

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO SÁVIO MARTINS BORGES

**Efeitos metabólicos da leucina sobre a Síndrome de  
Cushing**

TERESINA – PI  
2019

FRANCISCO SÁVIO MARTINS BORGES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

**Area de concentração:** Farmacologia

**Linha de Pesquisa:** Farmacologia Endócrina

**Orientador:** Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal

TERESINA – PI  
2019

FRANCISCO SÁVIO MARTINS BORGES

## **Efeitos metabólicos da leucina sobre a Síndrome de Cushing**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Data de aprovação: 05/12/2018

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal (Orientador)**  
Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

---

**Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (1º Examinador)**

---

**Profª. Dr. João Paulo Jacob Sabino (2ª Examinador)**

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estão apoiando minhas decisões e aos amigos que sempre me incentivaram com palavras de apoio diante dos momentos de dificuldades.

## AGRADECIMENTOS

Eu costumo dizer que logo após a ideia vem a busca por aquilo que temos em mente e concomitante a isso esta os obrigados necessários da vida. Ninguém consegue construir nada sozinho por menor que seja seu desejo sempre estará alguém lhe ajudando. E essa etapa de minha vida foi importante a ajuda de muitas pessoas, o meu muito obrigado a todos.

A Deus o pai de todos e aquele que me fortalece a cada dia, um corpo sem Deus é um saco vazio. Deus tudo é obra permitida por te.

Aos meus pais, Francineide e Edivaldo, por se fazerem presente sempre na minha vida e me apoiando em minhas decisões e em tudo que eu necessito.

Ao meu orientador Leonardo Torres, eu não tenho como agradecer, não me refiro apenas a questões relacionadas ao meu projeto de pesquisa e sim a todos os ensinamentos que me passou, é um grande exemplo a ser seguido em todos os sentidos, com palavras firmes e conselhos aprendi muito, levarei isso pra vida.

Ao meu amigo Ruan Pablo que sempre esteve ao meu lado desde o dia que resolvi fazer o mestrado em farmacologia. Grande irmão.

Ao meu amigo Lucas Rodrigues por ter me auxiliado no pré-projeto de pesquisa e sempre que precisei.

Ao meu amigo Ronaldo que sempre esteve me ajudando.

Aos meus amigos do laboratório Railson, Letícia, Renato, Jardel, Luis, Cairo, João Orlando, Iago, Brenda, Amanda, Guilherme. Cada um se fez importante nessa conquista ajudando sempre da maneira como podia. Eu devo muito a vocês. Aqueles finais de semana dentro do laboratório serão sempre lembrados.

Ao grande e eterno Lucas Pereira dos Santos (*in memoriam*), serei eternamente grato a você, deixou sua grande contribuição. Partiu e ficou saudades.

Ao Rafael Almendra por suas orientações no inicio do mestrado.

Ao Julio César por suas palavras de amigo nos meus momentos de desespero.

Ao Benedito Pereira por seu empenho e disponibilidade em me ajudar durante as análises bioquímicas.

A Celyane Piauilino por ter me ajudado em momentos necessários das análises dos resultados.

Um obrigado especial a Simone de Araújo, Ian Jhemes, Ana Karoline (Karolzinha) por inúmeros momentos que sempre estiveram dispostos a me auxiliar nas atividades didáticas.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia por sempre me ajudarem nos momentos que precisei.

Aos funcionários do departamento de Biofísica e Fisiologia.

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Amanda Marreiro e Prof. Luciano Lopes pelas importantes contribuições para melhoria do meu trabalho.

Ao professor Emidio Marques e Prof<sup>a</sup> Aline de Freitas por toda ajuda durante esse tempo que estive na UFPI.

Aos meus amigos de turma de mestrado Aline Nunes, Ana Rita França, Erick Bryan, Izabela Borges, Layane Amorim, Polyanna Negreiros, Rodrigo Gonçalves, e Yara Pires pela amizade, os dias passaram rápidos porém muito aprendi com vocês.

Aos professores do mestrado em farmacologia por contribuírem para meu aprendizado, compartilhando seus conhecimentos e experiências.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) por me receberem sempre tão bem e pelo suporte de material e laboratórios quando necessário.

<sup>8</sup> *Jesus disse:*

*- Eu afirmo a vocês que pode ser que ele não se levante porque é amigo dele, mas certamente se levantará por causa da insistência dele e lhe trará tudo o que ele precisar. <sup>9</sup> Por isso eu digo: peçam e vocês receberão; procurem e vocês acharão; batam, e a porta será aberta para vocês. <sup>10</sup> Porque todos aqueles que pedem recebem; aqueles que procuram acham; e a porta será aberta para quem bate.*

*11 Lucas 8:10*

## RESUMO

BORGES, F. S. M. **Efeitos metabólicos da leucina sobre a Síndrome de Cushing**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

Os glicocorticóides quando administrados em tratamento prolongado (> 3 semanas) ou em excesso no organismo, podem levar ao desenvolvimento da Síndrome de Cushing (SC), que é caracterizada por múltiplos distúrbios metabólicos. Pesquisas com suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), especialmente a leucina (LEU), demonstram que este nutriente é capaz de melhorar a saúde metabólica em animais obesos. No entanto, evidências recente apontam que a ausência dos ACR ou da LEU na dieta são capazes de melhorar alguns aspectos metabólicos, por reduzir a adiposidade e aumentar a termogênese. Portanto, não está claro se a suplementação dietética com LEU seria uma estratégia benéfica. Para ajudar a resolver essa questão, examinamos o efeito da suplementação com LEU nos distúrbios metabólicos atribuídos à SC. Para tanto, usamos o tratamento nutricional de longo prazo com LEU no modelo farmacológico de SC, induzido por excesso de dexametasona (DEXA), (dose 1,0mg/kg) aplicado quatro vezes semanais via intraperitoneal. Descobrimos que a suplementação com LEU piora vários dos quadros metabólicos que caracterizam a SC como a adiposidade, a hipertriglicidemia, hipercolesterolemia e hiperalbunemia. Bem como, favorece maior acúmulo de gordura e marcadores de lesão hepática. Ademais, verificamos que este aminoácido não apresentou potencial antioxidante, redução na peroxidação lipídica e aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, nossos resultados indicam que LEU piora a saúde metabólica em animais com SC, e sugerem que o aumento específico de LEU alimentar pode representar uma estratégia ariscada no modelo experimental estudado.

