



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KARISSA SATOMI HAIDA

IMPLANTAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERPRODUÇÃO HEPÁTICA
DE GLICOSE PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS COM POTENCIAL
ANTIDIABÉTICO

MARINGÁ

2011

KARISSA SATOMI HAIDA

IMPLANTAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERPRODUÇÃO HEPÁTICA
DE GLICOSE PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS COM POTENCIAL
ANTIDIABÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte

MARINGÁ

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

H149i Haida, Karissa Satomi
Implantação de modelos experimentais de hiperprodução
hepática de glicose para avaliação de fármacos com
potencial antidiabético / Karissa Satomi Haida. -- Maringá,
2011.
62 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2011

1. Diabetes mellitus. 2. Metabolismo hepático. 3. Dieta
hiperlipídica. 4. Sacarose. 5. Infliximabe. I. Bazotte,
Roberto Barbosa, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed.- 616.462

KARISSA SATOMI HAIDA

IMPLANTAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERPRODUÇÃO HEPÁTICA
DE GLICOSE PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS COM POTENCIAL
ANTIDIABÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá
Presidente-Orientador

Prof^a. Dra. Maria Angélica Raffaini Cóvas Pereira da Silva
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dra. Maria Montserrat Diaz Pedrosa Furlan
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas.

Ao Professor Doutor Roberto Barbosa Bazotte, paciente orientador e organizador dos meus pensamentos desconexos. Sem dúvida, uma das melhores pessoas que a universidade me permitiu conhecer e um estímulo para ver na Academia um caminho para a vida.

Aos meus pais, irmãos e a toda a minha família que, com muito apoio e compreensão, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradeço ao meu noivo Rogério, por estar sempre ao meu lado me apoiando, e me dando forças para nunca desistir.

À Universidade Estadual de Maringá onde encontrei um ambiente acolhedor e com ótima infra-estrutura e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Ao Carlos Eduardo, Solidalva, Helenton, Thauany, Kássia, Antônio, Vânia pela agradável convivência, pelos conhecimentos transmitidos e ajuda para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Marco Rocha Loures pela disponibilização do Infleximabe.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO - A hiperprodução hepática de glicose (HHG) contribui significativamente na determinação da hiperglicemia associada à resistência à insulina. No entanto, modelos experimentais animais para estudar produtos biologicamente ativos que possam reduzir a HHG são escassos. Além disso, deve-se considerar que na prática clínica há somente um medicamento antidiabético com papel bem estabelecido na redução da HHG, ou seja, a metformina. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas drogas para reduzir a HHG que por sua vez, depende da implantação de modelos experimentais apropriados. Além disso, devido ao fato de que o infliximabe, um antagonista do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), além de seu estabelecido papel no tratamento de doenças inflamatórias, melhora o controle glicêmico, decidimos investigar também a possibilidade deste agente impedir a hiperprodução hepática de glicose induzida por dietas ricas em gordura saturada ou sacarose. **OBJETIVO** – Implantar um modelo experimental de HHG induzida por dietas e avaliar a possibilidade de impedir esta alteração metabólica através do uso do infliximabe. **MATERIAIS E MÉTODOS** – Camundongos Swiss (30-35 g) foram utilizados. No primeiro estudo, o grupo controle (C) recebeu dieta padrão e o grupo dieta hiperlipídica (HL) recebeu dieta padrão enriquecida com gordura suína, na proporção de 1,2 g/1,0 g, respectivamente. O grupo HL foi subdividido em: dieta HL + Infliximabe (10 μ g/100 μ L de salina, via intraperitoneal (i.p), duas vezes ao dia) e dieta HL + Salina (100 μ L, via i.p, duas vezes ao dia). Após duas semanas, os grupos Controle, dieta HL + Salina e dieta HL + Infliximabe, em jejum noturno de 15 hs, foram anestesiados com tiopental (120 mg/kg) e submetidos à laparotomia. Precedendo a perfusão *in situ*, o sangue da veia cava foi coletado para avaliação da glicemia. Após um período de pré-infusão (10 min), o substrato gliconeogênico L-alanina, dissolvido no fluido de perfusão, foi perfundido durante 60 min, seguido de um período de pós-infusão (10 min) para permitir o retorno aos níveis basais.

Amostras do líquido de perfusão foram coletadas a cada 5 min e a produção hepática de glicose, uréia, piruvato e L-lactato foi avaliada. As diferenças nas concentrações de glicose, uréia, piruvato e produção de L-lactato antes e durante a infusão de L-alanina permitiram o cálculo da área sob a curva (AUC). Assim, utilizando uma concentração supra fisiológica de L-alanina (5 mM), foi possível comparar a capacidade máxima do fígado para produzir glicose a partir deste aminoácido. No segundo estudo, os animais receberam dieta padrão (grupo Controle) ou dieta enriquecida com sacarose 30% (p/v) dissolvida na água (grupo DES), sendo comparados por até quatro semanas. Neste período, a ingestão calórica do líquido e da ração foi avaliada. O peso corporal foi medido semanalmente. Após duas, três ou quatro semanas, os grupos Controle e DES, em jejum noturno de 15 hs, foram submetidos à coleta de sangue para avaliação da glicemia e, em seguida, realizou-se a perfusão de fígado *in situ* para avaliação da produção hepática de glicose, uréia, piruvato e L-lactato a partir de L-alanina (5 mM) como descrito anteriormente. Após o término destes procedimentos, as gorduras retroperitoneal, epididimal e inguinal foram retiradas e pesadas. **RESULTADOS** - Camundongos que receberam dieta HL apresentaram hiperglicemia de jejum e maior produção hepática de glicose a partir da L-alanina, mas essas alterações foram impedidas pelo tratamento com infliximabe. No entanto, camundongos tratados com a dieta enriquecida com sacarose durante duas, três ou quatro semanas, apesar de apresentarem maior peso corporal, gordura retroperitoneal, epididimal e inguinal, não apresentaram alterações da glicemia de jejum ou da produção hepática de glicose, uréia, piruvato e L-lactato. **CONCLUSÃO** - Os resultados obtidos abrem a possibilidade para o uso da dieta hiperlipídica como um modelo experimental adequado para estudar fármacos com potencial de impedir a HHG na condição de diabetes e pré-diabetes.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Metabolismo hepático, Dieta hiperlipídica, Sacarose, Infliximabe.

ABSTRACT

INTRODUCTION – Liver glucose overproduction (LGO) contributes significantly in determining hyperglycemia associated with insulin resistance. However, experimental animal models to study potential biologically active products which promote reversibility of liver glucose overproduction are scarce. Moreover, it must be considered that in clinical practice there is only one antidiabetic drug with well established role to overcome the LGO, i.e., metformine. Therefore, it becomes necessary to develop new drugs to reduce the LGO which in turn, depends on the implementation of appropriated experimental models. Moreover, since infliximabe, a tumor necrosis factor alpha (TNF- α) antagonist, show a well established role to treat inflamatory diseases and to obtain a better glycemc control, we decided to investigate the possibilly of this agent to prevent liver glucose overproduction induced by saturated fat diet or diet enriched with sucrose. **AIM** – The implantation of one experimental model of LGO induced by diet and evaluate the possibility of prevention of this metabolic disorder with infliximabe. **MATERIALS AND METHODS** - Male Swiss mice (30-35 g) were used. In the first study, the control group (C) received standard diet and the high lipid (HL) group received standard diet enriched with pork fat, in the proportion of 1,2 g/1,0 g, respectively. The HL group was subdivided in HL mice treated with intraperitoneal (i.p) infliximabe (10 μ g dissolved in 100 μ L of saline) twice a day and HL mice treated with i.p saline (100 μ L) twice a day. After two weeks Control, HL + Saline and HL + Infliximabe groups (15 hs overnight fasting) were anesthetized with thiopental (120 mg/kg) and submitted to laparotomy. Before in situ liver perfusion, the blood was collected from cava vein for glucose evaluation. After a pre-infusion period (10 min), the gluconeogenic substrate L-alanine were dissolved in the perfusion fluid during 60 min, followed by a post-infusion period (10 min) to allow the return to basal levels. Samples of the effluent perfusion fluid were collected at 5 min intervals and the liver production of glucose, urea, pyruvate and L-lactate were evaluated. The differences

in the glucose, urea, pyruvate and L-lactate production during and before the infusion of L-alanine allowed calculating the area under the curves (AUC). Thus, by using supraphysiological concentration of L-alanine (5mM) it was possible to measure the maximal capacity of the liver to produce glucose from this amino acid. In the second study, the animals which received standard diet (Control group) or standard diet plus sucrose 30% (w/v) dissolved in the water (group DES) until four weeks were compared. During this period the daily food and water ingestion were measured and the daily caloric intake were evaluated. Body weigh were measured weekly. After two, three or four weeks of treatment Control and DES groups (15 hs overnight fasting) were submitted to anesthesia and after blood collection for glucose evaluation, the livers were perfused and the glucose, urea, pyruvate and L-Lactate production from L-alanine were done. Finally, the retroperitoneal, epididimal and inguinal fat were removed and weighted. **RESULTS** - Mice which received HF diet showed fasting hyperglycemia and increased liver glucose production from L-alanine but these changes was prevented by the treatment with infliximabe. In contrast, mice treated with high sucrose diet during two, three or four weeks, in spite of the increased body weigh and retroperitoneal, epididimal and inguinal fat, did not show alteration in fasting glycemia or liver glucose, urea, pyruvate and L-Lactate production from L-alanine. **CONCLUSION** – The results open the possibility of using HL diet as a suitable model to study potential antidiabetic drugs with a potential role to promote reversibility of LGO in the diabetic and pre-diabetic condition.

Key-words: Diabetes mellitus, Liver metabolism, Hyperlipidic diet, Sucrose, Infliximabe.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AF - 4-aminofenazona

AUC - Área sob a curva

DES – Dieta enriquecida com sacarose

DM – Diabetes mellitus

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

D.P.M. – Desvio padrão da média

E.P.M. – Erro padrão da média

GOD - Glicose-oxidase

HHG – Hiperprodução hepática de glicose

HL – Hiperlipídica

i.p - Intraperitoneal

KH - Krebs/Henseleit-bicarbonato

LDH - Lactato-desidrogenase

M. – Média

PC – Piruvato carboxilase

POD – Peroxidase

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vista parcial do sistema de perfusão do fígado.....	28
Figura 2. Posições das ligaduras utilizadas para fixação das cânulas e posicionamento destas no fígado no momento do início dos experimentos de perfusão	29
Figura 3. Produção de glicose ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$) a partir de L-alanina em fígados provenientes de animais alimentados com dieta hiperlipídica (HL) ou ração balanceada (Controle) durante duas semanas.....	30
Figura 4. Produção hepática de glicose a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas.....	33
Figura 5. Produção hepática de uréia a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas.....	34
Figura 6. Produção hepática de piruvato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas.....	34
Figura 7. Produção hepática de L-lactato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL , via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas.....	35
Figura 8. Produção hepática de glicose a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas.....	41
Figura 9. Produção hepática de uréia a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas.....	41

Figura 10. Produção hepática de piruvato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas.....42

Figura 11. Produção hepática de L-lactato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas.....42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 µL, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 µL, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas.....33
- Tabela 2. Consumo diário de ração (g) e líquido (mL) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.36
- Tabela 3. Consumo diário de calorias (kcal) presentes na ração e líquidos de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.37
- Tabela 4. Evolução do peso corpóreo (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.....38
- Tabela 5. Evolução da glicemia (mg/dL) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.....38
- Tabela 6. Evolução do peso da gordura retroperitoneal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.39
- Tabela 7. Evolução do peso da gordura epididimal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.39
- Tabela 8. Evolução do peso da gordura subcutânea inguinal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.40
- Tabela 9. Peso do fígado (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) ao longo de quatro semanas.40

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	DIETAS E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS	13
1.2	DIETAS HIPERLIPÍDICAS	14
1.3	DIETAS RICAS EM SACAROSE	15
1.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE RESISTÊNCIA À INSULINA	17
1.4.1	Aspectos gerais	17
1.4.2	Dietas ocidentais	17
1.4.2.1	<i>Dietas hiperlipídicas</i>	18
1.4.2.2	<i>Dietas ricas em sacarose</i>	19
1.5	INFLIXIMABE	20
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVO	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	FÁRMACOS E REAGENTES	24
4.2	ANIMAIS	24
4.3	DIETA HIPERLIPÍDICA E TRATAMENTO COM INFLIXIMABE	25
4.4	DIETA RICA EM SACAROSE.....	25
4.5	EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DO FÍGADO <i>IN SITU</i>	26
4.6	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	31
4.6.1	Dosagem de glicose no perfusado e no soro	31
4.6.2	Dosagem de uréia no perfusado	31
4.6.3	Dosagem de L-lactato no perfusado	32
4.6.4	Dosagem de piruvato no perfusado	32
4.7	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	32
5.	RESULTADOS	33
6.	DISCUSSÃO	43
7.	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIETAS E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS

Devido ao aumento significativo do número de indivíduos obesos ou com sobrepeso, o percentual de portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) na população vem crescendo a cada dia (ZANELLA, KOHLMANN JR, RIBEIRO, 2001). A obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 tornaram-se importantes problemas de saúde pública em nível mundial (ALLISON et al., 1999; CHEN, 2006). No ano 2000, havia 171 milhões de portadores de diabetes mellitus (DM) estimando-se 366 milhões de diabéticos no ano 2030 (WHO, 2004).

O diabetes mellitus constitui um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia crônica, que geralmente resulta de uma deficiência na ação e/ou secreção de insulina. O DM2 está associado à adiposidade visceral, que por sua vez está associada à síndrome de resistência à insulina e, conseqüentemente, à etiologia de muitas outras anormalidades metabólicas (ROSMOND, 2001).

A resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose no músculo e tecido adiposo. Outro aspecto relevante da resistência à insulina é a menor capacidade da insulina em inibir a produção hepática de glicose. Assim, em consequência da menor captação tecidual e maior produção hepática de glicose, torna-se necessário uma maior secreção pancreática de insulina para a manutenção da glicemia acarretando elevação da concentração de insulina no sangue (CORREIA et al., 2002). A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são disfunções metabólicas envolvidas na patogênese do DM2 e, quando presentes e associadas à dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial sistêmica constituem a denominada

síndrome metabólica (ECKEL, GRUNDY, ZIMMET, 2005) que está fortemente associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GALLOU-KABANI et al., 2007).

