK *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2017; KLAN *et al.*, 2018).

A incidência da obesidade no Brasil e no mundo é crescente. Dados da OMS (2020) demonstram que a prevalência de obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016, chegando a acometer cerca de 13% da população adulta mundial. No Brasil, 20% dos indivíduos adultos estavam obesos em 2019 (VIGITEL, 2020). Devido a alta prevalência na população, a obesidade é considerada um problema de saúde pública, visto que essa junto com suas comorbidades associadas, onera o sistema de saúde e reduz a produtividade da população. Dados de 2014 indicam um gasto de 2,8% do PIB para a economia global com problemas associados a obesidade e comorbidades associadas (Instituto Global McKinsey, 2015). Assim, estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na etiologia da obesidade.

Para isso, diferentes modelos experimentais com a finalidade de estudo da obesidade já foram descritos na literatura, dentre eles: a obesidade induzida por mutações genéticas autossômicas recessivas (COLEMAN, 1973); a obesidade induzida por lesões eletrolíticas em núcleos hipotalâmicos (KIZER *et al.*, 1977; HETHERINGTON *et al.*, 1939); indução da obesidade por ingestão de dieta hiperlipídica (HFD, WHITE, 2012) e a obesidade induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG; SCALLET E ONNEY, 1986).

No modelo de obesidade induzida por MSG, a administração dessa substância em camundongos no período neonatal causa lesões químicas no hipotálamo e eminência mediana, com consequentes alterações neuroendócrinas que

desencadeiam a obesidade (SCALLET E ONNEY, 1986; HIRATA, 1997). Como característica, estes camundongos MSG apresentam massiva adiposidade corporal (BUNYAN *et al.*, 1976) e menor comprimento linear (GASPAR *et al.*, 2016). A administração de MSG em camundongos no período neonatal também induz à intolerância à glicose (ARAUJO TR *et al.*, 2019), hiperinsulinemia (MACHO *et al.*, 2000), hipergluconemia (ARAÚJO *et al.*, 2019), hipercorticosterolemia (GUIMARÃES *et al.*, 2017) e resistência à insulina (PASTORE *et al.*, 2010). Assim, este modelo tem demonstrado desenvolver modificações orgânicas similares às que ocorrem em indivíduos com obesidade (THALER *et al.*, 2012).

### **1.2 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sua contribuição para obesidade e suas comorbidades**

O hipotálamo é um importante mediador entre o controle neural e as repostas periféricas. Uma das suas ações se dá pela secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Após estímulo pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), as células corticotrópicas hipofisárias sintetizam a proopimelanocotina (POMC), que ao ser clivada produz, entre outros derivados, o ACTH (MALIK *et al.*, 2015). Por sua vez, o ACTH ao interagir com os receptores de melanocortina do tipo 2 (MCR2), expressos na zona fasciculada da adrenal, estimula a síntese de glicocorticoides (GCs; MARGIORES *et al.*, 2016). Os GCs, dentre suas várias ações, regulam o metabolismo intermediário (KUO *et al.*, 2015), a resposta imune e a resposta inflamatória (COUTINHO & CHARPAMAN, 2010).

Fisiologicamente, todas as respostas desencadeadas pelos GCs em humanos ocorrem via síntese e secreção do hormônio cortisol pela adrenal, enquanto, em roedores, o GC predominante é a corticosterona (JOELS *et al.*, 2018). O cortisol ou corticosterona após atravessar a membrana dos tecidos-alvo, interage com o receptor para glicocorticoides (GR; BOSSCHER e DESMET, 2017) que se localiza no citoplasma. Após a interação, o GR associado ao ligante transloca-se ao núcleo, onde atua regulando a transcrição gênica por meio da interação com elementos de resposta aos GCs (RATMAN *et al.*, 2013) ou através da associação a cofatores (KATHLEEN *et al.*, 2004). Ainda, a fim de regular sua própria secreção, os GCs interagem com GR presentes no eixo HHA, realizando a retroalimentação negativa, por meio da inibição da secreção do ACTH e do CRH (JURUENA *et al.*, 2004).



Apesar da fina comunicação e regulação do eixo HHA, dados disponíveis na literatura demonstram que a obesidade desempenha importante papel sobre a desregulação deste eixo. Estudos de supressão farmacológica do HHA, com dexametasona (um GC sintético) sugerem que indivíduos com obesidade abdominal apresentam menor inibição da secreção de cortisol, possivelmente devido a prejuízos na retroalimentação negativa, o que pode refletir na hiperatividade do eixo HHA (LJUNG *et al.*, 1996; PASQUALI *et al.*, 2002). Ainda, evidências apontam que a obesidade leva a alterações no padrão de secreção diurna de cortisol e elevação dos níveis desse hormônio (JACKSON *et al.*, 2017; PAPAFOITOU *et al.*, 2017; JACKSON E STEPTOE, 2018), condições características do quadro de hipercortisolismo funcional (TIRABASSI *et al.*, 2013).

O excesso de GCs gera alterações metabólicas em diferentes tecidos importantes na metabolização da glicose, como o tecido adiposo, músculo e fígado, que irão culminar em um quadro de resistência à insulina (FERRAÙ E KORBONITS, 2018). Adipócitos e miócitos tratados com dexametasona apresentam redução na expressão do substrato do receptor de insulina 1 (IR-1; SAKODA *et al.*, 2000; BURÉN *et al.*, 2008; BROWN *et al.*, 2017). Além disso, a exposição do tecido adiposo aos GCs eleva a presença de macrófagos pró-inflamatórios (THI THU HUONG DO *et al.*, 2018), com consequente produção de citocinas que prejudicam a sinalização da insulina (LUMENG *et al.*, 2007).

Com a descoberta das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  do GR, foi possível esclarecer a dualidade das ações dos GCs, com atividade lipolítica e anti-inflamatória em condições fisiológicas, se contrapondo a respostas lipogênicas e pró-inflamatórias mediante a exposições suprafisiológicas (LEWIS-TUFFIN *et al.* 2006; SCHAAF *et al.*, 2008; HINDS *et al.*, 2010). A GR $\alpha$  é descrita como a isoforma responsiva aos GCs, enquanto o GR $\beta$  é descrito como um regulador negativo da GR $\alpha$ , e nesse caso, por se tratar de um transcrito ativo, a presença da GR $\beta$  no meio a levaria a interação com a GR $\alpha$  resultando na formação de um complexo inativo (LEWIS-TUFFIN *et al.* 2007). Posteriormente, foi evidenciado que o GR $\beta$ , apesar de não possuir sítio de ligação aos GCs, interage com co-fatores (MIN *et al.*, 2018), podendo exercer atividade transcricional de forma independente da GR $\alpha$  (LEWIS-TUFFIN *et al.* 2007; MIN *et al.*, 2018). Em camundongos C57BL/6 obesos HFD, observa-se um predomínio da isoforma GR $\beta$ , cuja superexpressão está associada a redução da expressão de mRNA de proliferadores do peroxissoma alfa (PPAR $\alpha$ ) e glicogênio sintase 2 (GSK2),

proteínas associadas à lipólise e glicogênese, em contraposição ao aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ; MARINO *et al.*, 2016). Essas alterações transcricionais favorecem o acúmulo de gordura ectópica e o estabelecimento do quadro de inflamação crônica, ambas condições comumente associadas à obesidade.

### **1.3 Doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA)**

O termo DHGNA é usado para designar uma condição clínico-patológica caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos na ausência de causas secundárias, como o consumo excessivo de álcool (BESSONE *et al.*, 2018). A doença pode se apresentar como esteatose hepática simples, podendo evoluir para esteato-hepatite não alcoólica (KOEK, 2011). A partir desse ponto, existe maior potencial de progressão para cirrose (SHARMA & JOHN, 2019) com graves alterações hemodinâmicas hepáticas (KIM *et al.*, 2010) que, por fim, pode progredir para sua forma mais grave, o carcinoma hepatocelular (ISSA & ALKHOURI, 2017). A DHGNA se desenvolve a partir de modificações no metabolismo hepático de lipídeos podendo ser decorrente do aumento da taxa de captação de glicose para a lipogênese *de novo* de ácidos graxos (AG), sobressaindo o catabolismo de ácidos graxos através da  $\beta$ -oxidação e a exportação de colesterol (COL) e triglicerídeos (TG) do fígado para tecidos periféricos (FABBRINI *et al.*, 2010). Com elevada prevalência, a DHGNA é considerada a doença hepática crônica mais comum do mundo. Em 2018, acometeu cerca de 25% da população adulta mundial (ARAÚJO A. R. *et al.*, 2018), com maior incidência na América do Sul e Oriente Médio e estando fortemente associada a obesidade (YOUNOSSI *et al.*, 2016).

A DHGNA está correlacionada a hiperatividade do HHA e mudanças na resposta aos GCs. Foi demonstrado que indivíduos obesos e com esteatose hepática, quando desafiados com dexametasona (a fim de mimetizar a retroalimentação negativa promovida pelo cortisol), apresentaram menor supressão deste eixo, estando esse efeito diretamente associado a gravidade histopatológica da esteatose (ZOPPINI *et al.*, 2004; TARGHER *et al.*, 2006). Sabe-se também que a exposição de hepatócitos de camundongos obesos aos GCs leva ao aumento da expressão de enzimas que participam da lipogênese *de novo*, como a acetil-CoA carboxilase-1 (ACC1), esteroil-CoA dessaturase (SCD1), ácido graxo sintase (FASN), e do fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1; YANG *et al.*, 2018). De forma

conjunta, a exposição aos GCs leva a supressão da expressão do receptor ativado por proliferadores do peroxissoma-alfa (PPAR $\alpha$ ), reduzindo assim a transcrição de enzimas envolvidas com a  $\beta$ -oxidação. Além de reduzir a transcrição da enzima glicogênio sintase 2 (MARINO *et al.*, 2016), aumentando a disponibilidade de polissacarídeo no meio para ser utilizado como substrato para a lipogênese *de novo*, resultando no aumento da síntese de TG e, conseqüentemente, favorecendo o estabelecimento da esteatose hepática.

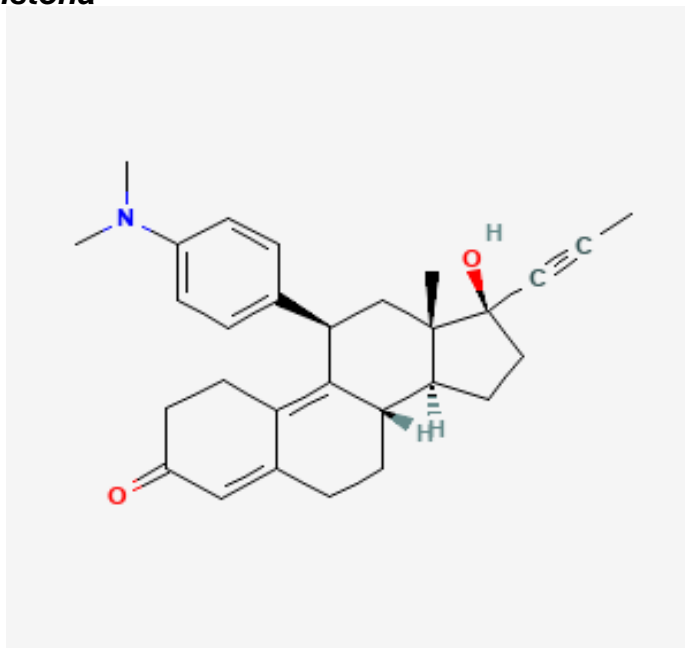
Já é estabelecido que a obesidade e a DHGNA estão intimamente associados a resistência à ação da insulina (SAMUEL *et al.*, 2004; PIRGON *et al.*, 2013). E alguns mecanismos já foram descritos para elucidar a relação entre o acúmulo de gordura no fígado e a resistência à insulina, são eles:

- (1) através da ativação de células de Kupffer M1, que são macrófagos residentes do tecido hepático de fenótipo pró-inflamatório, com conseqüente liberação de TNF- $\alpha$ , interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (LANTHIER *et al.*, 2010; MARINO *et al.*, 2016). Essas citocinas atuam aumentando a expressão dos supressores de sinalização de citocina (SOCS), os quais inibem a sinalização do receptor de insulina (IR; MOONEY *et al.*, 2001 e HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993);
- (2) o stress oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), principalmente no complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTEM; ARONIS *et al.*, 2005). Dessa forma, os EROS atuam inibindo a fosforilação do IR e do substrato 1 do IR (IR-1; HANSEN *et al.*, 1999) prejudicando a sinalização desencadeada a partir da ligação com esse receptor;
- (3) o processo incompleto de  $\beta$ -oxidação culmina na produção de metabólitos lipotóxicos (PATTERSON *et al.*, 2016) que também prejudicam a sinalização da insulina, com mecanismo que envolve ativação de uma isoforma da proteína quinase C (PKC), resultando na inibição das enzimas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da Akt/PKB (POWELL *et al.*, 2003; JORNAYVAZ *et al.*, 2012).