**Palavras – Chaves:** glicocorticóides; dexametasona; síndrome de cushing; suplementação com leucina



## ABSTRACT

BORGES, F. S. M. **Metabolic effects of leucine on Cushing's syndrome**. 2018. 75f Master's thesis. Postgraduate Program in Pharmacology, Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, Teresina-PI.

Glucocorticoids when given in prolonged (> 3 weeks) or in excess in the body may lead to the development of Cushing's Syndrome (SC), which is characterized by multiple metabolic disorders. Research with branched chain amino acid (BCAA) supplementation, especially leucine (LEU), demonstrates that this nutrient is capable of improving metabolic health in obese animals. However, recent evidence indicates that the absence of BCAA or LEU in the diet are able to improve some metabolic aspects, by reducing adiposity and increasing thermogenesis. Therefore, it is not clear whether dietary supplementation with LEU would be a beneficial strategy. To help address this issue, we examined the effect of LEU supplementation on metabolic disorders attributed to SC. For this, we used the long-term nutritional treatment with LEU in the pharmacological model of SC, induced by excess dexamethasone (DEXA), (dose 1.0mg / kg) administered four times weekly intraperitoneally. We found that supplementation with LEU worsens several of the metabolic conditions that characterize CS such as adiposity, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and hyperalbuminemia. As well as, it favors greater accumulation of fat and markers of liver damage. In addition, surprisingly, we verified that this amino acid presented antioxidant potential, reduction in lipid peroxidation, even when it presents high myeloperoxidase activity. Our results indicate that LEU worsens metabolic health in SC animals, and suggests that the specific increase in dietary LEU may represent a strategy in the experimental model studied.

**Keywords:** glucocorticoids; dexamethasone; cushing's syndrome; supplementation with leucine

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>11<math>\beta</math>-HSD1</b>	11 $\beta$ -hidroesteróide 1
<b>ACC</b>	Acetil-coa carboxilase
<b>Acetil-CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>ACR</b>	Aminoácidos de cadeia ramificada
<b>ACS</b>	Acetil coa sintase
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrópico
<b>AG</b>	Ácido graxo
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por amp
<b>ATACR</b>	Aminotrasferase de aminoácidos de cadeia ramificada
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CON</b>	Controle
<b>DEXA</b>	Dexametasona
<b>DEXA + Leu 0,5%</b>	Grupo dexametasona + leucina na dose 0,5%
<b>DEXA + Leu 1,0%</b>	Grupo dexametasona + leucina na dose 1,0%
<b>DEXA + Leu 1,5%</b>	Grupo dexametasona + leucina na dose 1,5%
<b>G6PDH</b>	Glicose – 6 – fosfato – desidrogenase
<b>GDP</b>	Guanidina difosfato
<b>GTP</b>	Guanidina trifosfato
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HOMA</b>	Homeostasis model a assessment
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina (insulin-like growth factor – 1)
<b>IKB-<math>\alpha</math></b>	Inibidor do nf-k b

<b>IL-6</b>	Interleucina – 6
<b>ipGTT</b>	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
<b>ipITT</b>	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
<b>IRS1</b>	Substrato do receptor de insulina – 1
<b>JNK</b>	C-jun n-terminal quinase
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LEU</b>	Leucina
<b>Mtor</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>mTORC1 e C2</b>	Complexos 1 e 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NF-k B</b>	Fator nuclear – kb
<b>PCR</b>	Proteína c reativa
<b>PDK1</b>	Quinase dependente de fosfoinosítídeos – 1 (phosphoinositide-dependent kinase)
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol – 3 – quinase
<b>PKB</b>	Proteína quinase B
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Rna mensageiro
<b>TA</b>	Tecido adiposo
<b>TAB</b>	Tecido adiposo branco
<b>TAB. EPI</b>	Tecido adiposo epididimal
<b>TAB. R.P</b>	Tecido adiposo retroperitoneal
<b>TAB.SUB</b>	Tecido adiposo subcutâneo
<b>TG</b>	Triglicerídeo
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade

**OBS:** as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Liberação de cortisol pelo eixo hipotalâmico hipofisário adrenal (HHA) ...	17
<b>Figura 2.</b> Apresentação histológica da glândula adrenal. ....	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação dos glicocorticóides pela ligação a seus receptores .....	21
<b>Figura 4.</b> Efeito do uso crônicos dos glicocorticóides sobre o metabolismo .....	22
<b>Figura 5.</b> Resumo das etapas de sinalização de insulina e seus efeitos em tecidos responsivos .....	24
<b>Figura 6.</b> Característica da síndrome de Cushing .....	25
<b>Figura 7.</b> Possíveis mecanismos de formação de EROS e ações das enzimas antioxidantes.....	27
<b>Figura 8.</b> Regulação do complexo enzimático $\alpha$ -desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR).....	30
<b>Figura 9.</b> Regulação funcional de neurônios hipotalâmicos em resposta à ação da insulina e leptina.....	32
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de ativação da via JAK/STAT pela Leptina (L) .....	35
<b>Figura 11.</b> Esquema representativo dos procedimentos realizados no Estudo 1.....	42
<b>Figura 12.</b> Ilustração do sistema de pletismografia de cauda utilizado.....	44
<b>Figura 13.</b> Efeitos crônicos da DEXA sobre o consumo alimentar acumulado de ratos em quatro semanas de tratamento.....	55
<b>Figura 14.</b> Efeitos crônicos da DEXA sobre a massa corporal dos ratos em quatro semanas de tratamento.....	56
<b>Figura 15.</b> Efeito crônico da DEXA sobre a PAS de ratos tratados com DEXA.....	58
<b>Figura 16.</b> Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipTTG) e área total sob a curva (tAUC).....	60