A interação entre pré-disposição genética e influências ambientais, tais como uma dieta rica em gordura saturada e/ou calorias em excesso associadas ao sedentarismo, são responsáveis pela prevalência da obesidade e suas consequências (GRUNDY, 1998). Além disso, a transição nutricional para uma dieta mais rica em gordura saturada e/ou calorias, contribuem para a maior frequência da síndrome metabólica no mundo atual (BASCIANO, FEDERICO, ADELI, 2005).

A composição da dieta é um importante determinante da ação da insulina (LOMBARDO, CHICCO, 2006). Na síndrome metabólica com resistência à insulina, o fígado é profundamente afetado pelo excesso de nutrientes da dieta (SHOELSON, HERRERO, NAAZ, 2007).

A ingestão calórica excessiva tem sido relacionada com alto teor de gordura nos alimentos, aumento do tamanho das porções e dietas ricas em sacarose (BRAY, POPKIN, 1998). O aumento em geral no consumo de calorias, e especialmente de açúcar refinado, é nítido e correlaciona-se positivamente com maior pré-disposição para a síndrome metabólica (BASCIANO, FEDERICO, ADELI, 2005).

1.2 DIETAS HIPERLIPÍDICAS

O desenvolvimento da obesidade em humanos e dietas hiperlipídicas (HL) encontram-se fortemente associados (ASTRUP et al., 1994), uma vez que as calorias obtidas a partir de gorduras têm um efeito maior sobre o peso corpóreo do que outras fontes de calorias (THOMAS et al., 1992).

A maior parte da gordura ingerida é absorvida como triacilglicerol, sendo esta gordura e os lipídios sintetizados pelo fígado, estocados no tecido adiposo (GAÍVA et al, 2003).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2003, o consumo de gorduras representou 30,5% do total de calorias ingeridas (IBGE, 2004), ultrapassando os padrões nutricionais (15% - 30%) recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Além disso, a pesquisa de orçamentos familiares (POF) realizada em 48.000 domicílios indicou uma associação direta entre nível socioeconômico familiar e consumo de dietas HL, constatando-se em regiões mais desenvolvidas e em famílias de maior renda, maior consumo de gorduras, em particular de gordura saturada (LEVY-COSTA et al., 2005).

O consumo de gorduras é mais elevado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, onde ocorre também uma maior incidência de câncer de mama, pois existe uma associação entre dieta rica em gordura saturada e risco de câncer de mama e próstata (INCA, 2007). Apesar disso, o consumo de dietas HL e pobres em frutas, vegetais e cereais integrais continua elevado em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2003).

Estudos europeus (ARANCETA et al., 2003), norte-americanos (ENNS, MICKLE, GOLDMAN, 2003) e latino-americanos (MONGE-ROJAS, 2001) têm constatado aumento do consumo de dieta HL em adolescentes, independente do tipo de inquérito alimentar utilizado.

1.3 DIETAS RICAS EM SACAROSE

No Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) e no mundo (CHEN et al., 2010) têm sido observado um aumento da ingestão de alimentos ricos em carboidratos e lipídios.

Em um estudo realizado em 2009, em 27 capitais do Brasil, foi constatado que o consumo de refrigerantes e sucos artificiais (com altas concentrações de carboidratos) alcança

76% da população brasileira (VIGITEL, 2010). Em pesquisa realizada pelo IBGE nos anos de 2002-2003 (IBGE, 2004), verificou-se que a ingestão de sacarose no Brasil é de 13,7% do total de calorias ingeridas, enquanto o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de no máximo 10%.

Recentemente, foram detectadas mudanças nos hábitos alimentares, no sentido de um aumento no consumo de carboidratos refinados favorecendo a obesidade (DINIZ et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que o consumo excessivo de bebidas adoçadas contendo açúcar refinado (sacarose/frutose) observado nas últimas décadas, especialmente em crianças, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade (BRAY, NIELSEN, POPKIN, 2004). Um recente estudo que analisou a disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil, constatou excesso de consumo de açúcar e presença insuficiente de frutas e hortaliças na dieta (LEVY-COSTA et al., 2005).

Nos países ocidentais, os açúcares e as gorduras representam componentes cada vez mais importantes da dieta humana (ASTRUP et al., 1996).

Além do amido, carboidratos na forma de edulcorantes como a sacarose, frutose, mel, melaço e outros xaropes constituem os principais componentes da dieta do homem moderno (CAO et al., 2007). A sacarose, principal dissacarídeo da dieta, ao sofrer hidrólise pelas dissacaridases intestinais, produz uma mistura de 50%:50% frutose:glicose (BRAY, NIELSEN, POPKIN, 2004).

O consumo excessivo de carboidratos refinados, especialmente em bebidas, desempenha um papel importante no aumento da frequência de obesidade na população, um fator de risco para o DM2 (CAO et al., 2007). Assim, tem sido recomendada uma redução na ingestão de sacarose, visando minimizar o risco de doenças cardiovasculares e fatores de risco associados, quais sejam, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (HOWARD, WYLIE-ROSSETT, 2002; REAVEN, 2005). Neste

contexto, a Associação Americana de Saúde recomenda que a ingestão diária de carboidratos refinados seja limitada a 30 e 45 g para mulheres e homens, respectivamente (MITKA, 2009). Para que se tenha uma ideia da necessidade desta redução, no Japão, por exemplo, a ingestão diária apenas de sacarose é de 60 g/pessoa (SERI et al., 1996).

1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE RESISTÊNCIA À INSULINA

1.4.1 Aspectos gerais

Para melhor compreender o papel de cada um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, são utilizados modelos experimentais, que visam determinar, de maneira controlada, o papel de cada um dos componentes destes processos fisiopatológicos. Os diferentes modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade podem ser classificados em: a) modelos genéticos: animais com mutação gênica, animais transgênicos ou aqueles em que se produziu *knock-out* de um ou mais genes; b) animais nos quais a resistência à insulina é secundária a uma condição patológica ou, c) animais com resistência à insulina induzida por drogas ou dietas (CESARETTI, KOHLMANN JR, 2006).

1.4.2 Dietas ocidentais

A utilização de modelos experimentais permite, através de uma situação particular, estudar a fisiopatologia da resistência à insulina associada à obesidade, podendo ser obtida por uma mudança no padrão dietético.

Na dieta ocidental ocorre aumento da ingestão de carboidratos e gorduras através da oferta de alimentos de alta palatabilidade acarretando aumento do peso corporal, gordura visceral, desenvolvimento de resistência à insulina e hiperleptinemia (PAULA, SILVA, HALL, 2004). A manutenção desta dieta de alto conteúdo calórico por períodos prolongados pode levar ao desenvolvimento de hipertensão (CESARETTI, KOHLMANN JR, 2006).

1.4.2.1 Dietas hiperlipídicas

Tem sido frequentemente destacado, em estudos realizados em humanos e em animais de laboratório, que a quantidade e a qualidade de gorduras ingeridas na dieta exercem uma influência significativa na pré-disposição às doenças cardiovasculares (SCHREYER, WILSON, LEBOEUF, 1998; CHERKI et al., 2006). A ingestão de gordura presente na dieta favorece o estabelecimento do DM2 em indivíduos susceptíveis (MCGARRY, 1992). Em camundongos e humanos, dietas ricas em gorduras resultam em aumento de peso e obesidade, acompanhados de resistência à insulina e alterações da tolerância à glicose (KENDIG et al., 2008; LIU, MANSON, 2001). Portanto, dietas HL têm sido utilizadas para a indução do DM e da obesidade (KOBAYASHI et al., 2004) associadas com o aumento da gordura visceral (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1993).

A ingestão voluntária de alimentos ricos em gorduras aumenta a adiposidade a curto prazo (FOSTER et al., 2009). Os lipídios dietários presentes no sangue influenciam a ação da insulina e o metabolismo hepático da glicose (BERGMAN, ADER, 2000), podendo acelerar a gliconeogênese em ratos (SAMUEL et al., 2004).

Observa-se que ratos alimentados com dieta HL consomem mais calorias, e não só aumentam o peso corporal, mas também acumulam mais lipídios no tecido adiposo, músculos, fígado e no coração em relação aos animais alimentados com dieta padrão (VAN

HERPEN, SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). Além disso, tem sido demonstrada uma marcada resistência à insulina e intolerância à glicose em ratos alimentados com dietas ricas em gordura saturada (REAVEN et al., 1979). Na verdade, vários estudos têm mostrado que a ingestão de misturas de ácidos graxos de cadeia longa, que variam no grau de saturação, provenientes do óleo de dendê, banha, azeite ou óleo de milho, reduzem a sensibilidade à insulina e levam a um aumento no acúmulo de gordura (BUETTNER et al., 2006).

1.4.2.2 Dietas ricas em sacarose

Obesidade, resistência à insulina e DM2 podem ser facilmente obtidos por meio de uma maior oferta de carboidratos (HALLFRISCH, COHEN, REISER, 1981). Em animais de laboratório, dietas ricas em carboidratos (por exemplo, sacarose ou frutose) induzem hiperinsulinemia, dislipidemia, adiposidade visceral, resistência à insulina e DM2 (LIU, MANSON, 2001; D`ALESSANDRO et al., 2000).

A indução da obesidade em roedores é obtida oferecendo bebidas adoçadas com sacarose, maltose, frutose, etc (BARR et al., 2000). Porém, em estudo realizado em camundongos, a frutose parece ser menos eficaz do que a sacarose em promover obesidade (GLENDINNING et al., 2010).

Aumento na ingestão calórica e ganho de peso podem ocorrer em animais suplementados com uma solução de carboidrato, além da ração padrão para roedores (KANAREK, ORTHEN-GAMBILL, 1982). Ratos que consomem solução de sacarose, por exemplo, possuem ingestão calórica superior aos animais que não recebem sacarose, favorecendo o acúmulo de gordura e o aumento do peso corporal (KANAREK, ORTHEN-GAMBILL, 1982). Portanto, é bem estabelecido que ratos e camundongos tornam-se obesos quando têm livre acesso às soluções ricas em carboidratos (KANAREK, ORTHEN-

GAMBILL, 1982; CAO et al., 2007), sendo a sacarose o mais empregado (HAFIDIA et al., 2001; LAUGERO et al., 2002; EBAID et al., 2006; CHENA et al., 2010).

Em resumo, estes estudos são consistentes com a noção de que um maior acesso à sacarose pode contribuir para a obesidade através de um aumento da ingestão calórica (BRAY, NIELSEN, POPKIN, 2004).

Desta forma, o consumo de uma dieta rica em sacarose pode revelar-se um atraente modelo para estudar o papel da dieta na resistência à insulina. O modelo pode fornecer informações fundamentais para a compreensão da fisiopatologia de doenças humanas, tais como DM2, dislipidemias e uma série de patologias que fazem parte da síndrome metabólica (LOMBARDO et al., 1996).

1.5 INFLIXIMABE

Há evidências de que o tecido adiposo pode ser uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, das quais, destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (HOTAMISLIGIL, SHARGILL, SPIEGELMAN, 1993). O TNF- α é uma citocina que desempenha importante papel nas respostas inflamatórias e também está envolvida na regulação do metabolismo do tecido adiposo (KOWALSKA, 2007).

A introdução de medicamentos dirigidos contra o TNF- α tem representado importante avanço no arsenal terapêutico do tratamento de doenças inflamatórias (ALLEZ et al., 2010). Neste contexto, o infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico, formado por 75 % de proteína humana e 25 % de proteína de camundongo, tem sido empregado com o objetivo de reduzir a atividade inflamatória na artrite reumatóide, doença de Crohn, artrite psoriática, psoríase, doença de Crohn fistulizante e colite ou retocolite ulcerativa (MOYA, 2005; TRACEY et al., 2008).

O infliximabe, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1999, neutraliza a ação do TNF- α ao se ligar com alta afinidade às suas formas solúveis e transmembranais e inibir ou impedir a ligação do TNF- α aos seus receptores (MAZZA, ROSSI, WEINBERG, 2010).

O infliximabe tem mostrado melhora na sensibilidade à insulina (HOTAMISLIGIL, SHARGILL, SPIEGELMAN, 1993; OGUZ, OGUZ, UZUNLULU, 2007; TAKANO et al., 2010; URSINI, NATY, GREMBIALE, 2010). De acordo com estes resultados, Yazdani-Biuki e colaboradores (2006) relataram o caso de um paciente diabético tipo 2 tratado com infliximabe que apresentou hipoglicemias. Estes achados apóiam a utilização de anticorpos anti TNF- α para reduzir a resistência à insulina (GOTTLIEB et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Dietas ricas em sacarose ou gorduras têm sido utilizadas em modelos animais para induzir diabetes e obesidade que possivelmente estão associadas à hiperprodução hepática de glicose (GROSS et al., 2004; TSUNODA et al., 1998). No entanto, o efeito de uma dieta rica em gordura ou carboidrato na produção hepática de glicose é pouco conhecido.

Além disso, deve-se considerar que na prática clínica há somente um medicamento antidiabético com papel bem estabelecido na redução da HHG, ou seja, a metformina. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas drogas para reduzir a HHG que por sua vez, depende da implantação de modelos experimentais apropriados.

Devido ao fato de que o infliximabe, um antagonista do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), além de seu estabelecido papel no tratamento de doenças inflamatórias (MAZZA, ROSSI, WEINBERG, 2010), melhora o controle glicêmico (ARAÚJO et al., 2007), decidimos investigar também a possibilidade deste agente impedir a hiperprodução hepática de glicose induzida por dietas ricas em gordura saturada ou sacarose.

3. OBJETIVO

Com base na necessidade de novos modelos experimentais de hiperprodução hepática de glicose induzidos por dietas e o possível impedimento através da administração de infliximabe, nos propusemos a implantar dois modelos, ou seja, camundongos alimentados com dieta rica em sacarose ou camundongos alimentados com dieta hiperlipídica rica em gordura saturada. Além disso, com base numa provável ação do infliximabe sobre o controle glicêmico, também nos propusemos a investigar seus efeitos nos modelos testados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FÁRMACOS E REAGENTES

Os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company, ICN Biomedicals e outras companhias comprometidas com a disponibilização de produtos da mais alta pureza. O anticorpo monoclonal anti TNF- α Infliximabe (Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda.) foi doado pelo Dr. Marco Rocha Loures.