Ainda, estudos com humanos e roedores confirmam a correlação da resistência à insulina e DHGNA. Análises apontam que cerca de 55% dos pacientes com DM tipo 2 possuem DHGNA (ZOB AIR, 2019). Franko e colaboradores (2017) observaram melhoras na resistência à insulina de camundongos *Tally Ho* diabéticos e com esteatose mediante o tratamento com bezafibrato, um agonista PARR- $\alpha$ . Adicionalmente, foi observado que camundongos com lipotoxicidade hepática

induzida por dieta, quando submetidos ao tratamento com agentes que reduzem a atividade pró-inflamatória apresentam melhora na resistência à insulina e a esteato-hepatite (NI *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019). Esses achados sugerem uma íntima associação entre DHGNA e prejuízos na resposta à insulina e, conseqüentemente, na homeostase da glicose.

#### 1.4 Mifepristona



**Figura 1:** Estrutura molecular da mifepristona. Imagem representativa retirada do Pubchem.

Classicamente, a mifepristona (MIFE) é definida como um antagonista competitivo do GR e do receptor de progesterona (RP; GALLAGHER E TOUNG, 2006). Entretanto, uma análise mais profundada do seu mecanismo de ação demonstrou que após a interação da MIFE ao receptor ocorre a translocação desse complexo-ligante GR para o núcleo, no qual este se liga com alta afinidade a promotores de genes e impede a interação dessas regiões a receptores ativos por agonistas (WAGNER *et al.*, 1999). Recentemente, MIN e colaboradores (2018) evidenciaram que a MIFE pode interagir com a isoforma GR $\beta$ , levando a sua interação preferencialmente com co-repressores, reduzindo a atividade transcricional intrínseca desse receptor. Na clínica, devido sua ação antiprogesterona, a MIFE é utilizada como abortivo em associação a prostaglandinas (HEIKINHEIMO, 1997). Por essa atuação, sua comercialização é proibida no Brasil. Ainda, devido sua ação antiglicocorticoide a MIFE possui elevada efetividade no tratamento da síndrome de Cushing (MORGAN E LAUFGRABEN, 2013), melhorando as condições características da hipercorticosterolemia, como a redução da resistência à insulina (FLASERIU *et al.*, 2012; TAKESHITA *et al.*, 2015).

Além da síndrome de Cushing, a redução da resistência à insulina frente ao tratamento com MIFE já foi evidenciado em diferentes modelos animais de obesidade, como na obesidade induzida por HFD (HASHIMOTO *et al.*, 2013; BEAUDRY *et al.*,

2014), na obesidade induzida por dieta rica em frutose (PRIYADARSHINI & ANURADHA, 2017) e em camundongos de linhagem *ob/ob* (GETTYS *et al.*, 1997) e *db/db* (LIU *et al.*, 2005).

Recentemente, análises farmacológicas da MIFE em células musculares apontaram para o aumento da fosforilação da proteína quinase B (PKB) e da translocação do transportador de glicose (GLUT) tipo 4 para a membrana de miócitos (BERNAL-SORE *et al.*, 2018), aumentando o aporte de glicose para célula. Em adipócitos, o tratamento com insulina e MIFE demonstrou aumento na captação de glicose, em comparação a adipócitos tratados apenas com insulina (HASHIMOTO *et al.*, 2013). Tais evidências sugerem que a MIFE contribui para a melhora da resposta à insulina e conseqüentemente do controle glicêmico.

Além disso, estudos apontam que adipócitos *3T3-L1* (*de camundongo*) quando expostas a CG e MIFE apresentam menores níveis de ACC e fatores de transcrição relacionados a adipogênese, quando comparado a exposição apenas ao CG (YAN *et al.*, 2016). Em hepatócitos, o tratamento com GC e MIFE reduziu a expressão do mRNA da ACC, esteroil-CoA desaturase – 1 (SDI) e SREBP-1, em contrapartida, observou-se o aumento dos níveis de mRNA da carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1), o que sugere que o tratamento com MIFE tenha ação na redução da lipogênese e no favorecimento da  $\beta$ -oxidação (YANG *et al.*, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos tem demonstrado a íntima associação entre danos no núcleo arqueado hipotalâmico e o aumento da adiposidade corporal (OBICI *et al.*, 2002; BALTHASAR *et al.*, 2004; THALER *et al.*, 2012). Paralelamente, foi evidenciado que a marcação cerebral associada a gliose no hipotálamo de humanos está correlacionada de forma positiva a maiores valores de IMC (THALER *et al.*, 2012; PUIG *et al.*, 2015), resultando em hiperatividade do eixo HHA, e conseqüente hipercortisolemia (ROSMOND *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2015). A hipercortisolemia, por sua vez, leva a alterações fisiológicas que contribuem para o aumento da adiposidade (YU *et al.*, 2014), resistência à insulina (BURKE *et al.*, 2019; BURÉN *et al.*, 2002) e aumento da deposição de gordura ectópica no fígado, o que propicia ao desenvolvimento da DHGNA (HU *et al.*, 2020; CHRIST-CRAIN *et al.*, 2008).

Dados disponíveis na literatura demonstram que o tratamento com MIFE atenua a resistência à insulina e a lesão hepática em humanos com síndrome de

Cushing (WALLIA *et al.*, 2013; FLESERIU *et al.*, 2012; RAQUCCI *et al.*, 2017) e em roedores com obesidade induzida por HFD (HASHIMOTO *et al.*, 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da MIFE no modelo de obesidade MSG, que possui hiperatividade do eixo HHA e hipercorticosterolemia (GUIMARÃES *et al.*, 2017; TORREZAN *et al.*, 2019). Assim, este trabalho visou avaliar se o tratamento crônico com MIFE atenua o desenvolvimento e progressão da resistência à insulina e da DHGNA em camundongos obesos MSG.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar se camundongos tratados no período neonatal com MSG apresentam prejuízos na homeostase de glicose aos 30 ou 60 dias de vida.

Avaliar se a administração de MIFE em camundongos MSG pode ser uma ferramenta farmacológica para modificação de parâmetros da obesidade como a adiposidade, prejuízos na homeostase da glicose e esteatose hepática.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a homeostase de glicose em camundongos MSG tratados ou não com MIFE;
- Avaliar parâmetros bioquímicos séricos associados ao perfil nutricional em camundongos MSG tratados ou não com MIFE;
- Avaliar o peso corporal final e deposição de gordura nos estoques de tecido adiposo branco em camundongos MSG tratados ou não com MIFE;
- Avaliar a deposição de lipídeos no tecido hepático e estadiar o grau de esteatose de camundongos MSG tratados ou não com MIFE.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Grupos Experimentais**

Camundongos fêmeas *Swiss* prenhas foram mantidas no Biotério de Experimentação de Roedores (Divisão de Pesquisa em Produtos Bioativos e Biociências – DPBio) do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé, sob condições controladas de luminosidade (8-20h claro/20-8h escuro), umidade e temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante toda a gestação (Certificado de aprovação para utilização dos camundongos emitida pela CEUA UFRJ-Macaé sob nº: 054 – ANEXO 1).

Para avaliar se camundongos MSG começam a apresentar prejuízos na homeostase de glicose aos 30 ou 60 dias de vida, a partir do primeiro dia de vida pós-

natal a prole de machos foi distribuída nos seguintes grupos experimentais (CANTELLI *et al.*, 2017; Fig. 1):

- Controle (CTL): Machos que do primeiro ao quinto dia de vida pós-natal foram submetidos diariamente à uma injeção subcutânea (SC) de salina (1,25 g/kg de peso corporal/dia; n=16; Fig. 1)

- MSG: Machos que do primeiro ao quinto dia de vida pós-natal foram submetidos diariamente à uma injeção SC de MSG solubilizado em água destilada (4 g/kg de peso corporal/dia; n= 25).

Aos 21 dias de idade os camundongos foram desmamados. Aos 30 e 60 dias de vida os camundongos foram submetidos aos testes de tolerância a glicose (IPGTT) e glucagon (IPGluTT), e posteriormente, os camundongos que compunham o grupo MSG foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (Fig. 2):

- MSG30: Machos MSG que a partir dos 30 dias de vida passaram a receber diariamente, durante 30 dias, via SC de solução de 5% de DMSO dissolvido em óleo de milho (veículo; n=10).

- MSG60: Machos MSG que a partir dos 60 dias de vida passaram a receber diariamente, durante 30 dias, veículo via SC (n=14).

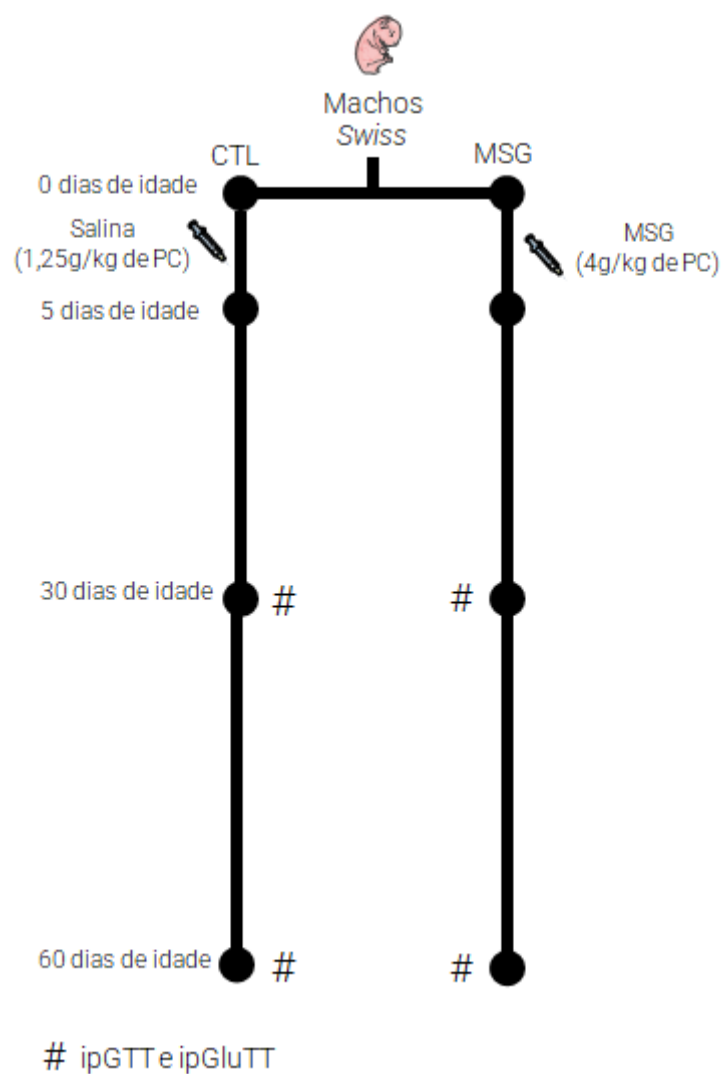
- MIFE30: Machos MSG que a partir dos 30 dias de vida passaram a receber diariamente, durante 30 dias, via SC 80 mg/kg de peso corporal de MIFE dissolvida em veículo (n=10).