<b>Figura 17.</b> Curva glicêmica do teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipTTI) e taxa de decaimento de glicose (kitt).....	61
<b>Figura 18.</b> Efeitos da leucina sobre o consumo alimentar acumulado de ratos em quatro semanas de tratamento.....	63
<b>Figura 19.</b> Efeitos da leucina sobre o consumo hidrico de ratos com SC.....	64
<b>Figura 20.</b> Efeitos da leucina sobre o peso corporal dos ratos com SC.....	65
<b>Figura 21.</b> Efeitos da leucina sobre as concentrações de TAG hepático e concentrações plasmáticas de ALT e AST.....	68
<b>Figura 22.</b> Efeitos da leucina sobre estresse oxidativo de ratos com SC que receberam administração de leucina.....	70
<b>Figura 23.</b> Análise de expressão gênica de RNAm em tecido hepático de ratos com SC que receberam administração de leucina.....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos crônicos da DEXA sobre o peso de adrenais e tecidos gordurosos.....	57
<b>Tabela 2.</b> Valores de parâmetros avaliados em concentrações plasmáticas sanguíneas de ratos tratados com DEXA.....	59
<b>Tabela 3.</b> Efeitos da leucina sobre a massa de adrenais e tecidos gordurosos de ratos com SC.....	66
<b>Tabela 4.</b> Avaliação de concentrações bioquímicas plasmática de ratos com SC que receberam administração de leucina.....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	17
2.1 Hormônios Glicocorticóides	17
2.2 Fisiofarmacologia dos glicocorticóides e seu mecanismo de ação	18
2.3 Efeitos fisiofarmacológicos dos GCs na homeostase glicêmica	22
2.4 Uso de glicocorticóides e a síndrome de <i>Cushing</i>	23
2.5 Efeitos Metabólicos dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada – ACR	27
2.6 Leucina e a Regulação da Síntese Proteica Muscular	29
2.7 Mecanismos de Controle do Comportamento Alimentar	33
2.8 Influencia Da Leucina no Comportamento Alimentar	37
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	
3.1 Geral	39
3.2 Específicos	39
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS</b>	40
4.1 Aspectos Éticos	40
4.2 Animais	40
4.3 Eutanásia	40
4.4 Drogas e Reagentes	40
4.5 Delineamento Experimental ESTUDO 1	41
4.6 Delineamento Experimental ESTUDO 2	42
4.7 Avaliação do peso corporal e consumo de ração e água	43
4.8. Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal (TTGip)	44
4.8.1 Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTIip)	44
4.9 Análises bioquímicas	45
5.0 Avaliações do Conteúdo de Triglicerídeos Hepáticos	45
5.1 Análise da expressão gênica	45
5.2 Avaliação dos efeitos da dexametasona e administração de leucina sobre marcadores de estresse oxidativo em tecido hepático	46
6.0 Análise Estatística	49
<b>7.0 RESULTADOS</b>	50
7.1 Peso corporal e consumo de ração dos animais	51



7.2 Tratamento com dexametasona na dose 1,0mg/kg aumenta em pressão arterial .....	51
7.3 Avaliação da massa tecidual em animais tratados com dexametasona na dose de 1,0mg/kg.....	51
7.4 Determinações bioquímicas em animais tratados com dexametasona na dose 1,0 mg/kg .....	51
7.5 Efeito da dexametasona sobre a tolerancia à glicose e à insulina .....	51
<b>8.0 ESTUDO 2</b> .....	54
8.1 Efeitos da leucina sobre o peso corporal e o consumo alimentar e hídrico em animais com síndrome de cushing .....	54
8.2 Efeitos da Leucina sobre a massa de tecidos .....	56
8.3 Determinações bioquímicas em animais tratados com leucina .....	58
8.4 Avaliação de estresse oxidativo e análise de expressão gênica em fígado.....	58
<b>9 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>10 CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí .....	96
ANEXO B – Resultados de variáveis não apresentadas no estudo .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

Quando administrados em tratamento prolongado ou em excesso no organismo, os glicocorticoides (GC) (hidrocortisona, prednisona e dexametasona) podem levar ao desenvolvimento da síndrome de cushing (SC), enfermidade resultante tanto da produção endógena excessiva de cortisol como da sua administração exógena, onde há a perda do ritmo circadiano do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol (CHIMIN et al., 2014).

As características típicas desta síndrome incluem o acúmulo de gordura visceral, resistência à insulina, e intolerância a glicose, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial, podendo haver aumento dos níveis de estresse oxidativo representados pelo desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, bem como, na redução das enzimas antioxidantes (FINDLING et al., 2004).

Entre as possibilidades de reduzir os efeitos adversos causados pelo uso excessivo e/ou crônico dos GC está o uso do aminoácido de cadeia ramificada (ACR) leucina (LEU), considerado um importante nutriente por evitar o desenvolvimento da obesidade e melhorar a sensibilidade à insulina (MACOTELA et al., 2011; LI et al., 2013).

Quando administrada por via oral, a LEU ativa no hipotálamo circuitos importantes para o controle da ingestão alimentar (BLOUET et al., 2009). No entanto, há estudos demonstrando a não inibição do apetite quando testado a suplementação com leucina por via oral (ZAMPIERI et al., 2014).

Um consumo elevado de proteínas pode desencadear disfunções metabólicas como a resistência à insulina e diabetes, bem como, aumentar a mortalidade (SLUIJS et al., 2010). Por outro lado, uma dieta pobre em proteína tem apresentado benefícios com efeitos que estão relacionados à melhora na saúde metabólica e aumento de sobrevida (SIMPSON et al., 2017).