4.2 ANIMAIS

Camundongos Swiss, machos, com idade inicial de 6 semanas (30-35 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, foram utilizados. Os animais foram transferidos para o biotério experimental do Laboratório de Investigação em Diabetes e Obesidade do Departamento de Farmacologia e Terapêutica. Neste biotério, os animais continuaram recebendo água e ração balanceada (Nuvilab CR-1[®], Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR), *ad libitum* durante uma semana, para adaptação e, em seguida, receberam dieta padrão (C) ou dieta enriquecida com sacarose (DES) ou dieta hiperlipídica (HL). Durante todo o período de internamento no biotério experimental os animais permaneceram em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12h/12h.

A manutenção dos animais e os experimentos foram realizados em conformidade com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá (Parecer 129/2009).

4.3 DIETA HIPERLIPÍDICA E TRATAMENTO COM INFLIXIMABE

Camundongos Swiss foram alimentados com uma dieta HL, rica em gordura saturada (grupo HL), ou com ração padrão para roedores Nuvilab® (grupo Controle) durante duas semanas. Todos os animais tiveram livre acesso à água.

A dieta HL consistiu na adição de 10 g de banha (Sadia®, Toledo, PR) a cada 12 g de ração padrão Nuvilab® triturada em pó, preparada diariamente. A proporção 1g/1,2 g de banha/ração teve como base o fato de ser esta a proporção em que se obteve uma mistura mais consistente (SANTOS, 2008).

Os camundongos alimentados com a dieta HL foram divididos em dois subgrupos: dieta HL + Salina, via intraperitoneal (i.p), duas vezes ao dia (100 µL) e dieta HL + Infiximabe via i.p, duas vezes ao dia, na dose de 10 µg (dissolvido em 100 µL de salina), tendo como base a dose (0,34 mg/kg) empregada por ARAÚJO et al. (2007).

O tratamento com infliximabe foi restrito aos animais tratados com dieta HL pelo fato de apenas este grupo apresentar aumento da produção hepática de glicose.

Precedendo a realização dos experimentos de perfusão de fígado *in situ*, os animais foram submetidos a um jejum noturno de 15 hs. Para isto o alimento foi retirado às 17:30 hs (início do jejum) e no dia seguinte às 08:30 hs os experimentos eram iniciados.

4.4 DIETA RICA EM SACAROSE

O grupo Controle recebeu ração balanceada (Nuvilab®) e água *ad libitum* enquanto o grupo tratado com DES também recebeu ração balanceada (Nuvilab®) e água *ad libitum*

enriquecida com sacarose (Alto Alegre®, Colorado, PR) 30% (p/v), que foi preparada diariamente.

O tratamento com DES foi realizado durante 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas, sendo o consumo de água e ração avaliados diariamente e o peso corporal semanalmente.

Precedendo a realização dos experimentos, os animais foram submetidos a um jejum noturno de 15 hs. Para isto o alimento foi retirado no dia anterior ao experimento às 17:30 hs (início do jejum). Além disso, neste mesmo horário, a solução de sacarose (30%) foi substituída por água. No dia seguinte, às 08:30 hs, realizou-se a coleta de sangue e a perfusão de fígado *in situ* descritos a seguir.

4.5 EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DE FÍGADO *IN SITU*

O sistema de perfusão do fígado *in situ* é constituído de um oxigenador de membrana, cilindro de alumínio, bomba de circulação externa de água aquecida e capta-bolhas (Figura 1).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados mangueiras de silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 milímetros e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro é termostaticada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de mistura carbogênica nas proporções de 95/5% de O₂ e CO₂, respectivamente. O sistema contém ainda um dispositivo que impede a entrada de ar no fígado denominado capta-bolhas.

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) contendo: NaCl, 116 mM; NaHCO₃, 25 mM; KCl, 5,9 mM; NaSO₄, 1,2 mM; MgCl₂. 6 H₂O,

1,18 mM; NaH_2PO_4 , 1,24 mM e CaCl_2 , 2,5 mM. O substrato neoglicogênico L-alanina foi dissolvido no KH e infundido na concentração de 5 mM.

O líquido de perfusão, ou seja, o KH, foi impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local se processam as trocas gasosas. O O_2 e o CO_2 contidos na atmosfera carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), por troca passiva, passam para o KH que circula no interior dos tubos de borracha de silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversal) favorecem as trocas. Desse modo, o KH é saturado com O_2 enquanto o CO_2 diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. Assim, o KH que chega à cânula inserida na veia porta, está oxigenado, aquecido a 37°C e com um pH de 7,4.

Em uma primeira etapa, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (120 mg/Kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior (porção infra-hepática), logo acima da veia renal direita e ao redor da veia porta. Após a coleta da amostra de sangue realizada na porção infra-hepática da veia cava inferior, suficiente para avaliar a glicemia, a veia porta foi canulada (Figura 2) sob baixo fluxo e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. Imediatamente após a canulação, realizou-se uma pequena secção na veia cava inferior, porção infra-hepática, para que ocorresse completo dessangramento do fígado. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que foi bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo da pressão, que poderia causar inchaço do órgão.

Em seguida, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada para a coleta do líquido efluente (perfusado). O tórax foi aberto, e a veia cava (porção supra-hepática), acima do diafragma, foi ocluída por ligadura para desviar o líquido para a veia cava (porção infra-hepática) (Figura 2). Finalmente, o fluxo foi ajustado para valores que permitissem a

oxigenação adequada (cerca de $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos (cerca de $0,15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de fígado) e visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão, garantindo a oxigenação hepática.

Após 30 min iniciais de perfusão com KH, para adaptação do fígado às novas condições, amostras do perfusado foram coletadas a cada 5 min para a determinação de parâmetros bioquímicos, sendo realizada do seguinte modo: a) 10 min com KH; b) 60 min com KH + substrato neoglicogênico; c) 10 min com tampão KH.

Pré-infusão KH	Período de infusão do substrato KH + Substrato	Pós-infusão KH
0 min.	10 min.	70 min. 80 min.

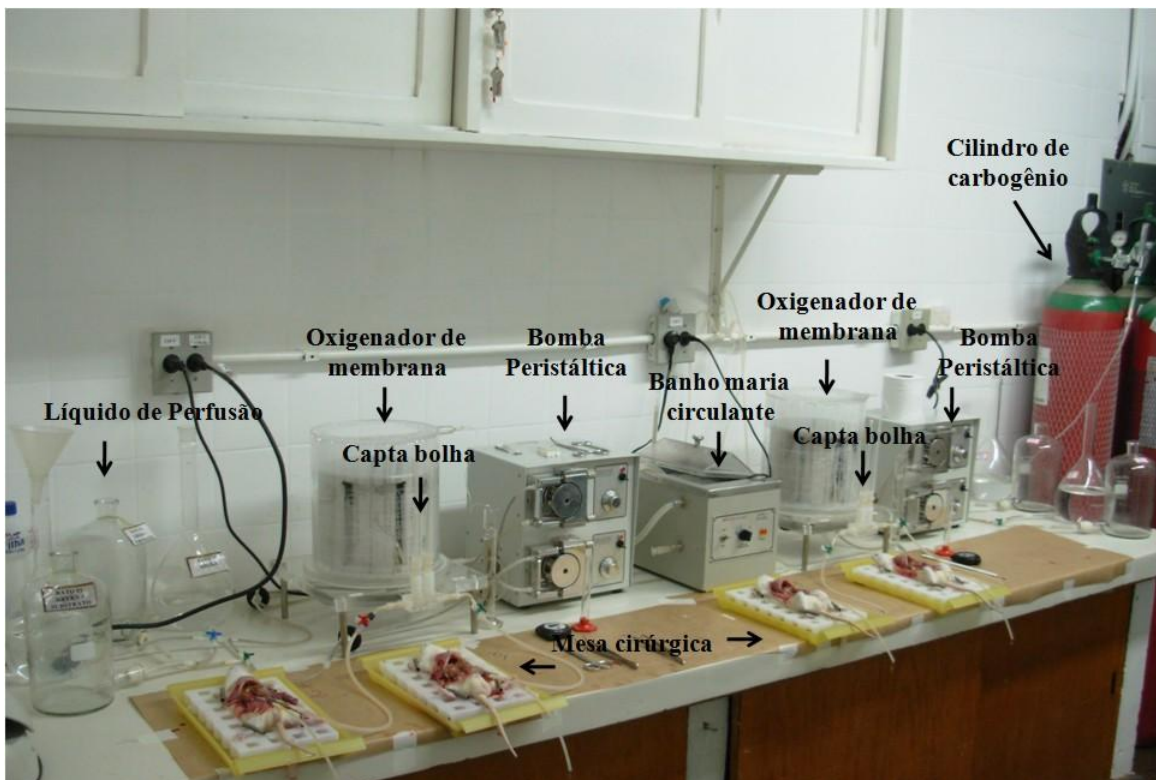


Figura 1. Vista parcial do sistema de perfusão do fígado.

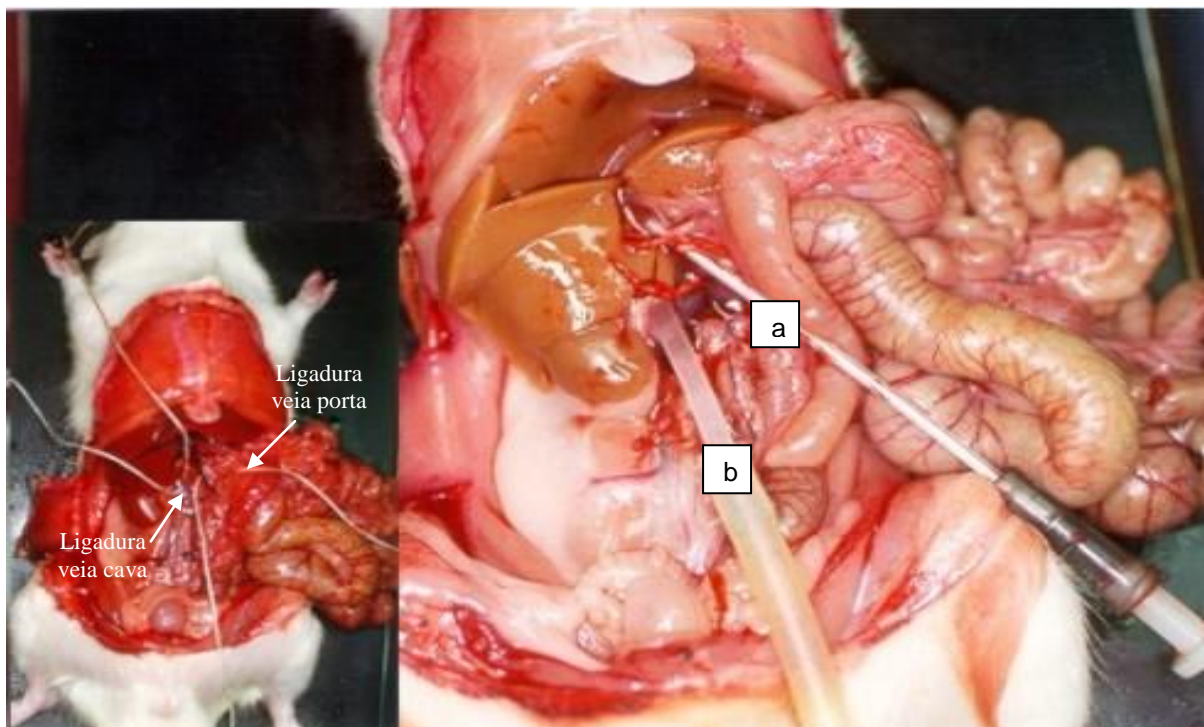


Figura 2. Posições das ligaduras utilizadas para fixação das cânulas e posicionamento destas no fígado no momento do início dos experimentos de perfusão (lado esquerdo). As cânulas (lado direito) foram inseridas na veia porta (a) e na veia cava (porção infra-hepática) (b).

A Figura 3 representa os resultados de um experimento demonstrativo de produção hepática de glicose a partir de L-alanina 5 mM. Esta concentração foi empregada com base em estudos anteriores (GAZOLA et al. 2002).

Deve-se destacar que em parte dos experimentos, além da glicose, a área sob a curva (AUC) para a produção de piruvato, L-lactato e uréia foi calculada.

Ao final de cada experimento, o fígado foi retirado e pesado para que as produções de glicose, uréia, L-lactato ou piruvato, por grama de fígado ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$), fossem quantificadas. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparações de fígados com diferentes pesos.

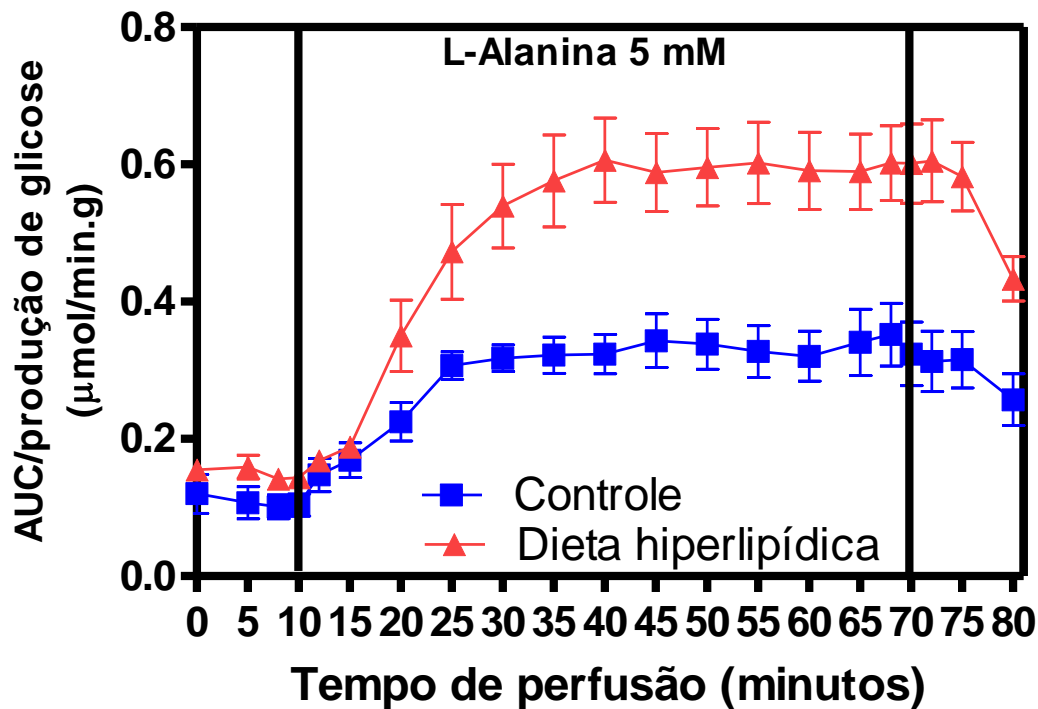


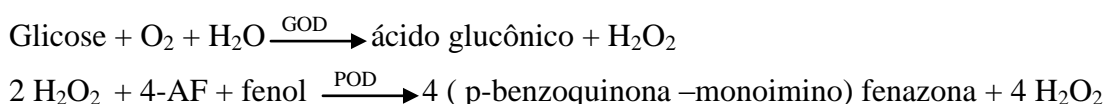
Figura 3. Produção de glicose ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$) a partir de L-alanina em fígados provenientes de animais alimentados com dieta hiperlipídica (HL) ou ração balanceada (Controle) durante duas semanas. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a produção de glicose durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão de L-alanina. Cada ponto representa a média (M) \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

Após a perfusão de fígado, os camundongos suplementados com sacarose e respectivos controles, tiveram os depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal e inguinal, cuidadosamente retirados e pesados. Estes depósitos de gordura foram escolhidos porque representam uma grande proporção de gordura corporal total e podem ser facilmente removidos. O depósito retroperitoneal é representado pela gordura associada com a cápsula perirenal e com a parede dorsal perto dos rins. A gordura epididimal está associada ao epidídimo e às glândulas vesiculares nos machos. A gordura inguinal penetra no triângulo femoral e vai afilando-se em direção ao quadrante inferior do abdômen. A remoção destes depósitos de gorduras foi padronizada sendo retirados sempre pela mesma pessoa.