- MIFE60: Machos MSG que a partir dos 60 dias de vida passaram a receber diariamente, durante 30 dias, via SC 80 mg/kg de peso corporal de MIFE dissolvida em veículo (n=14).

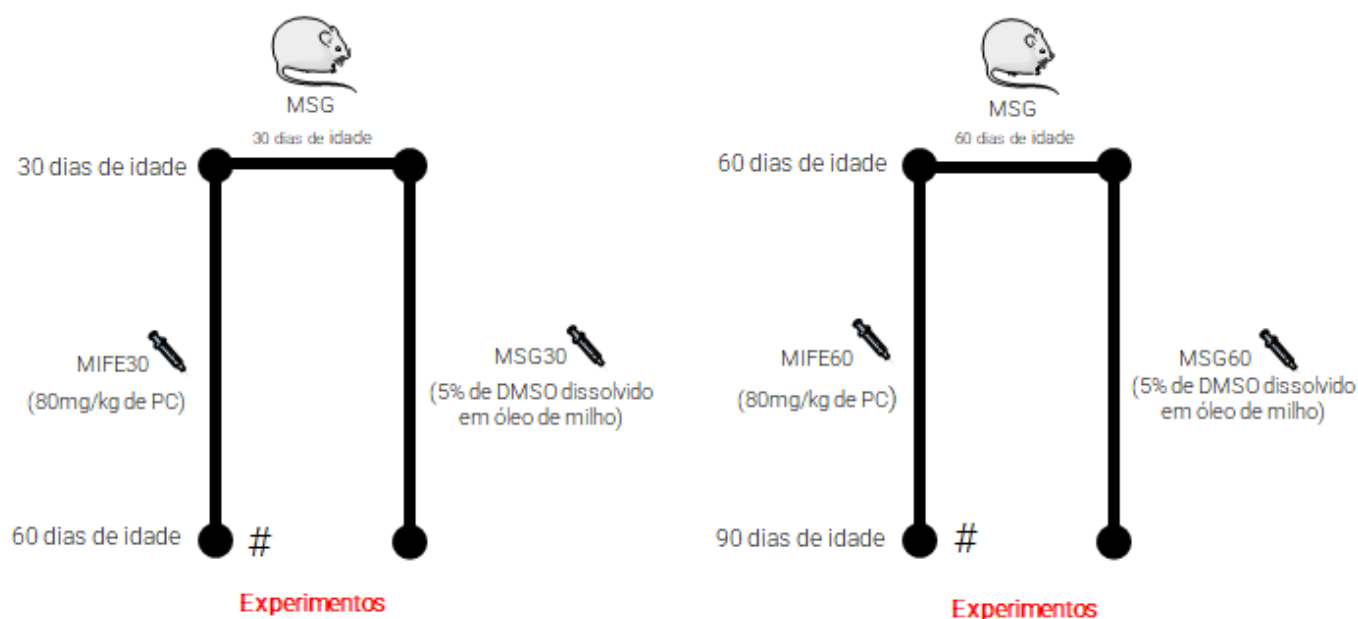
O volume máximo administrado em cada animal foi de 115 µL.

Durante todo o tratamento, os camundongos receberam ração padrão (Nuvital, Colombo, PR, BRA) e água filtrada *ad libitum*. Após os 30 dias de tratamento, prosseguiu-se com os experimentos. A representação dos grupos experimentais está disposta na Figura 2.





**Figura 2:** Representação dos grupos experimentais CTL (n= 16) e MSG (n=25). Machos Swiss neonatos foram tratados com salina (1,25 g/kg de peso corporal/dia; grupo CTL) ou MSG (4 g/kg de peso corporal/dia; grupo MSG) do primeiro ao quinto dia de vida. Aos 30 e aos 60 dias de vida foram realizados os testes ipGTT e ipGluTT. # indica a realização dos testes de tolerância à glicose (IPGTT) e glucagon (IPGluTT).



# ipGTT e ipGluTT

**Figura 3:** Representação dos grupos experimentais MSG30 (n=6), MIFE30 (n=10), MSG60 (n=14) e MIFE60 (n=14). Aos 30 dias de vida metade dos camundongos que compunham o grupo MSG passaram a receber diariamente via SC veículo (solução de 5% de DMSO dissolvido em óleo de milho; grupo MSG30) ou MIFE (80mg/Kg de peso corporal; grupo MIFE30) durante 30 dias. Aos 60 dias de vida, a outra metade dos camundongos que compunham o grupo MSG passaram a receber diariamente via sc veículo (grupo MSG60) ou MIFE (grupo MIFE60), durante 30 dias. # indica a realização dos testes de tolerância à glicose (IPGTT) e glucagon (IPGluTT).

## 4.2 Teste de tolerância à glicose (IPGTT) e ao glucagon (IPGluTT)

### 4.2.1. Avaliação da homeostase da glicose em camundongos CTL e MSG

Para avaliação da homeostase da glicose, os camundongos que compunham os grupos CTL e MSG foram submetidos aos testes IPGTT e IPGluTT aos 30 e 60 dias de vida. Para o IPGTT, camundongos, em jejum de 12 horas, foram pesados e a glicemia foi aferida (tempo 0). Após, a glicose foi administrada IP na concentração de 2g/kg de peso corporal e a glicemia foi verificada nos tempos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos pós aplicação (ARAUJO, T. R. *et al.*, 2016). Para o IPGluTT, camundongos, em jejum de 8 horas, foram pesados e a glicemia foi aferida (tempo 0). Após, o glucagon (GlucaGen® HypoKit, Novo Nordisk) foi administrado via ip na concentração de 100pg/kg de peso corporal e a glicemia foi verificada com uso de do glicosímetro (Accu Chek® Performa, Roche, Brasil) nos tempos 10, 15, 30, 45 e 60 minutos pós aplicação (MERINO *et al.*, 2015).

#### **4.2 Avaliação da homeostase da glicose em camundongos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60**

Para avaliação da homeostase da glicose, os camundongos que compunham os grupos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60 foram submetidos ao IPGTT e IPGluTT após 30 dias de tratamento com veículo ou MIFE, conforme metodologia descrita acima.

#### **4.3 Parâmetros bioquímicos séricos nutricionais**

Após os 30 dias de tratamento, com veículo ou MIFE, foi realizada a coleta do sangue caudal dos camundongos dos grupos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60 no estado de jejum. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1500 x g a 4°C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi coletado e armazenado à -20°C para posterior dosagem de glicose, triglicerídeos (TG), colesterol (COL), proteínas totais e albumina com o uso de kits colorimétricos (cat. n K117, cat. n. K083, K040, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; cód. 742181, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil).

#### **4.4 Avaliação do peso corporal e adiposidade**

Após 30 dias de administração de veículo ou MIFE, os camundongos que compunham os grupos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60 foram pesados e foi obtida a medida do comprimento nasoanal (CNA), para posterior cálculo do índice de Lee, conforme fórmula previamente descrita por Bernardis e Petterson (1968):  $\frac{(\text{Peso corporal em gramas})}{(\text{CNA em centímetros})} \times 1000$ . Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados por decapitação e os estoques de gorduras retroperitoneal e periepídidimal foram dissecados e pesados.

#### **4.5 Avaliação da deposição de gordura hepática**

Após a eutanásia, o fígado dos camundongos que compunham os grupos MSG30, MSG60, MIFE30 e MIFE60 foi dissecado e pesado, e um fragmento do fígado de cada animal foi direcionado para análise histopatológica. Os fragmentos de fígado foram fixados em formol de Carson (solução contendo 10% de formaldeído e 1,5% de metanol em 88,5% de PBS) por 48h, e em sequência desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos parafina (Biotec®, Adria laboratórios, Londrina, PR). Secções de 5 µm de espessura com espaçamento de 100 µm, foram obtidas do tecido em micrótomo manual (Lupetec MRP 2015, São Paulo, BR) e após coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Para obtenção das imagens histológicas, foram selecionadas duas secções do fígado de cada camundongo dos grupos MSG30 (n=3), MIFE30 (n=4), MSG60 (n=4) e MIFE60 (n=7). As secções foram fotografadas em microscópio óptico (Novel BM 2100, China) acoplado a câmara digital (Tucsen USB 2.0 H series, China). Em cada secção foram registrados, com o aumento de 400x, 8 campos aleatórios, totalizando 16 campos. Para avaliação do estadiamento da esteatose hepática, primeiramente foi realizada a contagem do número total de hepatócitos por campo, e em seguida, foram contabilizados o número de hepatócitos com inclusão lipídica para posterior cálculo do percentual de hepatócitos com inclusão lipídica. Dessa forma, foi possível classificar o grau de esteatose hepática conforme classificação previamente descrita por Liang *et al.* (2014), onde: esteatose grau 0 ou sem esteatose (<5% dos hepatócitos com inclusão lipídica), esteatose grau 1 (entre 5 – 33% dos hepatócitos com inclusão lipídica), esteatose grau 2 (entre 33% - 66% dos hepatócitos com inclusão lipídica) e esteatose grau 3 (>66% dos hepatócitos com inclusão lipídica). Também foram avaliados o quantitativo de não-hepatócitos (células de Kupffer, de Ito e ductais) por campo presentes no parênquima hepático, para obtenção da razão hepatócito/não hepatócito. Para obtenção do número de não hepatócitos também foram avaliados 16 campos.

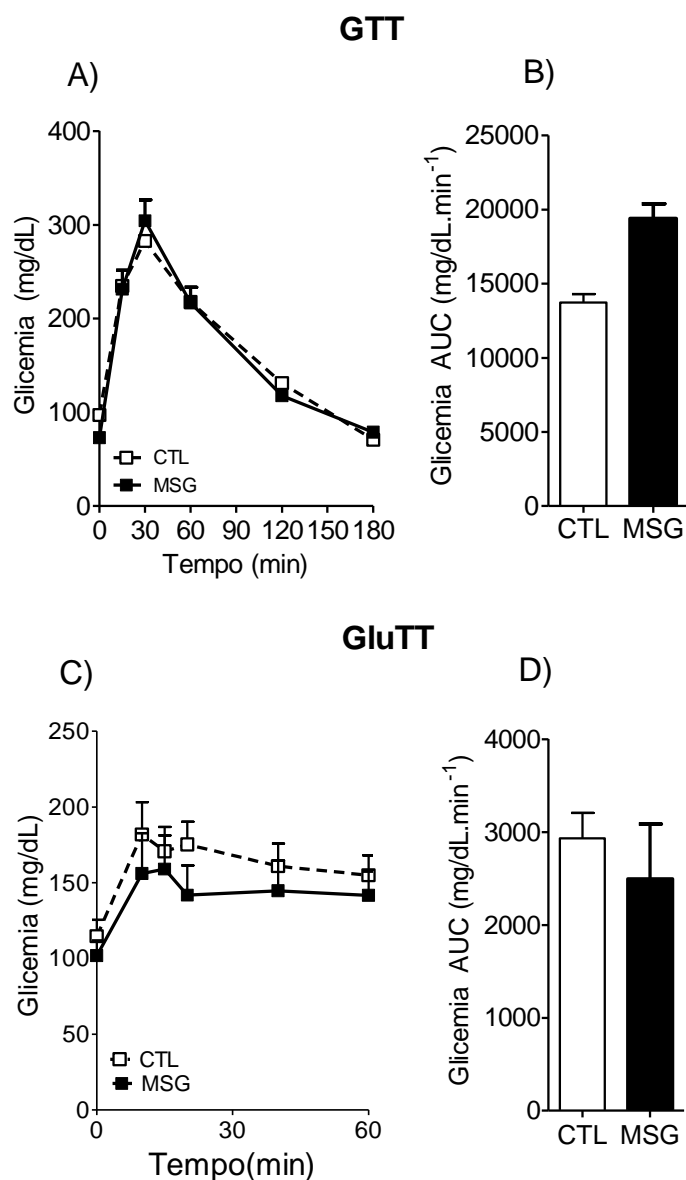
#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software, USA). Os resultados foram submetidos ao teste de distribuição de normalidade *Shapiro-Wilk* e então comparados por teste paramétrico (teste *t* de *Student*) ou não paramétrico (teste *U* de *Mann-Whitney*). O  $p < 0,05$  foi adotado como critério de significância.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação da homeostase da glicose em camundongos CTL e MSG**