Devido à importância que a SC representa e diante da ausência de evidências a respeito dos benefícios da LEU frente à SC, faz-se necessário conhecer os potenciais efeitos deste aminoácido relacionados aos distúrbios metabólicos em

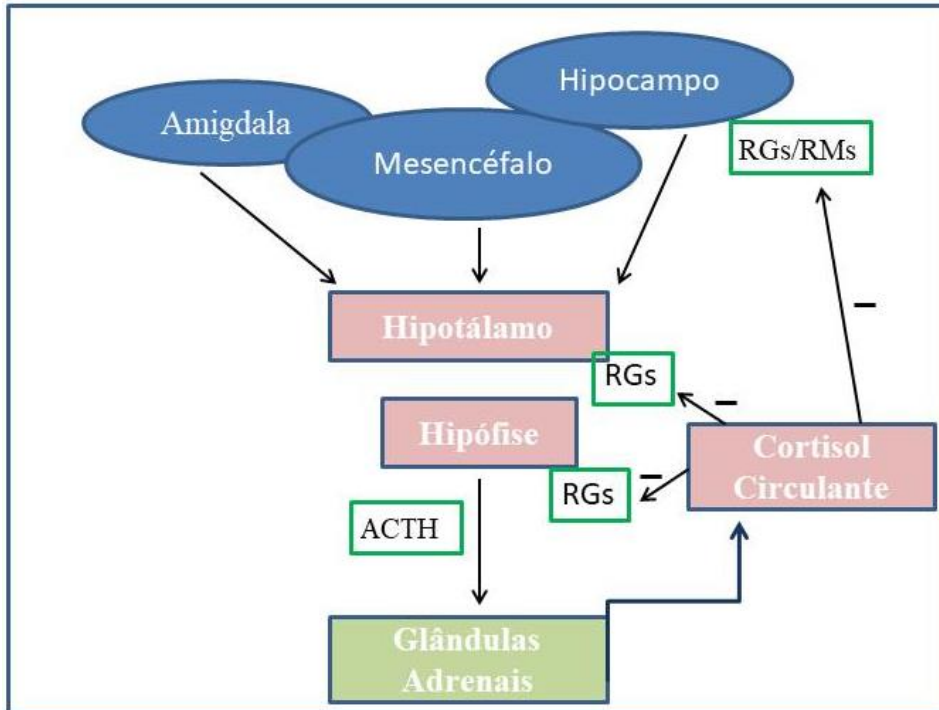
modelo experimental de SC induzida pelo excesso de dexametasona (DEXA) e suplementados com leucina.

## 2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O eixo hipotálamo-hipófise- adrenal (HHA) regulam as atividades das glândulas suprarrenais sendo fundamental para o equilíbrio da homeostasia do organismo. Para esse equilíbrio ou regulação há necessidade da influência de fatores fisiológicos como o ritmo circadiano e o estresse além de interferências patológicas (ANAGNOSTIS et al., 2009).

No SNC são originados diversos estímulos responsáveis por estimular às células hipotalâmicas à secreção de vasopressina e do hormônio liberador de liberarem o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Quando nas glândulas adrenais ou suprarrenais, em células do córtex, receptores específicos – MC2R, são ligados e ativados pelo ACTH gerando uma sinalização que estimula a produção de hormônios – glicocorticóides e mineralocorticoides. Ocorre que quando na presença de altas concentrações de cortisol na corrente sanguínea há inibição do eixo HHA, então o cortisol chega ao hipotálamo e leva a inibição de corticotropina e à adeno-hipofise com inibição do ACTH (Fígura 1) (BRUEHL et al., 2007).

**Figura 1:** Liberação de cortisol pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA)



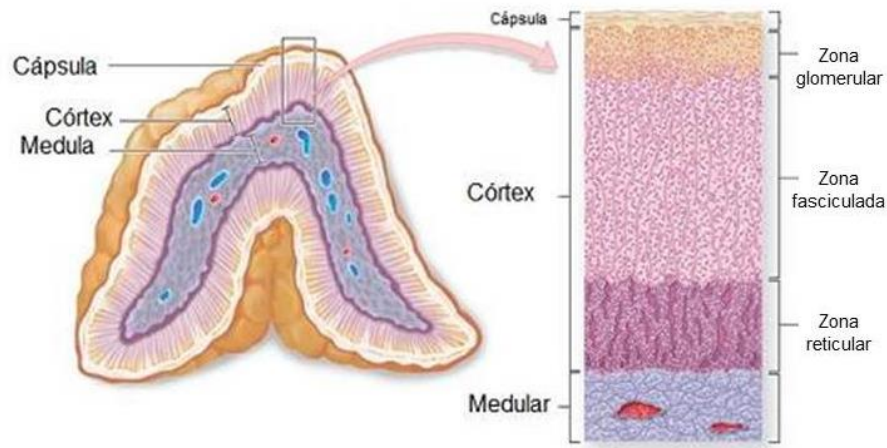
Legenda: Diagrama esquemático do eixo hipotalâmico-hipofisário adrenal (HHA), descrevendo a regulação e o feedback negativo (-) do cortisol via os receptores de glicocorticóides (RG) e de mineralocorticóide (RM). Fonte: Adaptado de JUREMA et al., 2004.

As glândulas adrenais, ou suprarrenais estão bilaterais situadas crânio-medialmente aos rins. Apresentam uma capsula e sua formação ocorre por dois diferentes tecidos - o tecido cortical, ou córtex adrenal que é dividido em três zonas (ANDREWS; WALKER, 1999). A zona glomerulosa é a mais externa e secreta aldosterona - hormônio mineralocorticóide associado com homeostase de eletrólitos no sangue (Sódio, Potássio, Cloreto, Cálcio, Magnésio entre outros); a zona reticulada é mais interna responsável por sintetizar e secretar os hormônios sexuais (andrógenos e estrogênios), e a zona fasciculada que é a maior das três zonas esta relacionada com metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de ser responsável por secretar glicocorticóide (cortisol) que atuam na estimulação de gliconeogênese, lipólise, lipogênese, proteólise e hipertrofia (WATSON et al., 2004).

O tecido medular, ou medula, de origem embrionária e com diferentes funções exerce influência no metabolismo de todo o organismo geralmente em associação com outros hormônios. Uma função primordial é de produzir e secretar adrenalina e noradrenalina por retroalimentação negativa, regulada pelo cérebro. A

secreção de corticosterona em roedores, ou de cortisol no homem se regulam principalmente pelo ACTH (JIN et al., 2004) (Figura 2).

**Figura 2:** Apresentação histológica da glândula adrenal.



Fonte: Adaptado de GUYTON, A. C. et al (2006).