4.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

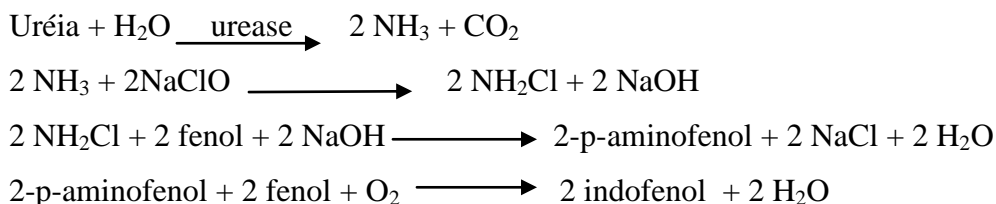
4.6.1 Dosagem de glicose no perfusado e no soro (BERGMEYER, BERNT, 1974)

A concentração de glicose no soro (mg/dL) ou no perfusado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado) foi avaliada pelo método da glicose-oxidase (GOD) onde a glicose é oxidada pela GOD a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 em presença de peroxidase (POD) produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) originando um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de acordo com as seguintes reações:



4.6.2 Dosagem de uréia no perfusado (GUTMANN, BERGMEYER, 1974)

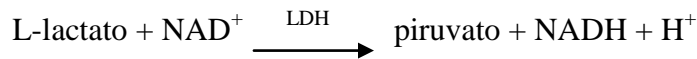
A uréia é hidrolisada pela urease a NH_3 e CO_2 . Os íons amônia reagem em pH alcalino com hipoclorito de sódio e fenol, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol, como segue:



A concentração de azul de indofenol, proporcional à concentração de uréia, foi medida espectrofotometricamente a 600 nm e os valores obtidos expressos em $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ de fígado.

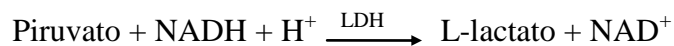
4.6.3 Dosagem de L-lactato no perfusado (GUTMANN, WAHLEFELD, 1974)

O L-lactato é oxidado a piruvato pelo NAD^+ em reação catalisada pela L-lactato-desidrogenase (LDH). A formação de NADH é proporcional à concentração de L-lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm. Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ de fígado.



4.6.4 Dosagem de piruvato no perfusado (CZOK, LAMPRECHT, 1974)

O piruvato é convertido em L-lactato pela LDH com oxidação de NADH. A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato convertido em L-Lactato e é medida espectrofotometricamente a 340 nm. Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ de fígado.



4.7 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O teste “t” de Student foi empregado utilizando-se o programa Prisma versão 5.0 adotando-se o nível de significância em $P < 0,05$. Os valores foram representados como média (M.) \pm desvio padrão da média (D.P.M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) (Tabelas) ou média (M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) (Figuras).

5 RESULTADOS

Tabela 1. Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μ L, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μ L, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas. * $P < 0,05$ vs. Controle. Os valores foram representados como média (M.) \pm desvio padrão da média (D.P.M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.). N = número de animais.

Controle	Dieta HL	Dieta HL + Infliximabe
66,08 \pm 15,5 \pm 6,9 (N = 5)	93,4 \pm 25,9 \pm 11,2* (N = 5)	66,5 \pm 8,55 \pm 3,5 (N = 6)

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a substituição da dieta padrão por dieta HL durante duas semanas promoveu elevação ($P < 0,05$) da glicemia de jejum. Porém, esta elevação não foi observada no grupo tratado com infliximabe que apresentou valores de glicemia de jejum semelhantes ao grupo Controle.

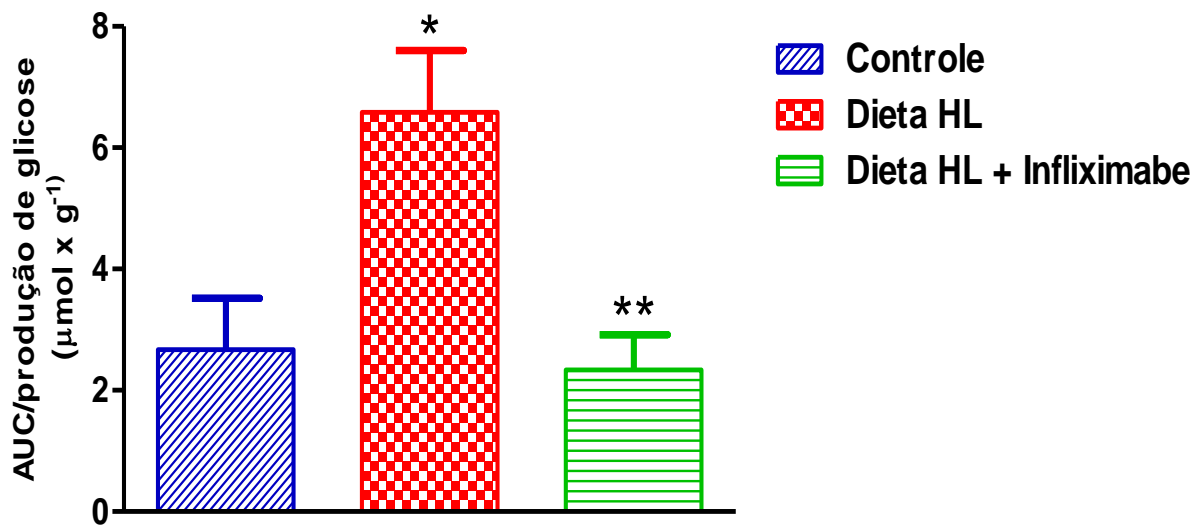


Figura 4. Produção hepática de glicose a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μ L, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μ L, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de glicose, como descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de glicose durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. * $P < 0,05$ vs. controle. ** $P < 0,05$ vs. dieta HL. Cada coluna representa a média (M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

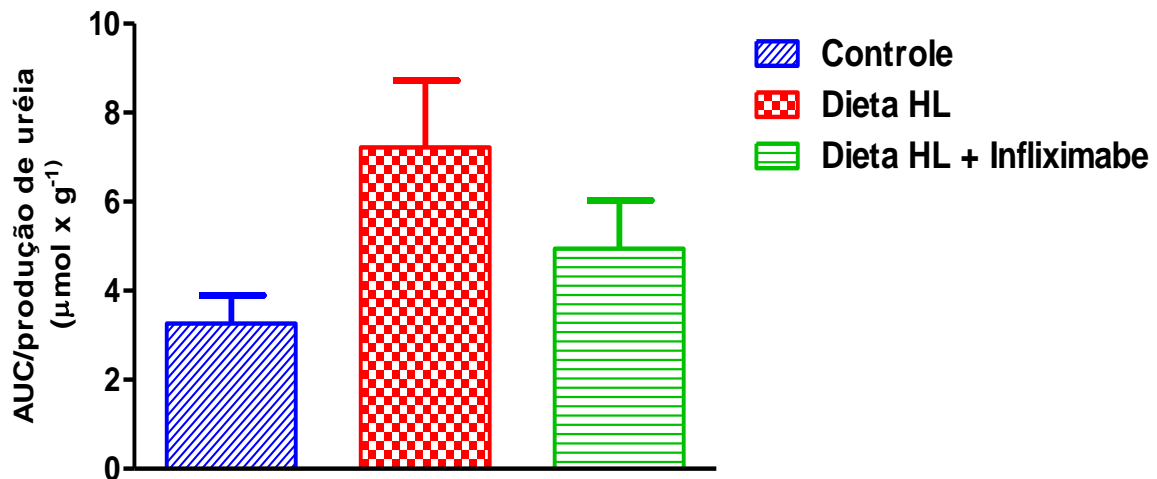


Figura 5. Produção hepática de uréia a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de uréia, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de uréia durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. Cada coluna representa a média (M.) ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

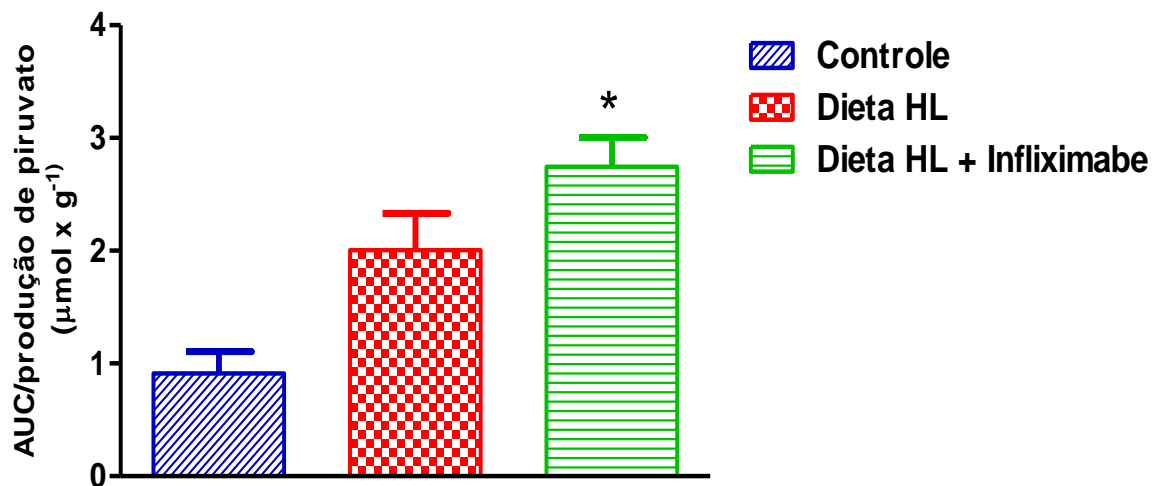


Figura 6. Produção hepática de piruvato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de piruvato, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de piruvato durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. * P < 0,05 vs. controle. Cada coluna representa a média (M.) ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

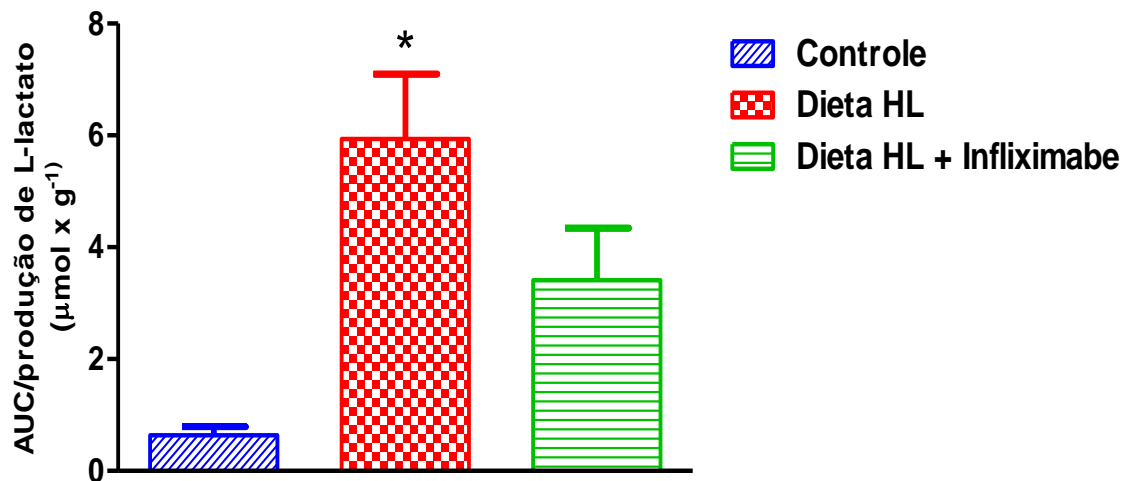


Figura 7. Produção hepática de L-lactato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos tratados com ração padrão (Controle) ou mantidos com dieta hiperlipídica (HL) + salina (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) ou mantidos com dieta HL + infliximabe (100 μL, via i.p, duas vezes ao dia) durante duas semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de L-lactato, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de L-lactato durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. * $P < 0,05$ vs. controle. Cada coluna representa a média (M.) ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que a substituição da dieta padrão por dieta HL durante duas semanas promoveu elevação ($P < 0,05$) da produção hepática de glicose em fígados provenientes de camundongos em jejum noturno de 15 hs. Porém, esta elevação não foi observada no grupo tratado com infliximabe que apresentou valores de produção hepática de glicose semelhante aos do grupo Controle.

A elevação da produção hepática de uréia (Figura 5) mostrou tendência a ser mais intensa ($P > 0,05$) no grupo HL porém, menos acentuada no grupo HL tratado com infliximabe. A produção hepática de piruvato a partir de L-Alanina (Figura 6) foi mais intensa ($P < 0,05$) no grupo HL tratado com infliximabe em relação aos demais grupos. Por outro lado, a produção de L-lactato a partir da L-alanina (Figura 7) foi maior ($P < 0,05$) no grupo HL em relação aos demais grupos.