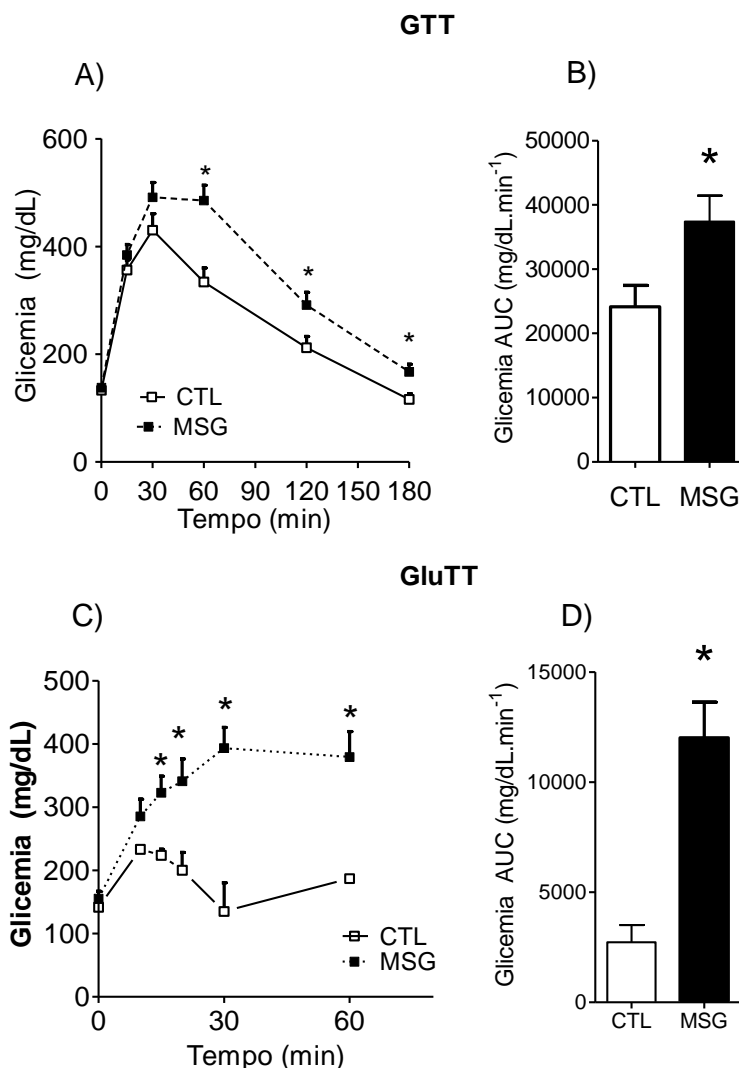
Para investigar em qual período da vida dos camundongos MSG se manifesta a intolerância à glicose e o aumento da produção hepática de glicose em resposta ao glucagon, os testes IPGTT e IPGluTT foram realizados aos 30 e 60 dias de vida em camundongos MSG e CTL. Aos 30 dias de vida, camundongos MSG não apresentaram diferenças nos valores de glicemia registrados durante o IPGTT (Fig. 4A) ou IPGluTT (Fig. 4C), quando comparados aos camundongos CTL. O total da glicemia durante os testes não diferiu entre os grupos MSG e CTL (Fig. 4B e 4D).



**Figura 4:** Curva glicêmica durante a realização do IPGTT (A) e IPGluTT (B) de camundongos CTL (n=7) e MSG (n=9) aos 30 dias de vida. Média  $\pm$  EPM da área abaixo de curva (AUC) durante IPGTT (C) e IPGluTT (D) de camundongos CTL (n=7) e MSG (n=9) aos 30 dias de vida. Dados analisados por Shapiro-Wilk seguido de teste *t* de Student ou teste U de Mann Whitney,  $p < 0,05$ .

Porém, aos 60 dias de vida, durante o IPGTT, os camundongos do grupo MSG apresentaram hiperglicemia nos tempos 60, 120 e 180 min, quando comparados aos CTL ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,03$  e  $p < 0,02$ , respectivamente; Fig. 5A). Ainda, o total da glicemia, expresso como AUC (mg/dL.min<sup>-1</sup>), foi 75% maior no grupo MSG, em relação ao CTL ( $p < 0,03$ ; Fig. 5B). Na avaliação do IPGluTT, ao longo do teste a glicemia de camundongos MSG foi superior quando comparado a camundongos CTL. A glicemia

geral de camundongos MSG foi 77% superior quando comparados aos CTL ( $P < 0,02$ ; Fig. 5D).



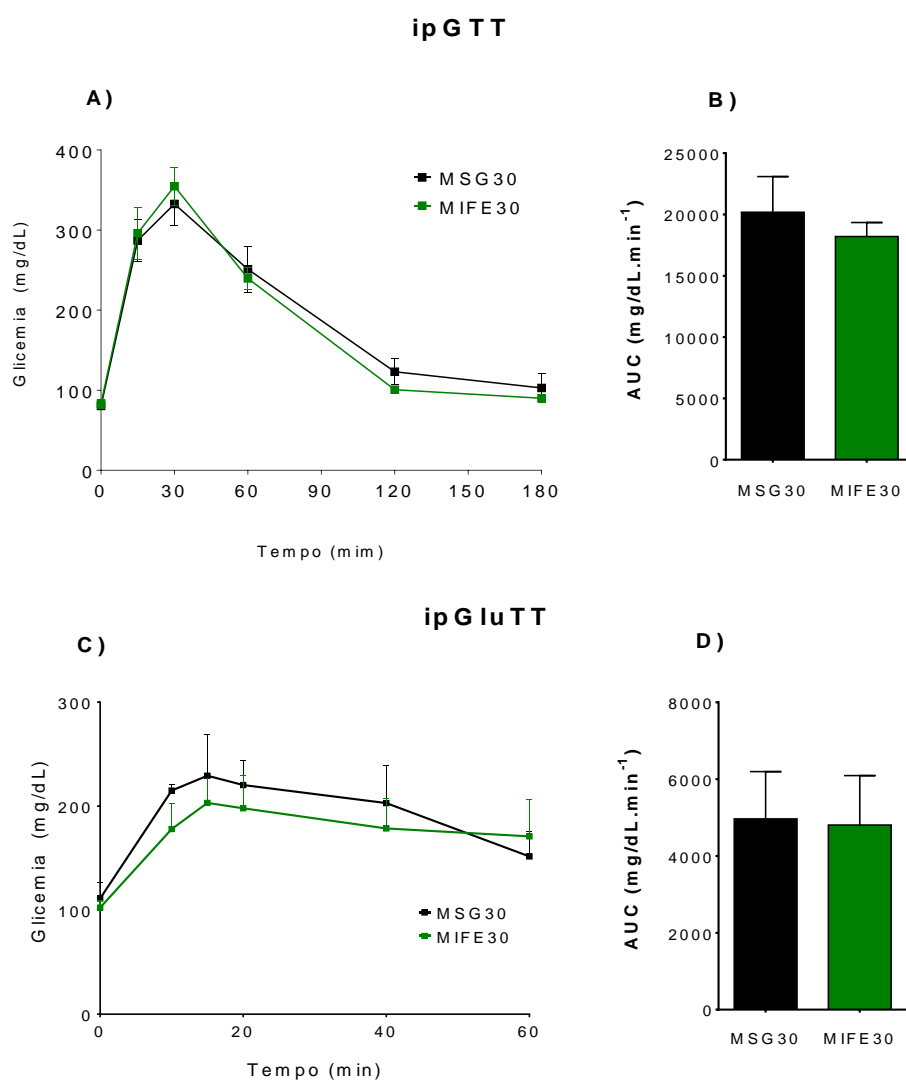
**Figura 5:** Curva glicêmica durante a realização do IPGTT (A) e IPGluTT (B) de camundongos CTL (n=7) e MSG (n=9) aos 60 dias de vida. Média  $\pm$  EPM da área abaixo de curva (AUC) durante IPGTT (C) e IPGluTT (D) de camundongos CTL (n=7) e MSG (n=9) aos 60 dias de vida. Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste U de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ . \* representa diferença estatística.

Os resultados dos testes de tolerância realizados entre camundongos MSG e CTL sugerem que o estabelecimento da intolerância a glicose e a maior produção de glicose resposta ao glucagon ocorrem no intervalo de tempo entre os 30 e 60 dias de vida de camundongos MSG. Sendo possível observar tais prejuízos na homeostase da glicose bem estabelecidos aos 60 dias de vida dos camundongos MSG.

### ***5.2 Efeitos do tratamento com MIFE em camundongos MSG a partir dos 30 dias de vida***

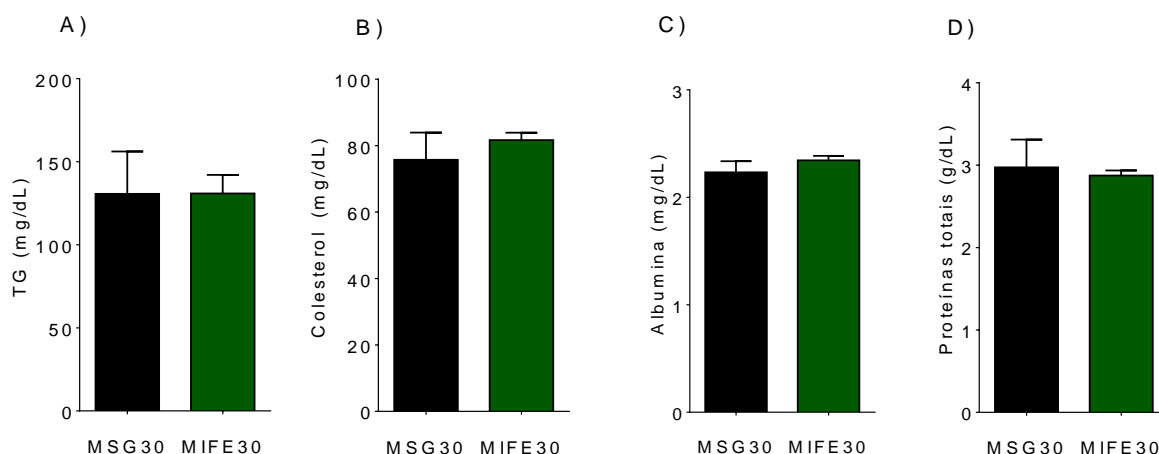
Mediante os resultados acima descritos, decidimos realizar o tratamento com MIFE no período de 30 a 60 dias de vida dos camundongos MSG, a fim de verificar se o tratamento com MIFE poderia ter ação preventiva contra o estabelecimento dos prejuízos na homeostase da glicose. Como resultados obtivemos que após 30 dias de administração diária do MIFE, a tolerância à glicose ou produção hepática de glicose em resposta ao glucagon de camundongos MIFE30 foi semelhante ao observado para esses parâmetros em camundongos MSG30.