### 1.1 Hormônios Glicocorticóides

O colesterol capturado da circulação sob a forma de lipoproteína de baixa densidade (LDL) pela estimulação do ACTH sofre conversão para pregnenolona, isso por induzir a ligação do colesterol ao citocromo P450 em região mitocondrial e após deixar a mitocôndria a pregnenolona torna-se o precursor obrigatório dos corticosteroides e andrógenos adrenais. Catalisadas pelas enzimas P450, como a CYP11B1, após reações de hidroxilação, podem levar ao surgimento de GCs endógenos como cortisol em humanos e corticosterona em ratos (TAVES et al., 2011).

O cortisol livre apresenta-se no plasma em três estados, a está ligado à globulina responsável por transportar corticosteroides (CBG), outra parte está ligada à albumina e cerca de 8-10 % em sua forma livre. Este quando atravessa a membrana celular interage com receptores intracelulares e assim exerce seu papel fisiológico (YANG et al., 2009). As concentrações de GCs variam ao longo do dia com picos nos períodos de maior atividade diária (CHUNG et al., 2011).

Em elevadas concentrações de GCs, as células localizadas nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam o fator liberador de corticotropina (CRF) e vasopressina (AVP) estes atuam respectivamente em CRF1 e AVPR1B – receptores específicos situados anteriormente à hipófise. Quando ativado o CRF1 leva a produção e liberação de ACTH que pela ação do AVPR1B é potencializado (YAYOU et al., 2009). O ACTH ao ativar ser receptor, MC2R- na adrenal leva a síntese de enzimas esteroidogênicas com consequente produção e liberação de GCs (XING et al., 2011).

Em sua forma fisiológica os GCs exercem diversos efeitos importantes como, por exemplo, em situações que envolvam estresse onde atuam favorecendo o metabolismo oxidativo, gerando energia em situações de fuga. Quando na deficiência desse hormônio ocorre, por exemplo, hipotensão postural, diminuição de peso e mesmo hipoglicemia. Na presença de concentrações elevadas de glicocorticóides, os mesmos atuam em seus receptores (GR) presentes nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos e na adenohipófise, reduzindo a síntese e secreção de ACTH (HUSSELL et al., 2010). Esse processo, denominado de *feedback* negativo, é importante em situações de hiperatividade do eixo HPA, sendo que falhas nessa regulação podem acarretar no aparecimento ou agravamento de doenças como exemplo a Síndrome de Cushing (SILVA et al., 2009).

## **2.2 Fisiologia dos glicocorticóides e seu mecanismo de ação**

Os glicocorticóides estão entre os hormônios que são sintetizados pelo córtex das glândulas adrenais, entre estes estão o cortisol presente em humanos e a corticosterona presente em roedores, possuem liberação mediada pelo eixo HHA. São de grande importância por atuarem na regulação do metabolismo de nutrientes, bem como, durante em adaptações fisiológicas relacionadas ao estresse e por regular a homeostase glicêmica (SCHACKE et al., 2002). Foram assim denominados por causa da influência que exercem sobre o metabolismo da glicose.

Para exercerem suas ações os GC exercem seus efeitos a níveis endócrinos e intracelular. Quando na presença da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD), cortisol e a corticosterona, são convertidos para sua forma ativa. A 11 $\beta$ -HSD2 uma das formas da 11 $\beta$ -HSD apresenta em concentrações elevadas no rim e

assim inativa o cortisol protegendo os receptores de mineralocorticoides da ligação dos glicocorticoides (SCHACKE et al., 2002)..

Outra isoforma a 11 $\beta$ -HSD1 apresenta-se em grande quantidade no tecido adiposo. Sua ativação ocorre na presença de cofatores reduzidos como o NADPH. Essas enzimas são importantes no processo de lipogênese visceral na via da síntese de novo de ácido graxo e pela G6PDH, nas primeiras reações da via das pentoses fosfato (PALOU et al., 2010). Os GC também atuam aumentando a lipólise, a proteólise e a produção de glicose hepática à proporcionar substratos para o metabolismo oxidativo (MACFARLANE et al., 2008).

Os GC se ligam a receptores específicos e exercem efeitos em praticamente todos os tecidos com ativação dos sistemas de sinalização intracelular (NUNES et al., 2013). O receptor de GC (RG) pertence à superfamília dos receptores nucleares agindo como um fator de transcrição ativado pelo hormônio e assim regula a expressão dos genes que são responsivos aos GC. O gene (GenBank *NR3C1*) de RG em humanos está localizado na porção distal do cromossomo 5 e compõe-se de 9 éxons. Os *splicing* (processo que ocorre após a transcrição do RNA com remoção de introns e junção de éxons) são responsáveis por produzir várias isoformas do receptor, em um único gene (YUDD, CIDLOWSKI, 2002).

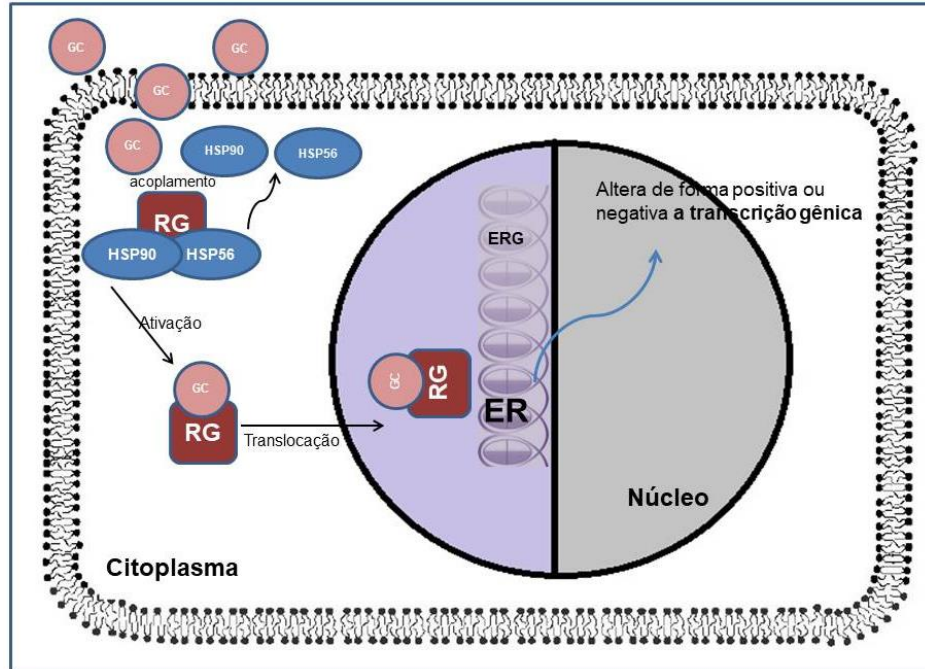
A isoforma  $\alpha$  é a forma clássica do RG e é o mediador primário da ação dos GC. A isoforma  $\beta$  age como um inibidor negativo da forma  $\alpha$ , não se liga aos GC. O receptor do GC que está inativo encontra-se no citoplasma consistindo um receptor polipeptídico, um complexo proteico formado por proteínas de choque térmico 90 e 70 (HSP90 e HSP70), uma molécula de p23 e um domínio repetido tetratricopeptídeo (TRP). Esse complexo RG/HSP tem como função principal manter o receptor no citoplasma das células, com estabilização da forma inativa e facilitando a ligação do hormônio ao RG (CASTRO et al., 2012). Ao se ligar ao hormônio, o RG se dissocia do complexo e leva à dimerização do RG.