Tabela 2. Consumo diário de ração (g) e líquido (mL) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os resultados relativos ao consumo diário de ração e líquido não estão apresentados como média (M.) \pm desvio padrão da média (D.P.M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) porque as medidas foram realizadas em camundongos mantidos em gaiolas coletivas. N = número de animais. * P < 0,05 vs. Controle.

Dias	Consumo de ração (g)		Consumo líquido (mL)	
	Controle	DES	Controle	DES
1	9,65 (n=4)	5,40 (n=3)	8,94 (n=3)	9,46 (n=4)
2	8,39 (n=5)	4,54 (n=3)	11,77 (n=3)	12,75 (n=4)
3	8,55 (n=5)	5,01 (n=4)	11,18 (n=3)	11,25 (n=4)
4	8,01 (n=5)	5,21 (n=4)	10,96 (n=4)	13,11 (n=4)
5	9,62 (n=4)	5,18 (n=3)	10,50 (n=4)	10,17 (n=3)
6	9,52 (n=5)	4,70 (n=3)	11,53 (n=3)	11,93 (n=4)
7	9,36 (n=4)	5,15 (n=3)	13,00 (n=3)	13,68 (n=4)
8	9,39 (n=4)	5,43 (n=3)	12,44 (n=3)	12,50 (n=4)
9	8,86 (n=3)	5,55 (n=4)	12,33 (n=3)	15,44 (n=4)
10	9,55 (n=4)	5,56 (n=4)	11,19 (n=4)	15,19 (n=4)
11	8,43 (n=3)	4,53 (n=3)	11,97 (n=3)	12,25 (n=4)
12	11,08 (n=4)	5,38 (n=3)	13,85 (n=4)	13,75 (n=4)
13	10,10 (n=5)	5,18 (n=4)	12,36 (n=3)	14,83 (n=3)
14	9,38 (n=4)	5,18 (n=4)	13,89 (n=3)	15,08 (n=3)
15	9,57 (n=5)	5,56 (n=4)	13,50 (n=3)	14,08 (n=3)
16	9,60 (n=2)	4,63 (n=4)	11,92 (n=4)	16,88 (n=4)
17	10,30 (n=4)	4,92 (n=4)	11,33 (n=3)	14,00 (n=4)
18	9,76 (n=4)	4,81 (n=3)	11,0 (n=3)	16,94 (n=4)
19	10,35 (n=5)	5,55 (n=3)	12,41 (n=3)	16,06 (n=4)
20	8,92 (n=5)	4,79 (n=4)	12,83 (n=3)	15,94 (n=4)
21	9,21 (n=4)	4,86 (n=4)	11,83 (n=3)	16,17 (n=3)
22	9,96 (n=4)	4,88 (n=4)	13,22 (n=3)	15,69 (n=4)
23	9,51 (n=5)	4,41 (n=4)	11,73 (n=3)	15,00 (n=3)
24	9,54 (n=5)	4,83 (n=4)	11,50 (n=3)	17,00 (n=4)
25	10,30 (n=5)	5,13 (n=4)	12,67 (n=4)	17,25 (n=4)
26	10,57 (n=5)	5,18 (n=4)	12,55 (n=4)	17,50 (n=3)
27	9,14 (n=5)	4,48 (n=4)	11,17 (n=3)	17,19 (n=4)
28	9,29 (n=4)	4,56 (n=4)	11,77 (n=4)	18,44 (n=4)
M.	9,49	5,02*	11,98	14,63*
D.P.M.	0,69	0,36	1,06	2,31
E.P.M.	0,13	0,06	0,20	0,43

Os resultados contidos na Tabela 2 mostram que o grupo DES ingeriu menos ração (P < 0,05). Porém apresentou progressiva elevação da ingestão de água enriquecida com sacarose 30% p/v ao longo de 28 dias. Desta maneira, levando-se em conta a quantidade de

calorias presentes na água enriquecida com sacarose, a quantidade total de calorias ingerida pelo grupo DES foi superior ($P < 0,05$) à ingerida pelo grupo cuja fonte calórica se restringe à ração padrão (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo diário de calorias (kcal) presentes na ração e líquidos de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os resultados relativos ao consumo diário de ração e líquido não foram apresentados como média (M.) \pm desvio padrão da média (D.P.M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) porque as medidas foram realizadas em camundongos mantidos em gaiolas coletivas. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Dias	Consumo de ração		Consumo de líquidos		Calorias totais	
	Controle (kcal)	DES (kcal)	Controle (kcal)	DES (kcal)	Controle (kcal)	DES (kcal)
1	32,11	17,97	-	11,36	32,11	29,33
2	27,92	15,10	-	15,32	27,92	30,42
3	28,45	16,67	-	13,52	28,45	30,19
4	26,65	17,33	-	15,72	26,65	33,05
5	32,01	17,23	-	12,20	32,01	29,43
6	31,67	15,64	-	14,32	31,67	29,96
7	31,14	17,13	-	16,40	31,14	33,53
8	31,24	18,06	-	15,00	31,24	33,06
9	29,48	18,46	-	18,52	29,48	36,98
10	31,77	18,50	-	18,24	31,77	36,74
11	28,05	15,07	-	14,68	28,05	29,75
12	36,87	17,90	-	16,48	36,87	34,38
13	33,60	17,23	-	17,80	33,60	35,03
14	31,21	17,23	-	18,08	31,21	35,31
15	31,84	18,50	-	16,88	31,84	35,38
16	31,94	15,40	-	20,25	31,94	35,65
17	34,27	16,37	-	16,80	34,27	33,17
18	32,47	16,00	-	20,32	32,47	36,32
19	34,44	18,46	-	19,28	34,44	37,74
20	29,68	15,93	-	19,12	29,68	35,05
21	30,64	16,17	-	19,40	30,64	35,57
22	33,14	16,23	-	18,84	33,14	35,07
23	31,64	14,67	-	18,00	31,64	32,67
24	31,74	16,07	-	20,40	31,74	36,47
25	34,27	17,07	-	20,68	34,27	37,75
26	34,17	17,23	-	21,00	34,17	38,23
27	30,41	14,90	-	20,64	30,41	35,54
28	30,91	15,17	-	22,12	30,91	37,29
M.	31,56	16,70*	-	17,55	31,56	34,25*
D.P.M.	2,25	1,21	-	2,77	2,25	2,76
E.P.M.	0,42	0,23	-	0,52	0,42	0,52

Tabela 4. Evolução do peso corpóreo (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M.= média, D.P.M.= desvio padrão, E.P.M. = erro padrão da média, N = número de animais. * $P < 0,05$ vs. Controle.

Grupos	Peso inicial	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	
Controle	M.	31,13	M. 32,45	M. 35,03	M. 38,73	M. 38,03
	D.P.M.	1,76	D.P.M. 1,63	D.P.M. 1,72	D.P.M. 3,99	D.P.M. 2,11
	E.P.M.	0,72	E.P.M. 0,66	E.P.M. 0,70	E.P.M. 1,63	E.P.M. 0,86
	(N = 6)		(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)
DES	M.	31,33	M. 34,90	M. 35,78	M. 41,78	M. 43,25*
	D.P.M.	2,07	D.P.M. 0,78	D.P.M. 2,55	D.P.M. 1,93	D.P.M. 2,19
	E.P.M.	0,84	E.P.M. 0,32	E.P.M. 1,04	E.P.M. 0,78	E.P.M. 0,89
	(N=6)		(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)

Tabela 5. Evolução da glicemia (mg/dL) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M.= média, D.P.M.= desvio padrão, E.P.M. = erro padrão da média, N = número de animais.

Grupos	2 semanas	3 semanas	4 semanas	
Controle	M.	186,2	M. 121,9	M. 114,6
	D.P.M.	96,41	D.P.M. 49,72	D.P.M. 25,53
	E.P.M.	48,20	E.P.M. 20,30	E.P.M. 10,42
	(N=4)		(N=6)	(N=6)
DES	M.	113,8	M. 134,7	M. 118,3
	D.P.M.	42,93	D.P.M. 43,64	D.P.M. 18,09
	E.P.M.	21,41	E.P.M. 21,82	E.P.M. 7,38
	(N=4)		(N=4)	(N=6)

De acordo com a maior ingestão calórica apresentada pelo grupo DES, houve um incremento no peso corpóreo ($P < 0,05$) deste grupo, de maneira que na quarta semana de acompanhamento o peso corporal final dos camundongos que receberam dieta enriquecida com sacarose foi superior ($P < 0,05$) ao apresentado pelo grupo Controle (Tabela 4).

Por outro lado, a glicemia dos grupos Controle e DES não apresentaram diferenças ao longo das quatro semanas de acompanhamento (Tabela 5).

Tabela 6. Evolução do peso da gordura retroperitoneal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M. = média, D.P.M. = desvio padrão, E.P.M.= erro padrão da média, N = número de animais. * P < 0,05 vs. Controle.

Grupos	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Controle	M. 0,18	M. 0,15	M. 0,17
	D.P.M. 0,11	D.P.M. 0,04	D.P.M.0,06
	E.P.M 0,04	E.P.M. 0,01	E.P.M 0,02
	(N=6)	(N=6)	(N=6)
DES	M. 0,25	M. 0,40*	M. 0,45*
	D.P.M. 0,14	D.P.M. 0,11	D.P.M. 0,15
	E.P.M 0,05	E.P.M. 0,05	E.P.M. 0,06
	(N=6)	(N=5)	(N=6)

Tabela 7. Evolução do peso da gordura epididimal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M. = média, D.P.M. = desvio padrão, E.P.M.= erro padrão da média, N = número de animais. * P < 0,05 vs. Controle.

Grupos	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Controle	M. 0,65	M. 0,72	M. 0,73
	D.P.M. 0,24	D.P.M. 0,22	D.P.M. 0,24
	E.P.M. 0,09	E.P.M. 0,09	E.P.M. 0,09
	(N=6)	(N=6)	(N=6)
DES	M. 0,74	M. 1,11*	M. 1,37*
	D.P.M. 0,37	D.P.M. 0,26	D.P.M. 0,41
	E.P.M 0,15	E.P.M. 0,11	E.P.M. 0,16
	(N=6)	(N=5)	(N=6)

Em relação à gordura retroperitoneal (Tabela 6) e epididimal (Tabela 7), o grupo DES apresentou valores mais elevados (P < 0,05) a partir da terceira semana de oferta de dieta enriquecida com sacarose. Para a gordura subcutânea inguinal (Tabela 8), o grupo DES apresentou valores mais elevados (P < 0,05) somente na quarta semana. Porém o peso do fígado foi semelhante nos dois grupos ao longo das quatro semanas de acompanhamento (Tabela 9).

Tabela 8. Evolução do peso da gordura subcutânea inguinal (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M. = média, D.P.M. = desvio padrão, E.P.M. = erro padrão da média, N = número de animais. * P < 0,05 vs. Controle.

Grupos	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Controle	M. 0,41	M. 0,48	M. 0,45
	D.P.M. 0,24	D.P.M. 0,13	D.P.M. 0,15
	E.P.M. 0,09	E.P.M. 0,05	E.P.M. 0,06
	(N=6)	(N=6)	(N=6)
DES	M. 0,52	M. 0,67	M. 1,07*
	D.P.M. 0,21	D.P.M. 0,15	D.P.M. 0,31
	E.P.M. 0,08	E.P.M. 0,06	E.P.M. 0,12
	(N=6)	(N=5)	(N=6)

Tabela 9. Peso do fígado (g) de camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. M. = média, D.P.M. = desvio padrão, E.P.M.= erro padrão da média, N = número de animais.

Grupos	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Controle	M. 1,87	M. 2,19	M. 1,93
	D.P.M. 0,22	D.P.M. 0,47	D.P.M. 0,21
	E.P.M. 0,09	E.P.M. 0,19	E.P.M. 0,08
	(N=6)	(N=6)	(N=6)
DES	M. 1,84	M. 1,86	M. 2,02
	D.P.M. 0,24	D.P.M. 0,12	D.P.M. 0,08
	E.P.M. 0,09	E.P.M. 0,05	E.P.M. 0,03
	(N=6)	(N=5)	(N=6)

Em linhas gerais, a produção de glicose (Figuras 8), uréia (Figuras 9), piruvato (Figuras 10) e L-lactato (Figuras 11) a partir de L-alanina (5 mM) foram semelhantes nos dois grupos investigados ao longo das quatro semanas de acompanhamento.

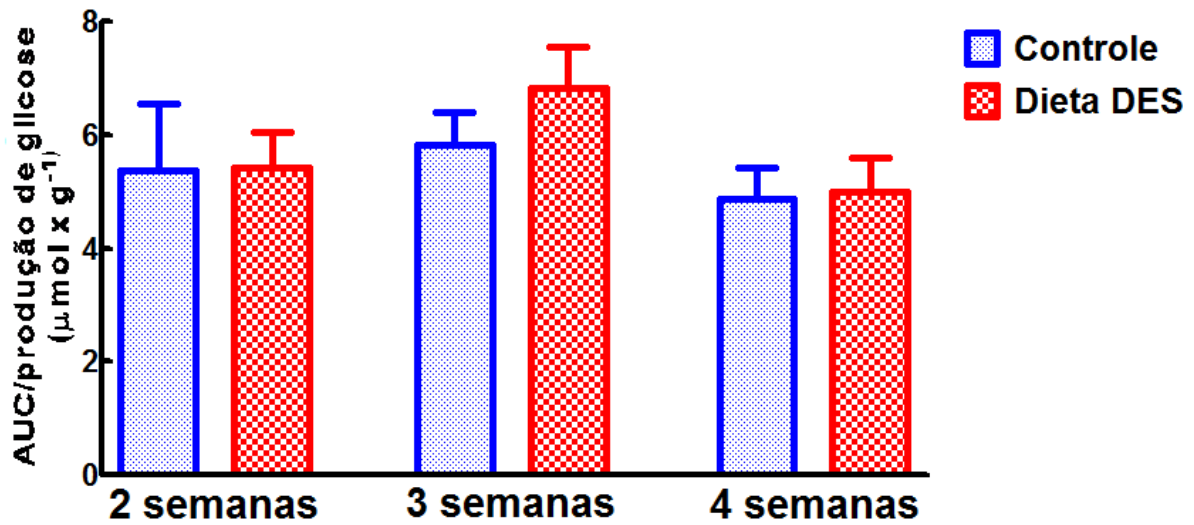


Figura 8. Produção hepática de glicose a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de glicose, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de glicose durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. Cada coluna representa a média (M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