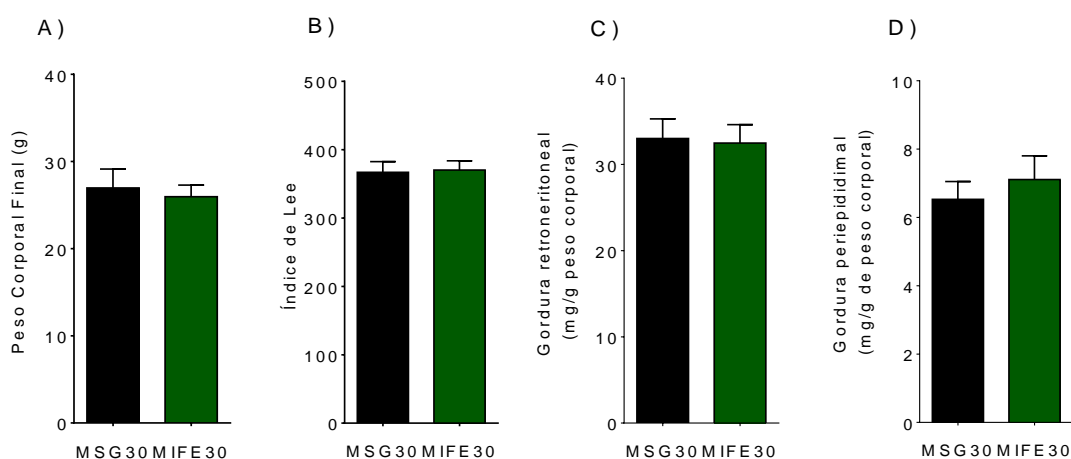
**Figura 6:** Curva glicêmica durante a realização do IPGTT (A; n=10) e IPGluTT (B; n=6) de camundongos MSG após 30 dias de tratamento com veículo ou MIFE, com início do tratamento aos 30 dias de vida. Média  $\pm$  EPM da AUC durante IPGTT (C) e IPGluTT (D) de camundongos após 30 dias de tratamento com MIFE ou veículo. Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste U de *Mann Whitney*,  $P < 0,05$ .

Quanto aos parâmetros bioquímicos, as concentrações plasmáticas de TG (Fig. 7A), COL (Fig. 7B), proteínas totais (Fig. 7C) e albumina (Fig. 7D) foi semelhante entre os grupos MIFE30 e MSG30.



**Figura 7:** Média  $\pm$  EPM da concentração plasmática de triglicerídeos (A), colesterol (B), albumina (C) e proteínas totais (D) de camundongos MSG30 (n= 6) e MIFE30 (n= 8). Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste U de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ .

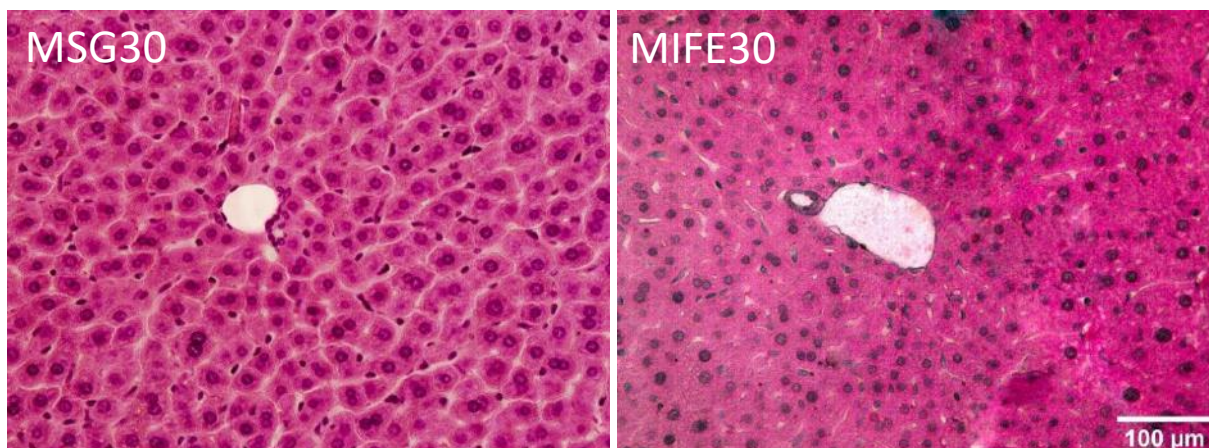
Com relação aos parâmetros de avaliação da obesidade, a administração de MIFE não modificou o peso corporal final (Fig. 8A), índice de Lee (Fig. 8B) e estoques de tecido adiposo branco retroperitoneal (Fig. 8C) e periepididimal (Fig. 8D) de camundongos dos grupos MIFE30 em comparação a camundongos MSG30.



**Figura 8:** Média  $\pm$  EPM do peso corporal total (A), índice de Lee (B) e peso dos estoques de gorduras retroperitoneal (C) e periepididimal (D) de camundongos MSG30 (n=8) e MIFE30 (n=9). Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste U de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ .

O peso do tecido hepático de camundongos MIFE30 e MSG30 foi similar (Fig. 9A). Na análise histopatológica foi possível observar hepatócitos de tamanho uniforme, em formato poliédrico, com núcleo centralizado e bordas citoplasmáticas

bem definidas em ambos os grupos (Fig. 9C). Todos os camundongos do grupo MIFE30 e MSG30 apresentaram grau 1 de esteatose (Fig. 9B).

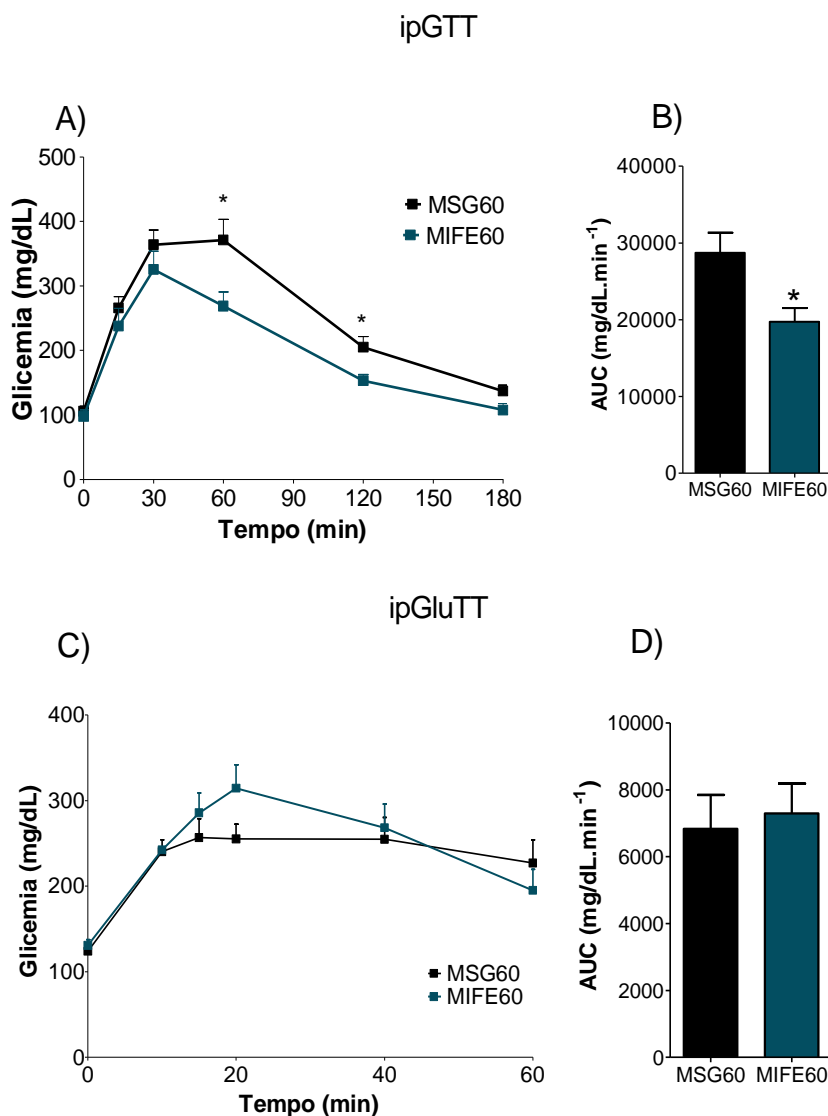


**Figura 9:** Média  $\pm$  EPM do peso do fígado (A), classificação da esteatose hepática (B) de camundongos MSG30 (n=3) e MIFE30 (n=4). Imagens representativas de seções do fígado de camundongos MSG30 e MIFE30 coradas com HE (C). Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de Teste U de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ .

### **5.3 Efeitos do tratamento com MIFE em camundongos MSG a partir dos 60 dias de vida**

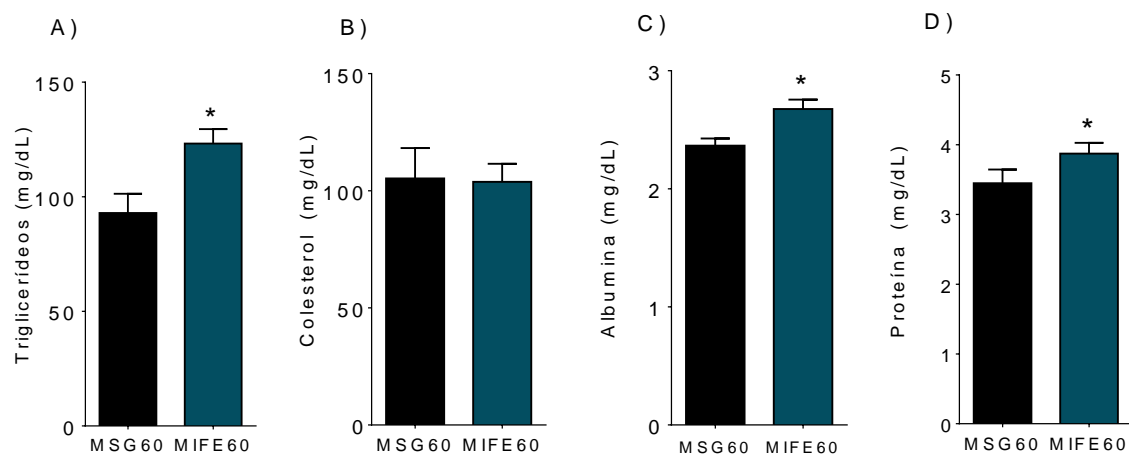
Como descrito acima, os testes de tolerância preliminares indicaram que aos 60 dias de vida os camundongos obesos MSG apresentavam intolerância à glicose e maior produção hepática de glicose em resposta ao glucagon. Frente a esses resultados avaliamos se o tratamento por 30 dias com MIFE poderia levar reversão dos prejuízos na homeostase da glicose nos camundongos MSG.

Foi observado que após 30 dias de tratamento com MIFE, o grupo MIFE 60 apresentou menor glicemia aos 60 e 120 min durante o IPGTT ( $p < 0,04$  e  $p < 0,02$ ; Fig. 10A). O total da glicemia durante o IPGTT foi 31% menor nos camundongos MIFE60 em relação aos camundongos MSG60 ( $p < 0,04$ ; Fig. 10C). A produção de glicose em resposta ao glucagon durante IPGlTT foi similar entre camundongos MIFE60 e MSG60 (Fig. 10B e 10D).



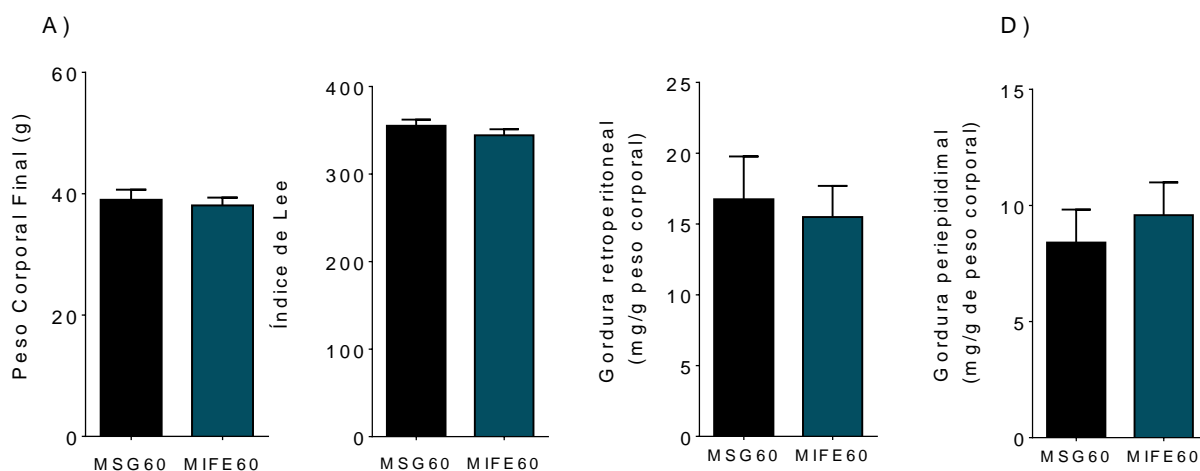
**Figura 10:** Curva glicêmica durante a realização do ipGTT (A; n=13) e ipGluTT (B; n= 5) após 30dias de tratamento de camundongos MSG com veículo ou MIFE, com início do tratamento aos 60 dias de vida. Média  $\pm$  EPM da AUC durante ipGTT (C) e ipGluTT (D) de camundongos aos 60 dias de vida. Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste U de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ . \* representa diferença estatística.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos, foi evidenciado hipertrigliceridemia ( $p < 0,01$ ; Fig. 11A), hiperalbuminemia ( $p < 0,04$ ; Fig. 11C) e aumento na concentração de proteínas totais ( $p < 0,02$ ; Fig. 11D), porém sem diferenças na colesterolemia (Fig. 11B) em camundongos MIFE60, quando comparados aos MSG60.