A interação direta de dímeros do receptor do RG com sequências palindrômicas específicas no DNA, denominada elemento responsivo aos glicocorticóides (ERG) geralmente situada na região promotora dos genes (CASTRO et al., 2012). Isso estimula a transcrição dos genes responsivos aos GC e envolve componentes como RNA polimerase II e fatores gerais de transcrição gênica além



de fatores coativadores e correpressores de transativação (GLASS, ROSENFELD MG, 2000) (Figura 3).

**Figura 3:** Mecanismo de ação dos GCs pela ligação a seus receptores.

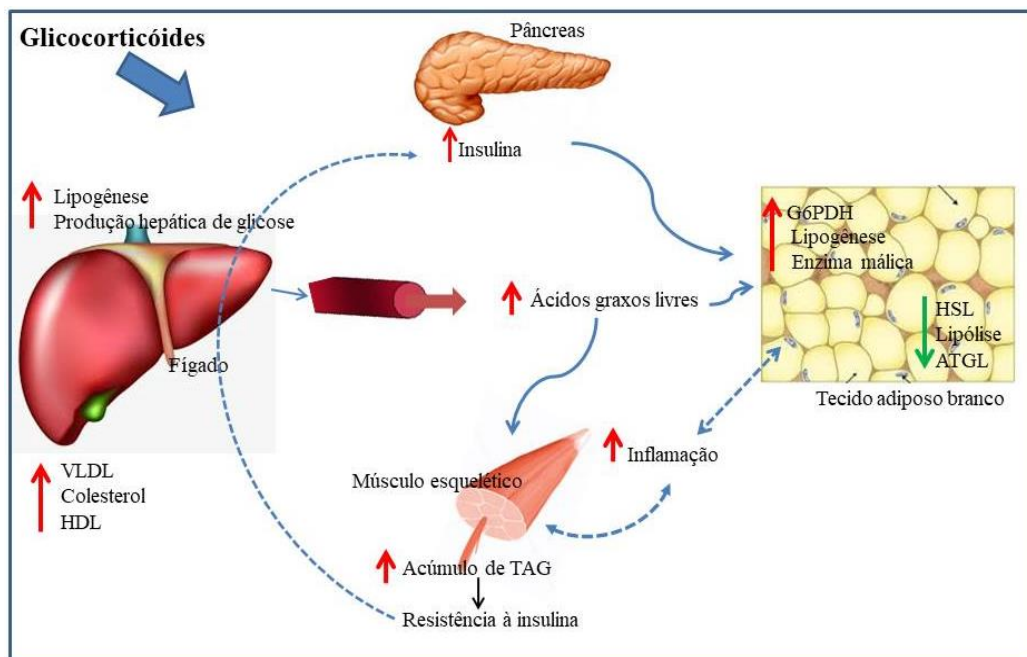


Legenda: GC = glicocorticóide; RG= receptor de glicocorticóide; ERG= elementos de resposta glicocorticóide. Quando em seu estado “desativado” fica localizado no citoplasma com um complexo multimérico de proteínas chaperones moleculares, incluindo proteínas de choque térmico (HSP90, HSP70, HSP56). Os GC endógenos ou sintéticos atuam em se ligares aos RGs. Após o acoplamento ao ligante, o receptor sofre uma alteração conformacional e transloca-se do citoplasma ao núcleo regulando a transcrição gênica e então acoplando a elementos de resposta hormonal no DNA ou interagindo com outros fatores de transcrição. O RG é reciclado para o citoplasma e somente se acopla novamente ao ligante quando a associação com proteínas chaperones moleculares estiverem completas. Subsequentemente, funciona com um fator de transcrição regulado pelo ligante por acoplamento a elementos de resposta glicocorticóides (ERGs). Fonte: Adaptado de Ogias (2009).

Os RG também atuam na repressão da transcrição gênica que geralmente ocorre com a ligação do RG a elementos responsivos negativos aos GC (nERG) localizados na região promotora de genes específicos. Outro mecanismo de transrepressão gênica se da por interações do RG com fatores de transcrição agindo por antagonismo inibitório dependente de interação entre proteínas (GLASS; ROSENFELD, 2000). Sendo os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos GC envolvidos por esta regulação negativa da transcrição gênica. Sendo a proteína ativadora-1 (AP-1) e o fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) as proteínas que mais interferem negativamente com a transativação mediada pelo RG (CHANG et al., 1998).

Nos últimos anos, os GC estão entre as drogas mais utilizadas para tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas isto por possuírem efeito anti-inflamatório e imunossupressores. Seus efeitos colaterais são frequentes e diversos como diabetes *mellitus*, úlceras pépticas, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e assim síndrome de Cushing, osteoporose, psicose, atrofia cutânea, alteram o metabolismo da glicose, principalmente por indução de resistência à insulina (RAFACHO et al., 2008a) e assim agravam o transporte de glicose e o metabolismo em tecidos periféricos com isso aumentam a liberação de glicose hepática e estimulam a gliconeogênese (ASENSIO et al., 2004) (Figura 4).