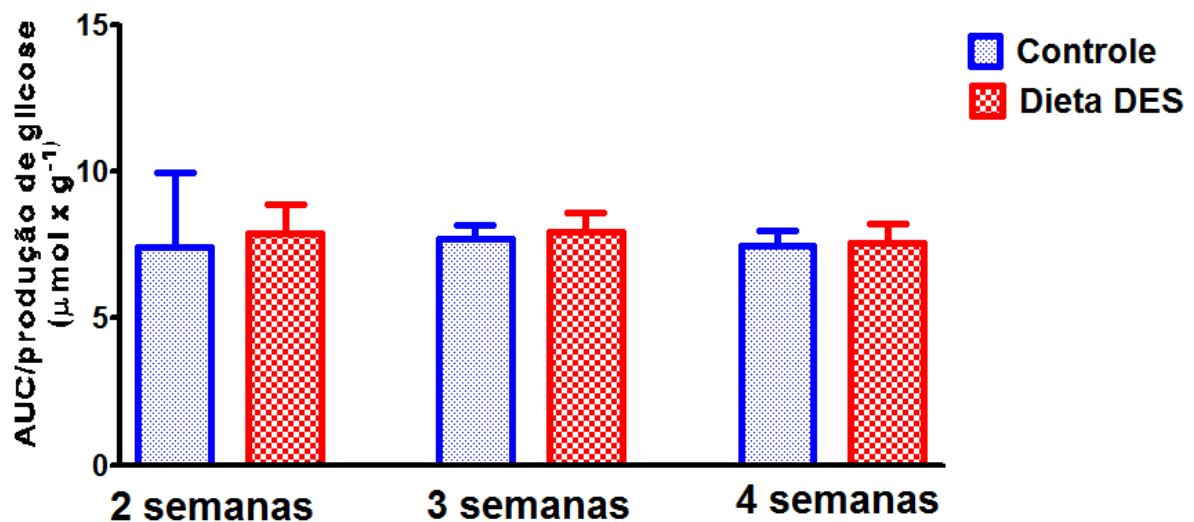


Figura 9. Produção hepática de uréia a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de uréia, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de uréia durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. Cada coluna representa a média (M.) \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

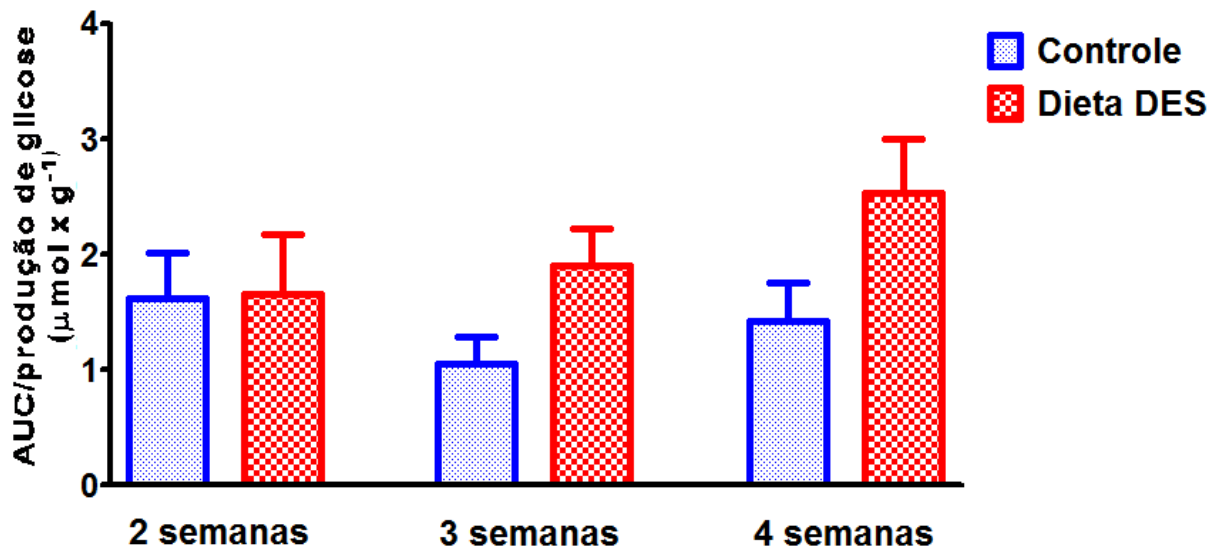


Figura 10. Produção hepática de piruvato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de piruvato, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de piruvato durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. Cada coluna representa a média (M.) ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

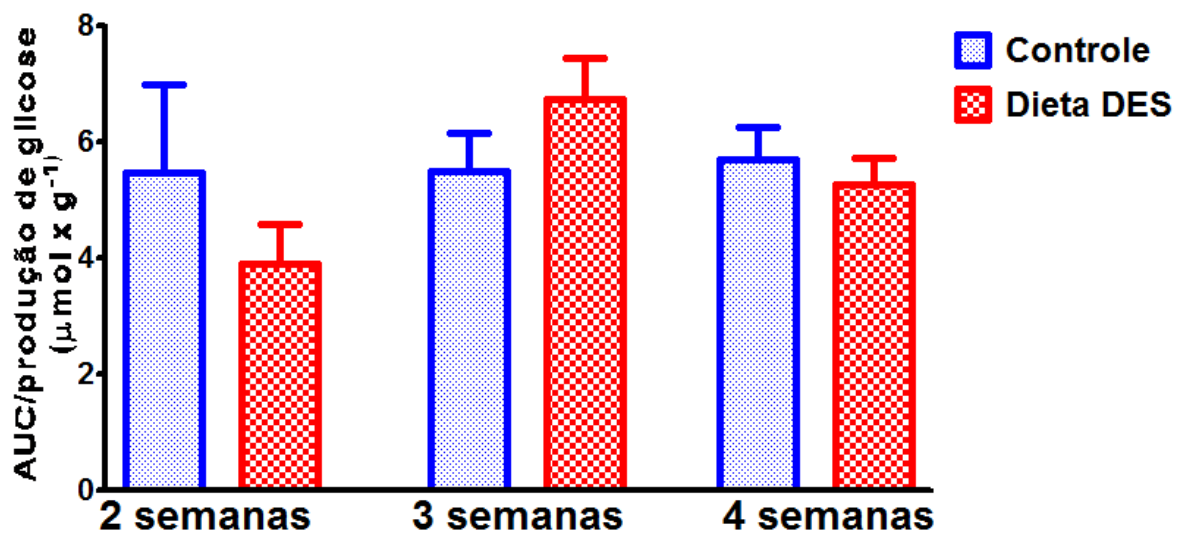


Figura 11. Produção hepática de L-lactato a partir de L-alanina (5 mM) em camundongos mantidos em dieta padrão (grupo Controle) ou dieta padrão + dieta enriquecida com sacarose (grupo DES) acrescentada na água (30% p/v) ao longo de quatro semanas. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* após jejum noturno (15 hs). A produção de L-lactato, como foi descrito no experimento demonstrativo apresentado na Figura 1, foi obtida pela diferença entre a produção de L-lactato durante (10 e 70 min) e antes (0 e 10 min) da infusão hepática de L-alanina. Cada coluna representa a média (M.) ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 experimentos.

6 DISCUSSÃO

Quando não existem modelos experimentais específicos para avaliação de um fenômeno biológico de interesse para a espécie humana, o modelo experimental passa a ser a nossa própria espécie. Um exemplo clássico foram as anomalias fetais decorrentes do uso da talidomida nos anos 60 (SACHDEVA, PATEL, PATEL, 2009).

Investigações utilizando animais, provavelmente tiveram início com Hipócrates há mais de dois mil anos, mas foi Willian Harvey quem publicou, em 1638, o primeiro trabalho científico empregando animais, sob o título “*Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animabulus*”. Neste estudo, o autor apresentou os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação sanguínea em mais de 80 espécies animais. Desde então, inúmeros trabalhos empregando animais para estudos objetivando compreender processos fisiológicos e fisiopatológicos humanos foram registrados. Assim, em meados do século XIX, Claude Bernard obteve hiperglicemia aguda em cães após a punção do quarto ventrículo, demonstrando uma participação do sistema nervoso central na regulação da glicemia. Outro interessante exemplo vem dos estudos de Pavlov em cães, cujo conjunto de experimentos iniciados no final do século XIX resultaram no que hoje conhecemos por condicionamento Pavloviano (SIQUEIRA, BAZOTTE, 2004).

Porém, é pouco provável encontrar na história da ciência exemplo mais dramático da aplicabilidade imediata de estudos empregando animais de laboratório do que a introdução da insulina no tratamento do diabetes mellitus no início do século XX, baseado em estudos com cães pancreatectomizados (BAZOTTE, 2010).

No século XX, estudos utilizando animais de laboratório tornaram-se cada vez mais comuns. Por exemplo, em 1999 o mercado internacional de camundongos movimentou US\$ 200 milhões com produção anual de 25 milhões de animais (ESCOBAR, 2002).

Nosso laboratório, desde o início de suas atividades em 1992, vem empregando modelos experimentais para o estudo de alterações metabólicas com destaque para a hipoglicemia induzida por insulina (GARCIA et al., 2007), diabetes mellitus induzido por aloxana (GALLETTO et al., 2004), diabetes mellitus induzido por estreptozotocina (FERRAZ et al., 1997), suplementação com nutracêuticos (GAZOLA et al., 2002), atividade física (FERREIRA et al., 1998), treinamento alimentar (BATISTA, FERRAZ, BAZOTTE, 1997), etc.

Recentemente, decidimos implantar modelos experimentais de hiperprodução hepática de glicose induzida por dietas e sua possível reversão através da administração de produtos biologicamente ativos com potencial antidiabético.

Atualmente, existem apenas dois fármacos disponíveis para tratar resistência à insulina, ou seja, a metformina e a pioglitazona, sendo que apenas a metformina apresenta relevante efeito na produção hepática de glicose. Portanto, a padronização de modelos experimentais de hiperprodução hepática de glicose constitui uma importante ferramenta para investigar novos produtos biologicamente ativos com potencial para atuar corrigindo esta alteração metabólica.

Para alcançar este objetivo optamos pela implantação de modelos animais que simulam os hábitos alimentares pouco saudáveis comumente vistos em nossa espécie. Para isso, empregamos camundongos da linhagem Swiss alimentados com uma dieta rica em gordura saturada ou sacarose. Além disso, considerando que a utilização de agentes anti TNF- α pode reduzir a resistência à insulina em modelos animais (ARAÚJO et al., 2007) e promover melhora clínica em diabéticos (YAZDANI-BIUKI et al., 2006) criou-se a perspectiva de que estes agentes poderiam inibir a produção hepática de glicose.

O primeiro passo neste sentido foi a implantação de um modelo experimental de dieta rica em gordura saturada com base em estudos desenvolvidos na UNICAMP, no qual

demonstrou-se não apenas a instalação de um quadro semelhante ao DM2 associado à obesidade visceral, mas também sua reversão pelo tratamento com infliximabe (ARAÚJO et al., 2007).

Em nosso trabalho utilizamos a mesma espécie (camundongos), linhagem (Swiss), sexo (machos), idade (seis semanas), período de tratamento (duas semanas), dose de infliximabe (10 µg em 100 µL de salina), via (intraperitoneal) e número de administrações diárias (duas). Porém, enquanto ARAÚJO et al. (2007) utilizaram uma dieta padronizada, optamos pelo emprego de uma dieta mais simples, baseada na mistura de gordura animal com ração para roedores na proporção 1g/1,2 g de banha/ração.

A substituição da dieta padrão por dieta rica em gordura saturada durante duas semanas promoveu elevação ($P < 0,05$) da glicemia de jejum. Porém, esta elevação não foi observada no grupo tratado com infliximabe, que apresentou valores de glicemia de jejum semelhantes aos do grupo controle (Tabela 1). De acordo com estes resultados, a substituição da dieta padrão por dieta rica em gordura saturada, durante duas semanas, promoveu elevação ($P < 0,05$) da produção de glicose a partir da L-alanina em fígados provenientes de camundongos em jejum noturno de 15 hs (Figura 4).

A escolha da L-alanina deve-se ao fato de ser este aminoácido o principal substrato da neoglicogênese hepática (STUMVOLL et al., 2008; LEIJ-HALFWERK et al., 2000) e sua conversão em glicose envolve todas as etapas da via neoglicogênica (CHANGANI et al., 1997; GARBER, KARL, KIPNISS, 1976).

A L-alanina atravessa a membrana do hepatócito sendo convertida em piruvato. A partir do citosol, o piruvato entra na mitocôndria onde é carboxilado e deixa a mitocôndria como malato. No citosol, o malato é transformado em oxalacetato e em seguida, em fosfoenolpiruvato, que depois de várias etapas, é convertido em glicose pela glicose-6-fosfatase microssomal (PILKIS, GRANNER, 1992). Uma vez que este complexo caminho

depende do suprimento de oxigênio e da integridade de vários compartimentos celulares (membrana plasmática, citoplasma, mitocôndrias e fração microssomal), a produção de glicose pode ser usada como um marcador da integridade do hepatócito, já que a ausência de liberação de glicose indica uma baixa viabilidade e/ou comprometida oxigenação dos hepatócitos (BAZOTTE, GAZOLA, BRACHT, 2003).

Ao empregarmos concentração supra fisiológica de L-alanina, observamos uma maior ($P < 0,05$) capacidade de produção de glicose em fígados de camundongos que receberam dieta rica em gordura saturada (Figura 4). Esse resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao maior catabolismo da L-alanina, uma vez que a produção de L-lactato (Figura 7) a partir deste aminoácido também encontrou-se aumentada ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Entretanto, a elevação da produção hepática de glicose a partir de L-alanina induzida por dieta hiperlipídica foi impedida pelo tratamento com infliximabe ($P < 0,05$). Esse resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, à redução do catabolismo da L-alanina, uma vez que a produção de uréia (Figura 5) e L-lactato (Figura 7) também foi reduzida em relação ao grupo não tratado. Por outro lado, o incremento da produção do piruvato no grupo tratado com infliximabe em relação ao não tratado (Figura 6) poderia refletir uma menor entrada do piruvato na neoglicogênese.

Considerando que a produção hepática de glicose contribui para a elevação da glicemia (RIBEIRO et al., 2005), nossos resultados sugerem que as propriedades indutoras de diabetes, observadas com o emprego da dieta rica em gordura saturada, (ARAÚJO et al., 2007) envolvem uma elevação da produção hepática de glicose e que estas alterações metabólicas podem ser prevenidas pela administração de infliximabe.