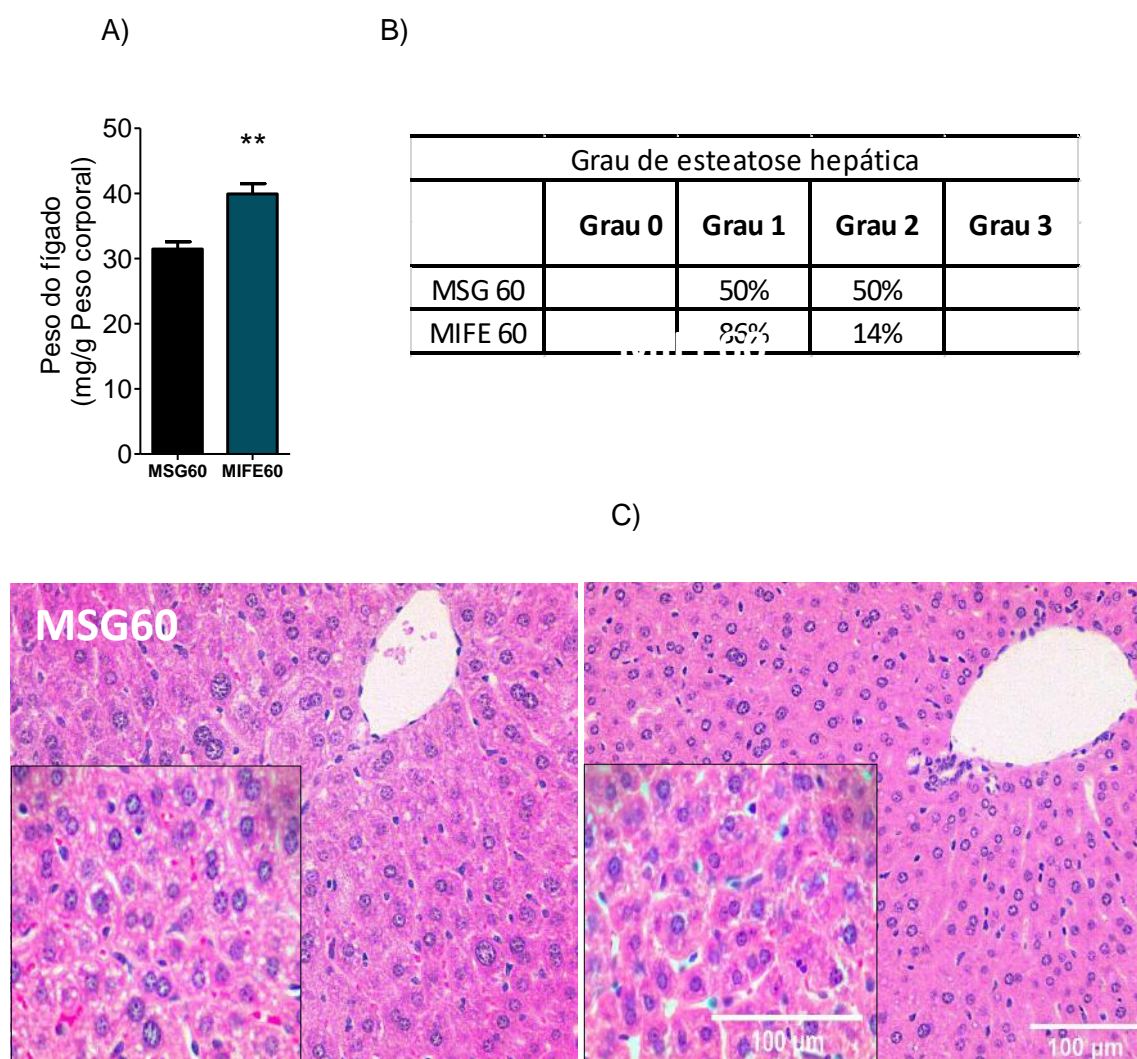
**Figura 11:** Média  $\pm$  EPM da concentração plasmática de triglicerídeos (A), proteínas totais (B), albumina (C) e colesterol (D) de camundongos MSG60 (n=14) e MIFE60 (n=15) após a administração de veículo ou MIFE durante 30 dias. Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste *U* de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ . \* representa diferença estatística.

Na avaliação da obesidade, o peso corporal final (Fig. 12A), índice de Lee (Fig. 12B) e peso dos estoques de gorduras retroperitoneal e periepididimal (Fig. 12C e D) de camundongos MIFE60 apresentaram valores próximos a de camundongos MSG60.



**Figura 12:** Média  $\pm$  EPM peso corporal final (A), índice de Lee (B) e peso dos estoques de gordura retroperitoneal (C) e gordura epididimal (D) de camundongos MSG60 (n=14) e MIFE60 (n=14). Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *t* de *Student* ou teste *U* de *Mann Whitney*,  $p < 0,05$ .

O peso do fígado foi maior no grupo MIFE60 quando comparados aos MSG60 ( $p < 0,01$  Fig. 13A). Na análise histopatológica foi possível observar hepatócitos com formato poliédrico, tamanho uniforme, núcleo centralizado e bordas citoplasmáticas bem definidas em ambos os grupos. Na análise do grau de esteatose, 50% dos camundongos do grupo MSG60 apresentavam esteatose hepática grau 2, evidenciada pela presença de inclusões lipídicas do tipo microvesicular no citoplasma dos hepatócitos (setas pretas na Fig. 13C) e a outra metade esteatose grau 1. Nos camundongos do grupo MIFE60 foi observada atenuação da prevalência de esteatose hepática, visto que apenas 16% dos camundongos apresentavam esteatose grau 2 (Fig. 13C) frente a 86% apresentando grau 1.



**Figura 13:** Média  $\pm$  EPM do peso normalizado do fígado (A), classificação da esteatose hepática (B) em camundongos MSG60 ( $n=4$ ) e MIFE60 ( $n=7$ ). Imagem representativa de cortes histológicos de fígado de camundongos MSG60 e MIFE60 coradas com HE (C). Dados analisados por *Shapiro-Wilk* seguido de teste *U* de *Mann Whitney*. \*\* Indica diferença estatística  $p < 0,006$ .

## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstramos que o estabelecimento da intolerância à glicose e maior produção hepática de glicose em resposta ao glucagon em camundongos obesos MSG ocorre entre os 30 e 60 dias de vida. Ainda, evidenciamos que o tratamento com MIFE em camundongos obesos MSG, a partir dos 60 dias de vida, leva a melhora da intolerância a glicose e atenua a deposição de gordura no fígado, apesar de aumentar o peso do fígado e os valores plasmáticos de triglicerídeos, albumina e proteínas totais.

A intolerância à glicose em roedores obesos MSG com 20 semanas de vida foi relatada nos anos 90 (HIRATA *et al.*, 1997), porém não está claro na literatura o período da vida em que as alterações glicêmicas se estabelecem nesses animais. Em nosso estudo observamos que os prejuízos na homeostase da glicose em camundongos MSG se manifestam entre os 30 e 60 dias de vida.

As alterações na homeostase da glicose na obesidade MSG podem ser decorrentes da hiperatividade do HHA e da hipercorticosteronemia (MIRANDA *et al.*, 2016), portanto, o antagonismo do GR poderia ser uma estratégia terapêutica para reestabelecimento da homeostase glicêmica neste tipo de obesidade. Em nosso estudo, camundongos MSG tratados com MIFE a partir dos 60 dias de vida, apresentaram melhora a tolerância à glicose. Esses achados corroboram com evidências anteriores que demonstraram que o tratamento com MIFE melhora a homeostase da glicose na obesidade. HASHIMOTO e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com 30 mg/Kg de peso corporal de MIFE por 3 meses em camundongos C57Bl/6Ncr alimentados com HFD reduziu a glicemia. Efeitos semelhantes foram observados em camundongos *ob/ob* após 21 dias de tratamento com 30 mg/Kg de peso corporal de MIFE (GETTYS *et al.*, 1997). Em ratos *Sprague Dawley* alimentados com HFD, BEAUDRY e colaboradores (2014) observaram que o tratamento com 80 mg/Kg de peso corporal de MIFE ou antagonistas seletivos do GR preveniu a intolerância à glicose em ratos que foram tratados com corticosterona. Portanto, a melhora na tolerância à glicose no grupo MIFE60 deve ser decorrente da amenização da hipercorticosterolemia nesses animais, visto que já foi demonstrado na literatura que roedores MSG são hipercortisolêmicos aos 60 dias de idade (TOKUIAMA & HIMMS-HAGEN, 1989).

Sabe-se que aumento da corticosteronemia em roedores MSG pode modificar a secreção da insulina e do glucagon, o que contribui para a intolerância à glicose e maior produção hepática de glicose. Foi observado que camundongos tratados com dexametasona apresentam hipersecreção de insulina e glucagon (RAFACHO *et al.*, 2014). A adrenalectomia em camundongos MSG na quinta semana de vida previne a hiperinsulinemia (TOKUIAMA E HIMMS-HAGEN, 1989). Portanto, a menor ação da corticosterona em camundongos MSG tratados com MIFE pode ter melhorado a secreção de hormônios que regulam e contrarregulam a glicemia, contribuindo para a melhora na tolerância à glicose no grupo MIFE60.

Surpreendentemente, o tratamento de camundongos MSG com MIFE aos 30 dias de vida não modificou a tolerância à glicose. Foi demonstrado que a exposição aos GC está associada a prejuízos na supressão da secreção de glucagon em resposta ao aumento na concentração plasmática de glicose (RAFACHO *et al.*, 2014). O quantitativo de células  $\alpha$  pancreáticas aumenta consideravelmente no período pós administração pré-natal de MSG até os 30 dias de vida dos camundongos, enquanto o aumento no número de células  $\beta$  nesse período é menor (NAKAYAMA *et al.*, 2012). Além disso, foi visto que o tratamento de camundongos *Swiss* com dexametasona aumenta a desgranulação das células  $\alpha$  e  $\beta$ , sem afetar os níveis transcricionais do glucagon e da insulina (RAFACHO *et al.*, 2014). Dessa forma é possível que o efeito da supressão da hipercorticosterolemia reflita inicialmente na redução da concentração plasmática de insulina, enquanto os efeitos na hiperglucagonemia seja observado após os 60 dias de vida de camundongos MSG, quando o número de células  $\alpha$  pancreáticas diminui acentuadamente. A redução na concentração plasmática de glucagon reduziria a produção hepática de glicose, o que resultaria no melhor controle dos níveis plasmáticos de glicose. Dessa forma, mais estudos são necessários para melhor compreensão das modificações nos níveis da insulina e glucagon em camundongos MSG tratados com MIFE.

A resistência à insulina é um importante fator de risco para o desenvolvimento da DHGNA (UTZSCHNEIDER & KAHN, 2006). Como demonstrado anteriormente na literatura (COELHO *et al.*, 2018), também observamos que camundongos MSG a partir de 60 dias de vida apresentam esteatose hepática. Foi demonstrado que camundongos HFD tratados com MIFE apresentam menor deposição hepática de gordura (BREAUDRY *et al.*, 2014).