**Figura 4:** Efeitos do uso crônico dos glicocorticóides sobre o metabolismo.



Legenda: O uso crônico com GC leva o organismo a uma resistência à insulina com aumento da glicose no sangue e na produção de insulina, conduzindo a aumento da HOMA-ir, por provável falta de supressão de produção hepática de glicose e assim acúmulo de triacilgliceróis (TAG) no músculo esquelético. O aumento da lipogênese em fígado provoca dislipidemia com aumento em lipogênese em tecido adiposo mesentérico pela elevação da atividade enzimática da síntese dos ácidos graxos, glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) e enzima málica – enzimas chaves na via lipogênica. Além disso ocorre que as enzimas chave na via lipolítica, lipase hormônio-sensível e lipase de triglicerídeos de tecido adiposo (ATGL) são reprimidas. Com o aumento da lipogênese pode haver aumento da inflamação e assim agravar a resistência à insulina. Fonte: Adaptado de VIENBERG, S. G.; BJÖRNHOLM, 2014.

### 2.3 Efeitos fisiofarmacológicos dos GCs na homeostase glicêmica

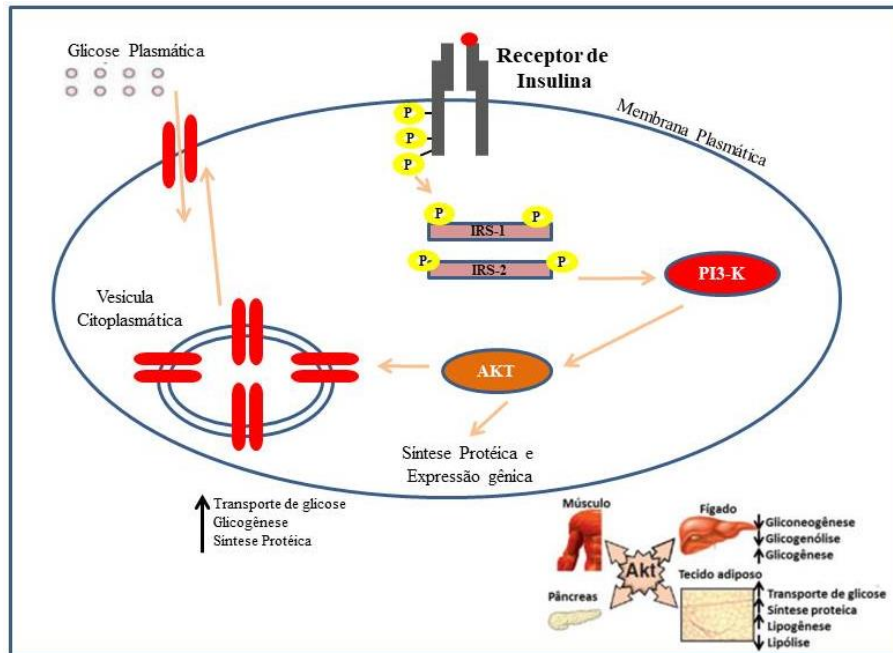
A insulina é o principal hormônio controlador da homeostase glicêmica. Efeito esse que ocorre por estímulos da captação de glicose nos tecidos periféricos, por exemplo, no musculo esquelético ou mesmo supressão de gliconeogênese hepática. Além disso, a insulina atua em diversos processos metabólicos em todos os tecidos do organismo (SCHINNER et al., 2005).

Os receptores de insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica que possui atividade cinase intrínseca com quatro subunidades – duas  $\alpha$  e duas  $\beta$  – que são unidas por pontes dissulfetos. Seus efeitos metabólicos e anabólicos iniciam quando a subunidade  $\alpha$  se ligam ao IR. Ligando se em regiões específicas da subunidade  $\alpha$  há mudança conformacional do receptor que ativa o domínio tirosina cinase em subunidade  $\beta$ . Isso leva a autofosforilação de pelo menos seis resíduos de tirosina em subunidade  $\beta$  elevando atividade tirosina cinase do IR para outros substratos proteicos. Ao ser ativado, o IR leva a fosforilação de proteínas citoplasmáticas – substrato do receptor de insulina IRS-1, em resíduos tirosina (KIMURA et al., 2002).

Quando fosforilado, o IRS-1 liga-se a subunidade regulatória p85 da Pi3k – essa enzima possui uma subunidade catalítica, p110, que catalisa fosforilação de fosfoinositóis (PI) em posição 3 do anel inositol e assim produz segundo mensageiro, fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P3), que recruta a proteína cinase dependente de inositois 1 (PDK)-1. A PDK1 atua fosforilando treonina 308 da Akt além de ativar proteínas cinase C (PKC) (KIMURA et al., 2002).

Para se tornar ativa, a Akt, necessita segunda fosforilação em resíduo 473 da serina, isso ocorre no complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) (TANIGUCHI et al., 2006). Com o Akt ativado há também regulação do transporte da glicose estimulado por insulina isso por estimulação da incorporação do transportador de glicose tipo 4 – GLUT 4- em membrana celular (KIMURA et al., 2002) (Figura 5). Os GCs quando em doses elevadas ou exposição crônica são capazes de modificar sensibilidade periférica à insulina. A hipercortisolemia esta relacionada à gliconeogênese hepática, redução em transporte e captação de glicose (RAFACHO et al., 2008a).

**Figura 5:** Resumos das etapas de sinalização de insulina e seus efeitos em tecidos responsivos



Fonte: Adaptado de CAPURSO; CAPURSO,2012.

## 2.4 Uso de glicocorticóides e a síndrome de *Cushing*

Já no início do século XX deu-se início ao uso dos GCs com finalidades terapêutica sendo a primeira delas o tratamento de artrite reumatoide com uso de cortisol. Isso foi importante, pois deu-se início ao uso sintético de GCs para tratar diversas doenças. Levando assim a pesquisas e aperfeiçoamento de análogos sintéticos do cortisol com atividade mais acentuada, maior afinidade ao receptor e um maior tempo de meia-vida, sendo a triacínolona, dexametasona e prednisona os GCs de maior uso atualmente (SCHACKE et al., 2002).