Para entendermos o modo de ação do infliximabe, impedindo o desencadeamento de hiperglicemia de jejum e hiperprodução hepática de glicose, devemos considerar que os

adipócitos secretam adipocitocinas (leptina, adiponectina, resistina, visfatina, interleucina-6, etc) destacando-se o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

Concentrações séricas elevadas de TNF- α tem sido associadas a resistência à insulina, sugerindo que o TNF- α promove resistência à insulina ao interferir na transdução do sinal gerado pela ligação da insulina ao seu receptor. Além disso, em modelos animais, elevada expressão de TNF- α resulta em artrite, doença desmielinizante, doença inflamatória intestinal e diabetes (ARAÚJO et al., 2007).

Por outro lado, anticorpos monoclonais são proteínas que reconhecem e se ligam a proteínas específicas. O infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico homem-murino (parte semelhante à estrutura do anticorpo humano e parte semelhante à estrutura do anticorpo do camundongo), vem sendo utilizado mundialmente em milhares de pacientes. Ele se liga com elevada afinidade tanto às formas solúveis como transmembranares do TNF- α . O infliximabe forma rapidamente complexos estáveis de alta afinidade com o TNF- α humano, um processo que evolui paralelamente com a perda de sua bioatividade ao inibir a ligação do TNF- α ao seu receptor e neutralizar sua atividade na cascata inflamatória (RUSSELL et al., 2001). Por esta razão, o infliximabe é um medicamento anti-inflamatório com potencial de reduzir os sinais e sintomas da artrite reumatóide, espondilite anquilosante, artrite psoriática, psoríase, doença de Crohn, colite ou retocolite ulcerativa (MAZZA, ROSSI, WEINBERG, 2010).

Estudos que empregam o infliximabe têm mostrado melhora na sensibilidade à insulina em indivíduos não diabéticos (OGUZ, OGUZ, UZUNLULU, 2007). De acordo com estes resultados, Yazdani-Biuki e colaboradores (2006) relataram o caso de um paciente diabético tipo 2 tratado com infliximabe que apresentou hipoglicemias.

Os efeitos descritos anteriormente não se restringem ao infliximabe pois, durante o tratamento de pacientes diabéticos tipo 2 com o agente anti TNF- α , etanercept, houve redução

das necessidades de insulina e episódios de hipoglicemia (CHEUNG, BRYER-ASH, 2009). Estes achados apóiam a utilização de anticorpos anti TNF- α para reduzir a resistência à insulina (GOTTLIEB et al., 2006).

Como a dieta hiperlipídica empregada neste estudo acarreta uma diluição da dieta padrão na proporção de aproximadamente 1,2:1, e a ingestão alimentar é reduzida em 50% em relação ao grupo controle para compensar a maior oferta de calorias (resultados não apresentados), abre-se a possibilidade da criação de uma condição de deficiência de vitaminas e/ou sais minerais, principalmente quando a opção é fazer estudos por períodos mais prolongados (acima de duas semanas). Nestas condições, não saberíamos se as alterações observadas são decorrentes da dieta hiperlipídica ou de uma situação de deficiência de vitaminas e/ou sais minerais.

Por esta razão, nos propusemos a implantar um novo modelo de resistência à insulina induzida por dieta e, com base na literatura científica, optamos pelo modelo de dieta enriquecida com sacarose (CHEN et al., 2010; CHENA et al.; 2010; EBAID et al, 2006; HAFIDIA et al.; 2001, LAUGERO et al., 2002).

A sacarose é um dissacarídeo que é clivado no intestino em uma mistura de 1:1 molar de glicose e frutose. Após a absorção, a glicose e a frutose entram na circulação e são transportadas para o fígado ou passam para a circulação geral (CAO et al., 2007).

A concentração de 30% foi utilizada porque aproxima-se da concentração presente em muitas bebidas açucaradas e é semelhante à utilizada em estudos de obesidade em camundongos (GLENDINNING et al., 2010).

Como a ingestão de calorias em excesso é considerada um importante contribuinte para o efeito diabetogênico, os animais utilizados neste estudo foram alimentados *ad libitum* ao invés de isoenergeticamente.

Os resultados obtidos com as dietas ricas em sacarose são conflitantes. Por exemplo, Surwit et al. (1995), determinando o papel da gordura e da sacarose da dieta na obesidade e no diabetes, concluiu que a gordura, e não a sacarose, é responsável pela hiperinsulinemia, acúmulo de gordura abdominal, obesidade e hiperglicemia em camundongos B/6J. Aguilera et al. (2004), empregando ratos que receberam dieta enriquecida com sacarose em água (30%) durante 21 semanas, observou hipertensão, anormalidades metabólicas, obesidade abdominal, aumento da gordura epididimal, hepatomegalia e aumento das concentrações de TNF- α .

Por outro lado, Bizeau, Pagliassotti (2005), verificaram que ratos que receberam dieta enriquecida com sacarose entre uma e trinta semanas apresentaram resistência à insulina entre 2 e 5 semanas, ocorrendo inicialmente no fígado e rins e mais tarde no músculo e tecido adiposo. Porém, ao contrário dos machos, ratas não desenvolveram resistência à insulina em resposta à dieta enriquecida com sacarose durante oito semanas.

Os resultados controversos descritos anteriormente decorreriam de diferenças entre espécies. Por exemplo, ratos Wistar são mais sensíveis a uma dieta rica em sacarose no desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina, enquanto que camundongos C57BL/6L são mais sensíveis às dietas hiperlipídicas (CHENA et al., 2010). Os resultados conflitantes entretanto, não dependem apenas da espécie investigada, pois Chicco et al. (1999) demonstraram que a magnitude destas mudanças pode variar de acordo com a idade do animal, a quantidade de carboidrato e o período de tempo de oferta da sacarose.

Como descrevemos anteriormente, a dieta enriquecida com sacarose consistiu na adição de sacarose na água (30% p/v) até quatro semanas. Esta concentração de sacarose é semelhante à empregada por Glendinning et al. (2010) que observaram aumento da ingestão calórica e obesidade em três de quatro linhagens de camundongos investigadas.

Nossos resultados, em termos de ingestão alimentar, peso corporal e deposição de gorduras, foram semelhantes aos encontrados na literatura (AGUILERA et al., 2004; BRITO

et al., 2007; CAO et al., 2007; DINIZ et al., 2008).

A oferta de sacarose na água reduz ($P < 0,05$) a ingestão alimentar (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Surwit et al. (1995) em camundongos que recebiam sacarose (16%) diluída em água.

Houve progressiva elevação da ingestão de sacarose ao longo de 28 dias (Tabela 2). Portanto, se levarmos em conta a quantidade de calorias ingeridas como sacarose, a quantidade total de calorias ingerida pelo grupo suplementado com sacarose foi superior ($P < 0,05$) à ingerida pelo grupo controle cuja fonte calórica se restringiu à ração padrão (Tabela 3). De acordo com estes resultados, o grupo que recebeu dieta enriquecida com sacarose apresentou maior peso corpóreo ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (Tabela 4). Resultados semelhantes foram descritos por Diniz et al. (2008) em ratos que receberam sacarose diluída na água (30%) durante 42 dias. Nestes animais, o menor consumo de ração foi compensado pela maior ingestão de sacarose ocorrendo obesidade intra-abdominal e aumento do peso corporal. É interessante observar que estes resultados também foram demonstrados em humanos onde o consumo a longo prazo de água adoçada com sacarose eleva o peso corporal pelo fato da redução na ingestão alimentar não ser suficiente para compensar o ganho calórico (BRAY, NIELSEN, POPKIN, 2004; CAO et al., 2007).

Em relação à deposição de gordura, o grupo que recebeu dieta enriquecida com sacarose apresentou valores mais elevados ($P < 0,05$) de gordura retroperitoneal (Tabela 6), epididimal (Tabela 7) e subcutânea inguinal (Tabela 8).

Estes resultados criaram a expectativa de encontrarmos resultados semelhantes aos descritos para dieta hiperlipídica, para a glicemia e produção hepática de glicose. Em relação à produção hepática de glicose, cumpre destacar que Bizeau, Pagliassotti (2005) observaram aumento da gliconeogênese em ratos que receberam dieta enriquecida com sacarose durante uma semana em estudos *in vivo*, perfusão de fígado *in situ* ou hepatócitos isolados. Porém, a

glicemia (Tabela 5) e a produção hepática de glicose (Figuras 8), uréia (Figuras 9), piruvato (Figuras 10) e L-lactato (Figuras 11) a partir de L-alanina (5 mM) foram semelhantes nos dois grupos investigados ao longo das quatro semanas.

Em resumo, diferente da dieta hiperlipídica, a dieta rica em sacarose, apesar de elevar a deposição de gorduras e o peso corpóreo, não alterou a glicemia de jejum e a produção hepática de glicose, razão pela qual não avaliamos o efeito do infliximabe neste grupo.

7 CONCLUSÕES

Embora a dieta rica em sacarose simule em muitos aspectos o consumo excessivo de bebidas adoçadas com sacarose, em particular, no maior consumo de energia e ganho de peso, no que se refere aos efeitos sobre a glicemia e produção hepática de glicose, os efeitos obtidos foram pouco significativos.

Por outro lado, a suplementação com dieta HL, promove elevações significativas na glicemia de jejum e na produção hepática de glicose e estas alterações deixam de ocorrer com a administração de infliximabe.

Portanto, em se tratando de camundongos da linhagem Swiss, a dieta hiperlipídica mostrou-se mais efetiva como modelo de hiperprodução hepática de glicose, hiperglicemia e na prevenção destas alterações pelo emprego de produtos biologicamente ativos com propriedades antidiabéticas.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, A. A.; DIAZ, G. H.; BARCELATA, M. L.; GUERRERO, O. A.; ROS, R. M. O. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. v. 15, p. 350-357, 2004.

ALLEZ, M.; KARMIRIS, K.; LOUIS, E.; ASSCHE, G. V.; BEN-HORIN, S.; KLEIG, A.; VAN DER WOUDE, J.; BAERT, F.; ELIAKIM, R.; KATSANOS, K.; BRYNSKOV, J.; STEINWURZL, F.; DANESEM, S.; VERMEIRE, S.; TEILLAUD, J.; LÉMANN, M.; CHOWERS, Y. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Definitions, frequency and pharmacological aspects. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2010. Disponível em: http://www.sanquin.nl/Sanquin-eng/Biologicals_Commercial_Parties.nsf/ Acesso em: 03. Jul. 2010.

ALLISON, D.B.; FONTAINE, K. R.; MANSON, J. E.; STEVENS, J.; VAN ITALLIE, T. B. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA*. v. 282, p. 1530-1538, 1999.

ARANCETA, J.; PEREZ-RODRIGO, C.; RIBAS, L.; SERRA-MAJEM, L. I. Sociodemographic and lifestyle determinants of food patterns in Spanish children and adolescents: the end kid study. *Eur J Clin Nutr*. v. 57, suppl. 1, p. S40-S44, 2003.

ARAÚJO, E. P.; DE SOUZA, C. T.; UENO, M.; CINTRA, D. E.; BERTOLO, M. B.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology*. v. 148, n. 12, p. 5991–5997, 2007.

ASTRUP, A.; BUEMANN, B.; WESTERN, P.; TOUBRO, S.; RABEN, A.; CHRISTENSEN, N. J. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr*. v. 59, p. 350-355, 1994.

ASTRUP, A.; BUEMANN, B.; TOUBRO, S.; RABEN, A. Defects in substrate oxidation involved in the predisposition to obesity. *Proc Nutr Soc*. v. 55, p. 817–828, 1996.

BARR, S. I.; MCCARRON, D. A.; HEANEY, R. P.; DAWSON-HUGHES, B.; BERGA, S. L.; STERN, J. S.; OPARIL, S. Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *J Am Diet Assoc*. v. 100, p. 810-817, 2000.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*. v. 2, n. 5, p. 1-14, 2005.

BATISTA, M.R.; FERRAZ, M.; BAZOTTE, R.B. Are physiological changes in meal-fed rats determined by the amount of food ingested in the last meal or due to the feeding schedule? *Physiol Behav.* v. 62, p. 249-253, 1997.

BAZOTTE, R. B.; EIK FILHO, W. Insulina e seus análogos. In: BAZOTTE, R. B. *Paciente Diabético: Cuidados farmacêuticos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2010. cap. 7, p. 61-77.

BAZOTTE, R.B.; GAZOLA, V.A.F.G.; BRACHT, A. Estudo do metabolismo de células isoladas. In: BRACHT A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. (Org.). *Métodos de Laboratório em Bioquímica*. 1 ed. Barueri - São Paulo - Editora Manole LTDA, 2003, v. 1, p. 261-273.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 1 ed. New York Academic Press, 1974, v. 2, p. 1205-1215.

BERGMAN, R. N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* v. 11, p. 351-356, 2000.

BIZEAU, M. E.; PAGLIASSOTTI, M. J. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism Clinical and Experimental.* v. 54, p. 1189-1201, 2005.

BRAY, G. A.; POPKIN, B. M. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr.* v. 68, p. 1157-1173, 1998.

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* v. 4, p. 537-543, 2004.

BRITO, V. B.; FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; SILVEIRA, I. D.; ROCHA, J. B. T. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ -aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutrition.* v. 23, p. 818-826, 2007.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K. G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C. E.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* v. 3, n. 3, p. 485-501, 2006.

CAO, D.; LU, H.; LEWIS, T. L.; LI, L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* v. 282, n. 50, p. 36275-36282, 2007.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

CHANGANI, K. K.; BARNARD, M. L.; BELL, C. J. D.; THOMAS, E. L.; WILLIAMS, S. C. R.; BLOOM, S. R.; ILES, R. A. In vivo assessment of metabolic perturbations following alanine and glucagon administration using ³¹P-MRS in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1335, p. 290-304, 1997.

CHEN, H. Cellular inflammatory responses: novel insights for obesity and insulin resistance. *Pharmacol Res*. v. 53, p. 467-477, 2006.

CHEN, G.; HUANG, C.; CHANG, M.; CHEN, C.; CHEN, S.; HUANG, C.; CHAO, P. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism*. p. 1-10, 2010.

CHENA, G.; HUANGA, C.; CHANGA, M.; CHENB, C.; CHENB, S.; HUANGE, C.; CHAOA, P. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045537>. Acesso em: 03.Nov. 2010.