Além disso, evidenciamos que camundongos MSG tratados com MIFE a partir dos 60 dias de vida apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TG quando comparados à camundongos MSG tratados com veículo (FIGURA 9). KROON e colaboradores (2018) evidenciaram que camundongos *C57Bl/6J* alimentados com HFD e frutose e que foram tratados com 60 mg/Kg de MIFE por 5 dias não apresentam modificações na trigliceridemia. No entanto, o tratamento com antagonistas seletivos do GR resultou em menores níveis de TG plasmáticos. Essas evidências sugerem que a atividade farmacológica da MIFE no metabolismo lipídico pode não se basear apenas no simples antagonismo competitivo GR. Estudos tem demonstrado que a MIFE interage com proteínas da família PPAR, fatores de transcrição que participam da regulação da expressão de apolipoproteínas - estruturas lipoprotéicas responsáveis pelo transporte de COL e TG (LIN *et al.*, 2012; MILLAR *et al.*, 2008). Dessa forma a maior concentração de TG plasmático em camundongos MIFE60 pode ser resultado de interações da MIFE para além do GR.

Nesse estudo observamos que camundongos MSG tratados com MIFE a partir dos 60 dias de vida apresentaram maior peso do fígado. YAO e colaboradores (2021) também observaram similar efeito que camundongos *C57Bl/6J* tratados com 100 mg/kg de MIFE por 5 dias, sendo associado tal efeito devido ao aumento da proliferação de hepatócitos. Esses autores também relataram que o tratamento com MIFE em camundongos *knockout* para o receptor pregnano X (PXR) impediu a hepatomegalia. Assim, apesar de não ser observadas modificações no número de hepatócitos no parênquima hepático do grupo MIFE60, é possível a MIFE também esteja agindo via PXR e modificando o peso do fígado. Este efeito poderia contribuir para a maior produção hepática de proteínas, o que justificaria a maior albuminemia e proteínas totais plasmáticas no grupo MIFE60.

Por fim, o tratamento com MIFE não modificou os parâmetros de obesidade de camundongos MSG. Curiosamente, a adrenalectomia de camundongos MSG aos 30 dias de vida resulta e menor peso dos estoques de gordura (TOKUYAMA *et al.*, 1989). O tratamento de camundongos HFD com CORT e antagonistas seletivos GR apresentou menor peso corporal em relação a camundongos HFD tratados apenas com CORT (BREAUDRY *et al.*, 2014). Nesse trabalho observamos que camundongos MSG tratados com MIFE não apresentaram alteração no peso corporal ou nos estoques de gordura. Esse resultado também foi observado em outros modelos de

camundongos obesos tratados com MIFE (GETTYS *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2013; BREAUDRY *et al.*, 2014). Sabe-se que a isoforma GR $\alpha$ , que possui domínio de ligação aos GC (LEWIS-TUFFIN *et al.* 2007), atua reduzindo a expressão das proteínas desacopladoras no tecido adiposo marrom (VIENGCHAREUN *et al.*, 2001), assim o antagonismo dessa isoforma poderia favorecer o aumento do gasto energético por propagação de calor. No entanto, apesar da MIFE ser descrita como clássico antagonista competitivo, estudos sugerem que na obesidade esse fármaco pode atuar como um agonista inverso da isoforma GR $\beta$  e agonista parcial da isoforma GR $\alpha$  (MIN *et al.*, 2018). Nesse caso o efeito do desacoplamento da cadeia fosforilativa seria menos significativo. Dessa forma considerando a capacidade da MIFE de reduzir a atividade das isoformas GR $\alpha$  e GR $\beta$ , além de interagir com proteínas para além do GR torna-se necessários mais estudos a fim de compreender os mecanismos farmacológicos da MIFE no contexto da obesidade.

Nesse estudo foi evidenciado que o estabelecimento dos prejuízos na homeostase da glicose em camundongos MSG ocorre no período dos 30 aos 60 dias de vida. A administração de MIFE em camundongos MSG aos 60 dias de vida de, quando a intolerância a glicose já está estabelecida, reverte tais prejuízos na homeostase da glicose. Quanto a esteatose hepática, o estabelecimento da DHGNA é progressivo no tecido hepático de camundongos MSG a partir dos 60 dias de vida, dessa forma observamos um menor percentual de camundongos MIFE60 com esteatose moderada em comparação aos camundongos MSG60.

## **7. CONCLUSÃO**

Os prejuízos na homeostase da glicose ocorrem no período entre os 30 a 60 dias de vida de camundongos MSG. A MIFE é uma ferramenta farmacológica capaz de melhorar a homeostase da glicose de camundongos MSG com prévia intolerância à glicose, com potencial benefício para melhora da esteatose hepática.

## 8. FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNER B. L. *et al.* The Novel Progesterone Receptor Antagonists RTI 3021–012 and RTI 3021–022 Exhibit Complex Glucocorticoid Receptor Antagonist Activities: Implications for the Development of Dissociated Antiprogestins<sup>1</sup>. **Endocrinology**, 140(3), 1449–1458, 1999.

ARAUJO, T. R. *et al.* Benefits of L-alanine or L-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. **European Journal of Nutrition**, p. 1–12, 2016

ARAÚJO A. R. *et al.* Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver disease/non-alcoholic Steatohepatitis: What We Need in the Future. **Liver International**; 38 Suppl 1:47-51, 2018.

ARAUJO T. R. *et al.* Glucose Intolerance in Monosodium Glutamate Obesity Is Linked to Hyperglucagonemia and Insulin Resistance in  $\alpha$  Cells. **Cell Physiol**; 234(5):7019-7031, 2018.

ARONIS A. *et al.* Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. **Free Radical Biology & Medicine**, 38(9):1221-1230, 2005.

ASAGAMI T. *et al.* Selective Glucocorticoid Receptor (GR-II) Antagonist Reduces Body Weight Gain in Mice. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2011.

BAGDADE J. D. *et al.* Glucocorticoids and triglyceride transport: Effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat. **Metabolism**; vol. 25, issue 5, pages 533-542, 1976.

BEAUDRY J. L. *et al.* Effects of selective and non-selective glucocorticoid receptor II antagonists on rapid-onset diabetes in young rats. **PLoS One**; 9(3): e91248, 2014.

BESSONE F. *et al.* Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2018.

BERNAL-SORE I. *et al.* Mifepristone enhances insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in skeletal muscle cells. **Mol Cell Endocrinol**; 461: 277-283, 2018.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BOSSCHER K., DESMET S. J. Glucocorticoid Receptors: Finding the Middle Ground. **J Clin Invest**;127(4):1136-1145, 2017.

BROWN P. D. *et al.* Acute impairment of insulin signalling by dexamethasone in primary cultured rat skeletal myocytes. **Mol Cell Biochem**; 297(1-2):171-7,

BURÉN J. *et al.* Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **Eur J Endocrinol**; 146(3):419-29, 2002.

BURÉN J. *et al.* Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**; 474(1):91-101, 2008.

BURKE S. J. *et al.* One week of continuous corticosterone exposure impairs hepatic metabolic flexibility, promotes islet  $\beta$ -cell proliferation, and reduces physical activity in male C57BL/6 J mice. **J Steroid Biochem Mol Biol**; 195:105468, 2019.

BUNYAN J. *et al.* The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **BRITISH Journal of Nutrition**, Volume 35, Issue 1, pp. 25-39, 1976.

CANTELLI K. R. *et al.* Duodenal-jejunal bypass normalizes pancreatic islet proliferation rate and function but not hepatic steatosis in hypothalamic obese rats. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 5, 2017.

CHAMPANERI S. *et al.* Diurnal Salivary Cortisol is Associated With Body Mass Index and Waist Circumference: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Obesity (Silver Spring)**; 21(1): E56 - E63, 2013.

CHEN G. *et al.* Pirfenidone prevents and reverses hepatic insulin resistance and steatohepatitis by polarizing M2 macrophages. **Lab Invest**; 99(9):1335-1348, 2019.

CHRIST-CRAIN M. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. **FASEB J**; 22(6):1672-83, 2008.

COELHO C. F. F. *et al.* Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**; vol 2, 2018.

COUTINHO A. E., CHARPAMAN K. E. The Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of Glucocorticoids, Recent Developments and Mechanistic Insights. **Mol Cell Endocrinol**, Mar 15;335(1):2-13, 2011.

DALNIKOFF M. *et al.* Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *International Journal of Obesity*; 25, 426–433, 2001.

ELE B. *et al.* Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Regulates Gluconeogenesis and Inflammation in Mouse Liver. **Mol cell Biol**; 36(5): 714–730, 2016.

FABBRINI E. *et al.* Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. **Hepatology**; 51(2): 679–689, 2010.

FERRAÙ F. E KORBONITS M. Metabolic Syndrome in Cushing's Syndrome Patients. **Front Horm Res**; 49:85-103, 2018.

FLESERIU M. *et al.* Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**; 97(6):2039-49, 2012.

FRANKO A. *et al.* Bezafibrate ameliorates diabetes via reduced steatosis and improved hepatic insulin sensitivity in diabetic TallyHo mice. **Molecular Metabolism**; volume 6, issue 3, Pages 256-266, 2017.

GALLAGHER P. E YOUNG A. *et al.* Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. **Neuropsychiatr Dis Treat**; 2(1): 33–42, 2006.

GASPAR R. S. *et al.* Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG-obese female rats. **Journal of Endocrinology**; 229 (2), 2016.

GETTYS T. W. *et al.* RU-486 (Mifepristone) ameliorates diabetes but does not correct deficient beta-adrenergic signalling in adipocytes from mature C57BL/6J-ob/ob mice. **Int J Obes Relat Metab Disord**; 21(10):865-73, 1997.

GUIMARÃES E. D. *et al.* Altered behavior of adult obese rats by monosodium l-glutamate neonatal treatment is related to hypercorticosteronemia and activation of hypothalamic ERK1 and ERK2. **Nutr Neurosci**.Apr;20(3):153-160, 2017.

GUIMARÃES E. S. G. *et al.* Via de sinalização MAPK hipotalâmica e perfil comportamental do modelo de obesidade MSG. **Principia: Caminhos Da Iniciação Científica**, 16, 11-18, 2012.

HANSEN L. L. *et al.* Insulin Signaling Is Inhibited by Micromolar Concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Jornal of Biological Chemistry**; 274, 25078-25084, 1999.

HASHIMOTO T. *et al.* Mifepristone Promotes Adiponectin Production and Improves Insulin Sensitivity in a Mouse Model of Diet-Induced-Obesity. **PloS one**; V.8 e79724, 2013.

HASHIMOTO T. *et al.* Mifepristone Promotes Adiponectin Production and Improves Insulin Sensitivity in a Mouse Model of Diet-Induced-Obesity. **Plos One**; novembro de 2016.

HETHERINGTON A. W., RANSON S. W. Experimental hypothalamico-hypophyseal obesity in the rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Exp Biol Med (New York, N.Y.)**;41(2):465-6, 1939.

HINDS T. D. *et al.* Discovery of Glucocorticoid Receptor- $\beta$  in Mice with a Role in Metabolism. **Mol Endocrinol**; 24(9): 1715–1727, 2010.

HIRATA A. E. *et al.* Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res*; 30(5):671-4, 1997.

HOTAMISLIGIL G. S. *et al.* Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha: Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. **Science**; 259(5091):87-91, 1993.

HU S. *et al.* Prenatal caffeine exposure increases the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease in female offspring rats via activation of GR-C/EBP $\alpha$ -SIRT1 pathway. **Toxicology**; 417:23-34, 2019.

HU Y. *et al.* GR-mediated FTO transactivation induces lipid accumulation in hepatocytes via demethylation of m<sup>6</sup>A on lipogenic mRNAs. **RNA Biol**; 17(7):930-942, 2020.

INSTITUTO GLOBAL McKinsey. **The obesity crisis**. The Cairo Review os Global Affairs, julho, 2015.

JACKSON S.E. E STEPTOE A. Obesity, perceived weight discrimination and capillary cortisol: a population-based study. **Psychoneuroendocrinology**, 98, 67-73, 2018.

JACKSON S. E. *et al.* Hair cortisol and adiposity in a population-based sample of 2,527 men and women aged 54 to 87 years. **Obesity (Silver Spring)**; 25(3):539-544, 2017.

JORNAYVAZ F. R. *et al.* Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C $\epsilon$  and Hepatic Insulin Resistance. **Cell Metab**; 15 (5): 574-84, 2012.

JURUENA M. F. *et al.* O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev Bras Psiquiatr**; 26(3): 189-201, 2004.

KANG Y. M. *et al.* Visceral adiposity index predicts the conversion of metabolically healthy obesity to an unhealthy phenotype. **PLoS One**; 12 (6): e0179635, 2017.

KANG J. H *et al.* Dietary Capsaicin Reduces Obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet. **Obesity**, 18(4), 780–787, 2009.

KATHLEEN A. *et al.* Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development*; vol 25, issues 10-11, 2004.

KIZER J. S *et al.* Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacol Ren.** 1997, V.24, p 301-318.

KIM M. Y. Hemodynamic alterations in cirrhosis and portal hypertension. **Korean J Hepatol**; 16(4): 347–352, 2010.

KIM M. *et al.* Histone deacetylase inhibition attenuates hepatic steatosis in rats with experimental Cushing's syndrome. **Korean J Physiol Pharmacol**; 22(1): 23-33, 2018.

KOEK G. H. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Ned Tijdschr Geneesk**; 155:A318, 2011.

KROON J. *et al.* The development of novel glucocorticoid receptor antagonists: From rational chemical design to therapeutic efficacy in metabolic disease models. **Pharmacological Research**; 168, 2021.

KUO T. *et al.* Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. **Adv Exp Med Biol**; 872:99-12, 2015.

LANTHIER N. *et al.* Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**; 298: G107–G116, 2010.

LEWIS-TUFFIN L. J. *et al.* The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. **Ann N Y Acad Sci**; 1069:1-9, 2006.

LEWIS-TUFFIN L. *et al.* Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. **Mol Cell Biol**; 27(6): 2266–2282, 2007.

LIN R. C. Effects of Hormones on Apolipoprotein Secretion in Cultured Rat Hepatocytes. **Metabolism**;37(8):745-51, 1988.

LIU Y. *et al.* Increased glucocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. **Diabetes**; 54(1):32-40, 2005.

LIN S. *et al.* Revealing a steroid receptor ligand as a unique PPAR $\gamma$  agonist. **Cell Res**; 22(4): 746–756, 2012.

LJUNG T. *et al.* Inibição da secreção de cortisol pela dexametasona em relação à distribuição de gordura corporal: um estudo dose-resposta. **Obes Res**; 4 (3): 277-82, 1996.

LUMENG C. N. *et al.* Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 292(1):E166-74, 2007.

MERINO B. *et al.* Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11622, 2015.

MACHO L *et al.* Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res**. 2000;49(suppl. 1):S79-85.

MALIK S. *et al.* Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) Responses Require Actions of the Melanocortin-2 Receptor Accessory Protein on the Extracellular Surface of the Plasma Membrane. **J Biol Chem**. 290(46): 27972–27985, 2015.

MARINO J. S. *et al.* Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Induces Hepatic Steatosis by Augmenting Inflammation and Inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\alpha$ . **J Biol Chem**; 291(50):25776-25788, 2016.

MILLAR J. S. *et al.* Potent and selective PPAR-alpha agonist LY518674 upregulates both ApoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 29(1):140-6, 2009.

MIN J. *et al.* Probing Dominant Negative Behavior of Glucocorticoid Receptor  $\beta$  through a Hybrid Structural and Biochemical Approach. **Molecular and Cellular Biology**; 38(8): e00453-17, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Obesidade e Desnutrição**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/obesidade\\_desnutricao.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/obesidade_desnutricao.pdf)>

MIRANDA R. A. *et al.* HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. *Journal of endocrinology*; vol 230, issue1, pg 27-38, 2016.

MOONEY R. A. Suppressors of Cytokine signaling-1 and -6 Associate With and Inhibit the Insulin Receptor. A Potential Mechanism for Cytokine-Mediated Insulin Resistance. **J Biol Chem**; 276(28):25889-93, 2001.

MORGAN F. H. E LAUFGRABEN M. J. Mifepristone for management of Cushing's syndrome. **Pharmacotherapy**; 33(3):319-29, 2013.  
**Ministério da Saúde**. Biblioteca virtual. SÍNDROME METABÓLICA, 15 de Fevereiro de 2018.

NAKAYAMA D. *et al.* Turnover of Acinar and Islet Cells in the Pancreas of Monosodium Glutamate-Treated Obese Mice. **Obesity Research**; Volume11, Issue1, Pages 87-94, 2012.

NI Y. *et al.* Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid,  $\beta$  cryptoxanthin. **Endocrinology**; 156(3):987-99; 2015.

OBICI S. *et al.* Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. **Nat Neurosci**; 5(6):566-72, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity*. **Geneva: WHO**; 1998.



PAPAFOTIOU C. *et al.* Hair cortisol concentrations exhibit a positive association with salivary cortisol profiles and are increased in obese prepubertal girls. **Stress**; 20(2):217-222, 2017.

PASQUALI R. *et al.* Cortisol and ACTH Response to Oral Dexamethasone in Obesity and Effects of Sex, Body Fat Distribution, and Dexamethasone Concentrations: A Dose-Response Study. **J Clin Endocrinol Metab**; 87(1):166-75, 2002.

PATTERSON R. E. *et al.* Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 310(7): E484–E494, 2016.

PASTORE A. P. *et al.* Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. **J. Bras. Nefrol.** Vol. 32. 2010.

PASQUALI *et al.* The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution. **J Clin Endocrinol Metab**; 77 (2): 1993.

PIRGON O. *et al.* Association Between Insulin Resistance and Oxidative Stress Parameters in Obese Adolescents With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**;5(1):33-9, 2013.

PRIYADARSHINI E., ANURADHA C. V. Glucocorticoid Antagonism Reduces Insulin Resistance and Associated Lipid Abnormalities in High-Fructose-Fed Mice. **Can J Diabetes**; 41(1):41-51, 2017.

POWELL D. J. *et al.* Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. **Mol Cell Biol**; 23(21):7794-808, 2003.

PUIG J. *et al.* Hypothalamic Damage Is Associated With Inflammatory Markers and Worse Cognitive Performance in Obese Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; Vol. 100: E276–E281, 2015.

RAFACHO A. *et al.* Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats. *Plos One*; 9 (4): e93531, 2014.

RAQUCCI E. *et al.* Effects of Mifepristone on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Patient with a Cortisol-Secreting Adrenal Adenoma. **Case Rep Endocrinol**; 2017: 6161348, 2017.

RATMAN D. *et al.* How Glucocorticoid Receptors Modulate the Activity of Other Transcription Factors: A Scope Beyond Tethering. **Mol Cell Endocrinol**; 380 (1-2): 41-54, 2013.

RODRIGUEZ I. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. **Psychoneuroendocrinology**,

62, 301–318, 2015.

RODRÍGUEZ A. M. PALOU A. The steroid RU486 induces UCP1 expression in brown adipocytes. **Cell and Molecular Physiology**; 449, pages170–174, 2004.

RODRIGUEZ A. C. I. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. **Psychoneuroendocrinology**; 62: 301–318, 2015.

RODRIGUEZ A. C. I. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. **The joenal of clinical endocrinology e metabolismo**, vol. 83, 1853–1859, 1998.

ROSMOND R. *et al.* Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. **J Clin Endocrinol Metab**; 83(6):1853-9, 1998.

SAKODA H. *et al.* Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. **Diabetes**; 49(10):1700-8, 2000.

SAMUEL V. T. *et al.* Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **Biol Chem**; 279(31):32345-53, 2004.

SHARMA B., JOHN S. **Hepatic Cirrhosis**. StatPearls, 2019.

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA**. Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica. <[sbhepatologia.org.br](http://sbhepatologia.org.br)>

SCHAAF M. J. M. *et al.* Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. **Endocrinology**; 149(4):1591-9, 2008.

TARGHER G. *et al.* Associations between liver histology and cortisol secretion in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Endocrinol (Oxf)**; 64(3):337-41, 2006.

THALER J. P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**; 122(1): 153–162, 2012.

TAKESHITA Y. *et al.* Blockade of glucocorticoid receptors with RU486 attenuates cardiac damage and adipose tissue inflammation in a rat model of metabolic syndrome. **Hypertens Res**; 38(11):741-50, 2015.

TORREZAN L. *et al.* Monosodium l-glutamate-obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system. **Journal of Neuroendocrinology**; vol 63 (6), 2016.

UTZSCHNEIDER K. M. E KAHN S. E. et al. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Volume 91, Issue 12, Pages 4753–4761, 2006.

WALLIA A. et al. Improvement in Insulin Sensitivity During Mifepristone Treatment of Cushing Syndrome: Early and Late Effects. **Diabetes Care**; 36(9): e147–e148. 2013.

WAGNER B. L. et al. The novel progesterone receptor antagonists RTI 3021-012 and RTI 3021-022 exhibit complex glucocorticoid receptor antagonist activities: implications for the development of dissociated antiprogestins. **Endocrinology**; 140:1449-1458, 1999.

WANDERLEY E. N., FERREIRA V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. Ciênc. saúde coletiva, vol.15. Rio de Janeiro. Janeiro 2010

**WORLD HEALTHY ORGANIZATION.** Obesidade e excesso de peso. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 08 de junho de 2020.

**World Gastroenterology Organisation Global Guideline.** Doença hepática gordurosa não alcoólica e esteatohepatite não alcoólica, 2012.

VIDAL-PUIG A. *et al.* Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest*; 97(11):2553-61, 1996.

VIGITEL. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.** Ministério da saúde, 2020.

YANG F. *et al.* Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. **Nutr Metab (Lond)**; 15: 30, 2018.

YAN C. *et al.* Increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and hexose-6-phosphate dehydrogenase expression in adipose tissue may contribute to glucocorticoid-induced mouse visceral adiposity. **International Journal of Obesity**; 40(8):1233-1241, 2016.

YANG F. *et al.* Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. **Nutr Metab (Lond)**; 15:30, 2018.

YAO X. P. *et al.* PXR mediates mifepristone-induced hepatomegaly in mice. *Acta Pharmacologica* 0:1–11, 2021.

YOUNOSSI Z. *et al.* Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver disease-Meta-analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. **Hepatology**; 64(1):73-84, 2016.

YU J. *et al.* Chronic glucocorticoid exposure-induced epididymal adiposity is associated with mitochondrial dysfunction in white adipose tissue of male C57BL/6J mice. **PLoS One**; 9(11):e112628, 2014.

ZHANG Y *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**; 372(6505): 425-32, 1994.

ZHANG N. *et al.* Atorvastatin Improves Insulin Sensitivity in Mice With Obesity Induced by Monosodium Glutamate. **Acta Pharmacol Sin**; 31(1):35-42, 2010.

ZOPPINI G. *et al.* Relationship of nonalcoholic hepatic steatosis to overnight low-dose dexamethasone suppression test in obese individuals. **Clin Endocrinol (Oxf)**; 61(6):711-5, 2004.

ZUKIEWICZ-SOBCZAK W. *et al.* Obesity and poverty paradox in developed countries. **Ann Agric Environ Med**; 21(3):590-4, 2014.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1:** Certificado de aprovação para utilização dos camundongos emitida pela CEUA UFRJ-Macaé sob nº: 054.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ



**Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé  
(CEUA-Campus UFRJ-Macaé)**

### C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da contribuição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sobre a intolerância à glicose e regulação da ação e secreção de insulina e glucagon em camundongos obesos MSG (glutamato monossódico) registrada com o nº MAC054, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé, em 27/08/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/08/2018 a 27/08/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss/Camundongo
Nº de animais	110
Peso/Idade	1-2 g/ 1-2 dias; 50 g/90-104 dias
Sexo	20 Fêmeas e 90 Machos
Origem	Biotério de Reprodução de Roedores, Nupem, Campus UFRJ-Macaé. Biotério de reprodução de roedores, UFRJ Campus Fundão. CECAL Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.