CHERKI, M.; BERROUGUI, H.; DRISSI, A.; ADLOUNI, A.; KHALIL, A. Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res*. v. 54, p. 1-5, 2006.

CHEUNG, D.; BRYER-ASH, M. Persistent hypoglycemia in a patient with diabetes taking etanercept for the treatment of psoriasis. *J. Amer. Acad. Dermatology* v. 60, n. 6, p. 1032-1036, 2009.

CHICCO, A.; BERNAL, C.; SORIA, A.; GIANGROSSI, G.; LOMBARDO, Y. Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dislipidemic rats. *Nutr. Res*. v. 19, n. 2, p. 281-293, 1999.

CORREIA, M. L.; HAYNES, W. G.; RAHMOUNI, K.; MORGAN, D. A.; SIVITZ, W. I.; MARK, A. L. The concept of selective leptin resistance: Evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes*. v. 51, p. 439-442, 2002.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D- glycerate-2-phosphate. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, v. 2, p. 1446-1448, 1974.

D'ALESSANDRO, M. E.; CHICCO, A.; KARABATAS, L.; LOMBARDO, Y. B. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*. v. 11, p. 273-280, 2000.

DINIZ, Y. S.; SANTOS, P. P.; ASSALIN, H. B.; SOUZA, G. A.; ROCHA, K. K. H. R.; EBAID, G. M. X.; SEIVA, F. R. F.; AMAUCHI, J. F.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B.;

NOVELLI, E. L. B. Conjugated linoleic acid and cardiac health: Oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets. *Eur. J. Pharmacol.* v. 579, p. 318-325, 2008.

EBAID, G. M. X.; FAINE, L. A.; DINIZ, Y. S.; RODRIGUES, H. G.; GALHARDI, C. M.; RIBAS, B. O.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. *Food and Chemical Toxicology.* v. 44, p. 293-299, 2006.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet.* v. 365, p. 1415-1428, 2005.

ENNS, C. W.; MICKLE, S. J.; GOLDMAN, J. D. Trends in food and nutrient intakes by adolescents in the United States. *Fam Econ Nutr Rev.* v. 15, n. 2, p. 15-27, 2003.

ESCOBAR, H. Melhor amigo do homem é o rato de laboratório. *Jornal da Ciência.* 2002. Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detailhe.jsp?id=3746>. Acesso em: 03. Nov. 2010.

FERRAZ M, ISHII-IWAMOTO EL, BATISTA MR, BRUNALDI K, BAZOTTE RB. Sorbitol accumulation in rats kept on diabetic condition for short and prolonged periods. *Acta Pharmacol Sin.* v. 18, p. 309-311, 1997.

FERREIRA, E.B.; CEDDIA, R.B., CURI, R.; ALONSO, M.I.C.; LOPES, G.; BAZOTTE, R.B. Swimming-exercise increases the capacity of perfused rat liver to produce urea from ammonia and L-glutamine. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol.* v. 102, p. 289-303, 1998.

FOSTER, M. T.; WARNE, J. P.; GINSBERG, A. B.; HORNEMAN, H. F.; PECORARO, N. C.; AKANA, S. F.; DALLMAN, M. F. Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology.* v. 150, p. 2325–2333, 2009.

GAÍVA, M. H. G.; COUTO, R. C.; OYAMA, L. M.; COUTO, G. E.; SILVEIRA, V. L.; RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. O. Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. *Nutr.* v. 19, n. 2, p. 144-149, 2003.

GALLETTO, R.; SIQUEIRA, V.L.D.; FERREIRA, E. B.; OLIVEIRA, A.J.B.; BAZOTTE, R.B. Absence of antidiabetic and hypolipidemic effect of *Gymnema sylvestre* in both non-diabetic and alloxan-diabetic rats. *Arq Biol Technol.* v. 47, p. 545-551, 2004.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M. S.; RABE'S, J. P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J. P.; JUNIEN, C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity*. v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007.

GARBER, A. J.; KARL, I. E.; KIPNISS, D. M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle: the precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 251, n. 3, p. 836-843, 1976.

GARCIA, R.F.; GAZOLA, V.A.F.G.; BARRENA, H.C.; HARTMANN E.M.; BERTI, J.; TOYAMA, M. H.; BOSCHERO A. C.; CARNEIRO, E.M.; MANSO F. C.; BAZOTTE, R. B. Blood amino acids concentration during insulin induced hypoglycemia in rats: the rule of alanine and glutamine to glucose recovery. *Amino Acids*. v. 33, p. 151-155, 2007.

GAZOLA, V.A.F.G.; LOPES, G.; LIMEIRA, D. M.; GALLETTO, R.; GAZOLLA, S.; CURI, R.; BAZOTTE, R.B. Effect of diet supplementation with L-carnitine on hepatic catabolism of L-alanine in rats. *Acta Pharmacol Sin*. v. 23, p. 296-299, 2002.

GLENDINNING, J. I.; BREINAGER, L.; KYRILLOU, E.; LACUNA, K.; ROCHA, R.; SCLAFANI, A. Differential effects of sucrose and fructose on dietary obesity in four mouse strains. *Physiology & Behavior*. v. 101, n. 3, p. 331-343, 2010.

GOTTLIEB, A. B.; LEONARDI, C. L.; GOFFE, B. S.; ORTONNE, J. P.; VAN DER KERKHOF, P. C.; ZITNIK, R.; NAKANISHI, A.; JAHREIS, A. Etanercept monotherapy in patients with psoriasis: a summary of safety, based on an integrated multistudy database. *J Am Acad Dermatol*. v. 54, suppl. 2, p. S92-S100, 2006.

GROSS, L. S.; LI, L.; FORD, E. S.; LIU, S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr*. v. 79, p. 774-779, 2004.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr*. v. 67, p. 563S-572S, 1998.

GUTMANN, I.; BERMEYER, H. U. Determination of urea. . In: BERGMEYER, H. U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, p. 1791-1794, 1974.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate: determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMEYER, H. U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, p. 1464-1472, 1974.

HAFIDIA, M. E.; CUELLARA, A.; RAMIREZB, J.; BANOSA, G. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal D9 and D5-desaturase activities. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 12, p. 396–403, 2001.

HALLFRISCH, J.; COHEN, L.; REISER, S. Effects of feeding sucrose in a high fat diet. *J Nutr*. v. 111, p. 531-536, 1981.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocyte expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*. v. 259, p. 87-91, 1993.

HOWARD, B. V.; WYLIE-ROSETT, J. Sugar and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the committee on nutrition of the council on nutrition, physical activity, and metabolism of the American Heart Association. *Circulation*. v. 106, p. 523–527, 2002.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. *IBGE*. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

INCA. Alimentos, nutrição, atividade física e prevenção de câncer: uma perspectiva global. *Ministério da Saúde*. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

KANAREK, R. B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr*. v. 112, p. 1546-1554, 1982.

KENDIG, E. L.; SCHNEIDER, S. N.; CLEGG, D. J.; GENTER, M. B.; SHERTZER, H. G. Over-the-counter analgesics normalize blood glucose and body composition in mice fed a high fat diet. *Biochem. Pharmacol*. v. 76, p. 216-224, 2008.

KOBAYASHI, M.; OHNO, T.; TSUCHIYA, T.; HORIO, F. Characterization of diabetes-related traits in MSM and JF1 mice on high-fat diet. *J. Nutr. Biochem*. v. 15, p. 614-621, 2004.

KOWALSKA, I. Role of adipose tissue in the development of vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. v. 78S, p. S14-S22, 2007.

LAUGERO, K. D.; GOMEZ, F.; MALANO, S.; DALLMAN, M. E. Corticosterone infused intracerebroventricularly inhibits energy storage and stimulates the hypothalamo-pituitary axis in adrenalectomized rats drinking sucrose. *Endocrinology*. v. 143, p. 4552–4562, 2002.

LIU, S.; MANSON, J. E. Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* v. 12, p. 395–404, 2001.

LEIJ-HALFWERK, S.; VAN DER BERG, J. W. O.; SIJENS, P. E.; WILSON, J. H. P.; OUDKERK, M.; DAGNELIE, P. C. Altered hepatic gluconeogenesis during l-alanine infusion in weight-losing lung cancer patients as observed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy and turnover measurements. *Cancer research.* v. 60, p. 618-623, 2000.

LEVY-COSTA, R. B.; SICHERI, R.; PONTES, N. S.; MONTEIRO, C. A. Disponibilidade de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saude Publica.* v. 39, n. 4, p. 530-540, 2005.

LOMBARDO, Y. B.; DRAGO, S.; CHICCO, A.; FAINSTEIN-DAY, P.; GUTMAN, R.; GAGLIARDINO, J. J.; GOMEZ DUMM, C. L. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism,* v. 45, n. 12, p. 1527-1532, 1996.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem.* v. 17, p. 1-13, 2006.

MAZZA, J.; ROSSI, A.; WEINBERG, J. M. Innovative Uses of tumor necrosis factor inhibitors. *Dermatol Clin.* v. 28, p. 559–575, 2010.

MCGARRY, J. D. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science.* v. 258, p. 766-770, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. *Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.* Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

MITKA, M. AHA. Added sugar not so sweet. *J. Am. Med. Assoc.* v. 302, p. 1741–1742, 2009.

MONGE-ROJAS, R. Dietary intake as a cardiovascular risk factor in Costa Rican adolescents. *J Adolesc Health.* v. 28, n. 4, p. 328-337, 2001.

MOYA, J. M. G. Complicaciones infecciosas asociadas al uso de fármacos antagonistas Del factor de necrosis tumoral. Revisión de conjunto. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v. 23, n. 9, p. 551-559, 2005.

OGUZ, F. M.; OGUZ, A.; UZUNLULU, M. The effect of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Clin Belg.* v. 62, n. 4, p. 218-222, 2007.

PAULA, R. B. de ; SILVA, A. A. da; HALL, J. E. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension.* v. 43, p. 41-47, 2004.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol.* v. 54, p. 885-909, 1992.

REAVEN, G. M.; RISSER, T. R.; CHEN, Y-D. I.; REAVEN, E. P. Characterization of a model of dietary-induced hypertnglycemia in young, nonobese rats. *J Lipid Res.* v. 20, p. 371-378, 1979.

REAVEN, G. M. Why syndrome X? from Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. *Cell Metab.* v. 1, p. 9-14, 2005.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; SURWIT, R.; FEIGLOS, M.; KUHN, C.; RODIN, J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (c57bl/6j) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* v. 42, n. 11, p. 1405-1409, 1993.

RIBEIRO, R. T.; LAUTT, W. W.; LEGARE, D. J.; MACEDO, M. P. Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia.* v. 48, p. 976-983, 2005.

ROSMOND, R. Visceral obesity and the metabolic syndrome. *International Textbook of Obesity.* p. 338-350, 2001.

RUSSELL, A.; HARAOU, B.; KEYSTONE, Z. E.; KLINKHOFF, A. Current and Emerging therapies for rheumatoid arthritis, with a focus on infliximab: clinical impact on joint damage and cost of care in Canada. *Clin Ther.* v. 23, p. 1824-1838, 2001.

SACHDEVA, P.; PATEL, B.G.; PATEL, B.K. Drug use in pregnancy; a point to ponder! *Indian J Pharm Sci.* v. 71, p. 1-7, 2009.

SAMUEL, V. T.; LIU, Z.; QU, Z.; ELDER, B. D.; BILZ, S.; BEFROY, D.; ROMANELLI, A. J.; SHULMAN, G. I. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* v. 279, n. 31, p. 32345-32353, 2004.

SANTOS, *Estudos da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (Oryctolagus cuniculus)*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008. Disponível em: http://bdtd.ufal.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=621. Acesso em: 10. Jul. 2010.

SCHREYER, S. A.; WILSON, D. L.; LEBOEUF, R. C. C57BL:6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. v. 136, p. 17-24, 1998.

SERI, K.; SANAI, K.; MATSUO, N.; KAWAKUBO, K.; XUE, C.; INOUE, S. L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism*, v. 45, n. 11, p. 1368-1374, 1996.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. v. 132, p. 2169–2180, 2007.

SIQUEIRA, V.L.D.; BAZOTTE, R.B. Razões do emprego de animais como modelo experimental em aulas práticas e como ferramenta de investigação científica. *Arquivos da Apadec*. v. 8, p. 12-15, 2004.

STUMVOLL, M.; MEYER, C.; PERRIELLO, G.; KREIDER, M.; WELLE, S.; GERICH, J. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v. 274, n. 37, p. E817-E826, 1998.

SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A. E.; OPARA, E. C.; KUHN, C. M.; REBUFFÉ-SCRIVE, M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. v. 44, p. 645-651, 1995.

TAKANO, M.; NISHIHARA, R.; SUGANO, N.; MATSUMOTO, K.; YAMADA, Y.; TAKANE, M.; FUJISAKI, Y.; ITO, K. The effect of systemic anti-tumor necrosis factor-alpha treatment on Porphyromonas gingivalis infection in type 2 diabetic mice. *Archives of oral biology*. v. 55, p. 379-384, 2010.

THOMAS, C. D.; PETERS, J. C.; REED, G. W.; ABUMRAD, N. N.; SUN, M.; HILL, J. O. Nutrient balance and energy expenditure during ad libitum feeding of high-fat and high-carbohydrate diets in humans. *Am J Clin Nutr.* v. 55, p.934-942, 1992.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 117, p. 244-279, 2008.

TSUNODA, N.; IKEMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; MARUYAMA, K.; WATANABE, H.; GOTO, N.; EZAKI, O. High-monounsaturated fat diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J Mice. *Metabolism*, v. 47, n. 6, p. 724-730, 1998.

URSINI, F.; NATY, S.; GREMBIALE, R. D. Infliximab and insulin resistance. *Autoimmunity Reviews*. v. 9, p. 536-539, 2010.

VAN HERPEN, N. A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*. v. 94, n. 2, p. 231-241, 2008.

VIGITEL. Vigitel Brasil 2009: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. *Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

ZANELLA, M. T.; KOHLMANN JR, O.; RIBEIRO, A. B. Treatment of obesity hypertension and diabetes syndrome. *Hypertension*. v. 38, part 2, p. 705-708, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. *WHO*. Geneva, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence of diabetes: estimatives for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

YAZDANI-BIUKI, B.; MUELLER, T.; BREZINSCHEK, H.; HERMANN, J.; GRANINGER, W.; WASCHER, T. C. Relapse of diabetes after interruption of chronic administration of anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab: A case observation. *Diabetes care*, v. 29, n. 7, p. 1712-1713, 2006.