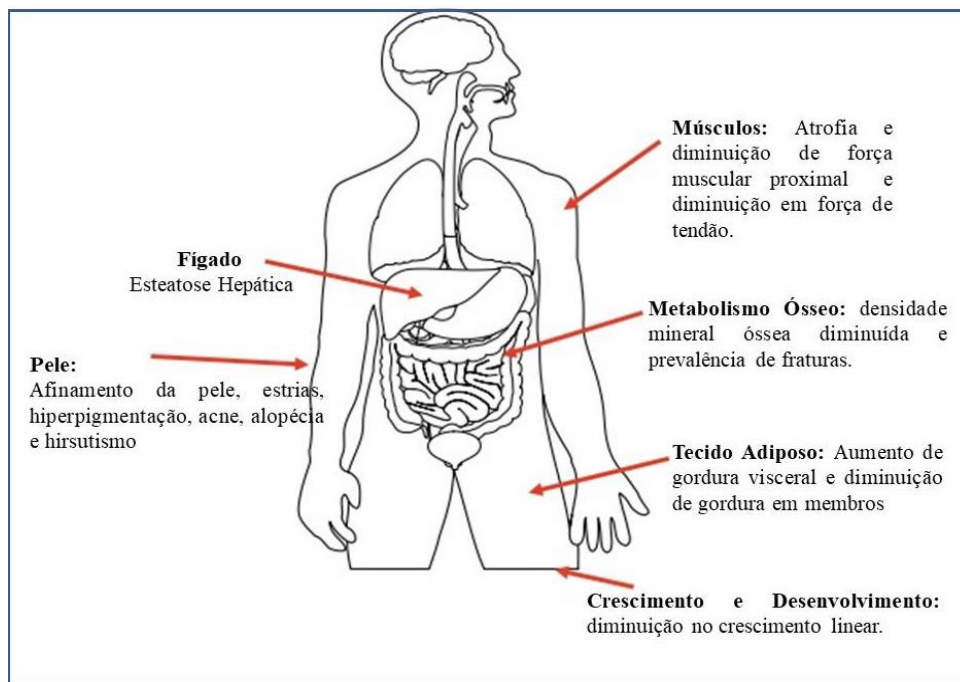
De bastante uso em práticas clínicas, a dexametasona, possui uma alta afinidade aos receptores de glicocorticóides (cerca de cinquenta vezes mais que o cortisol) além de apresentar também maior disponibilidade por não ser inativada pela enzima 11b-HSD2. Sendo de grande aplicabilidade como anti-inflamatório e imunossupressor e em casos graves de artrite reumatoide (DE BOSSCHER et al., 2014).

Os GCs exercem ações nos mais variados tecidos, porém mesmo apresentando vários efeitos fisiológicos, a mediação dos GCs ocorre pelo mesmo receptor, esse fato leva a vários efeitos adversos nos processos fisiológicos que seguem sua eficácia terapêutica fato importante pois com isso há o surgimento de

efeitos colaterais quando no uso prolongado ou em doses elevadas (HIRATA et al., 2012). Entre os efeitos colaterais estão a atrofia muscular, obesidade, hipertensão, síndrome de Cushing e resistência periférica à insulina (RAFACHO et al., 2008a).

Com o tratamento prolongado com uso de GC ou mesmo em presença excessiva deste hormônio é observado a síndrome de Cushing, nessa, a forma exógena vem devido o uso prolongado de medicamentos que contem glicocorticóides sintéticos como, por exemplo, a hidrocortisona, prednisona e dexametasona (CHIMIN et al., 2014). Entre as manifestações comuns e visíveis dessa síndrome esta o acúmulo de gordura principalmente em região central do corpo. Estima-se que entre 10 a 15 pessoas por milhão por ano sejam afetadas por essa síndrome (CUSHING'S SUPPORT & RESEARCH FOUNDATION, 2012) (Figura 6).

**Figura 6:** Características da síndrome de Cushing em humanos.



Fonte: Adaptado de Fernandez-Rodriguez et al. (2009).

Na SC uma característica bastante presente é o acúmulo de gordura nas regiões viscerais (CHIMIN et al., 2014). A proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) está envolvida na regulação energética da célula e assim em muitas mudanças metabólicas que são observadas na SC. Os GC em particular inibem a atividade da AMPK no tecido visceral ocasionando aumento da lipogênese

e reserva de gordura, já no fígado sua atividade está aumentada (Christ-Crain et al., 2008). Com isso acredita-se que a AMPK possa ser um novo mecanismo que explique as características do excesso de GC. Isso também ocorre em humanos onde há inibição da enzima e isso explica o motivo que leva a essa deposição de gordura (PROTZEK et al., 2014).

O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes onde há aumento na produção de espécies reativas e a redução das enzimas antioxidantes. Sua produção é um processo fisiológico e fundamental em funções biológicas importantes agindo na mediação de transferência de elétrons em inúmeras reações bioquímicas, exemplo seria a produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons; ativação de genes e mesmo em mecanismos de defesa em processos infecciosos (RAHMAN et al., 2006).

Os radicais livres (RL) são tidos como qualquer espécie de radical que pode apresentar existência independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica o que inclui o átomo de hidrogênio, a maioria dos íons de metais de transição e o oxigênio molecular

No entanto existem grupamentos químicos com alta reatividade em decorrência da instabilidade de suas moléculas, mas que não apresentam elétrons desemparelhados.. Dessa forma, para englobar esse conjunto de moléculas, surgiu o termo “espécies reativas” (ER) (FERREIRA et al., 2012).

Quando a produção de ER passa a capacidade de defesa antioxidante ocorre a lesão celular por oxidação direta de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) (SIES, 1995). O dano oxidativo também pode estar associado principalmente à produção de ER secundárias como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{HOCl}$ , que são formadas quando mais de uma ER está presente, em reações como: reação de Fenton entre íons ferrosos e  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzindo  $\text{OH}^-$ ; reação de  $\text{O}_2^-$  com NO produzindo  $\text{ONOO}^-$ ; reação de formação de  $\text{HOCl}$ , que ocorre entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Cl}^-$ .

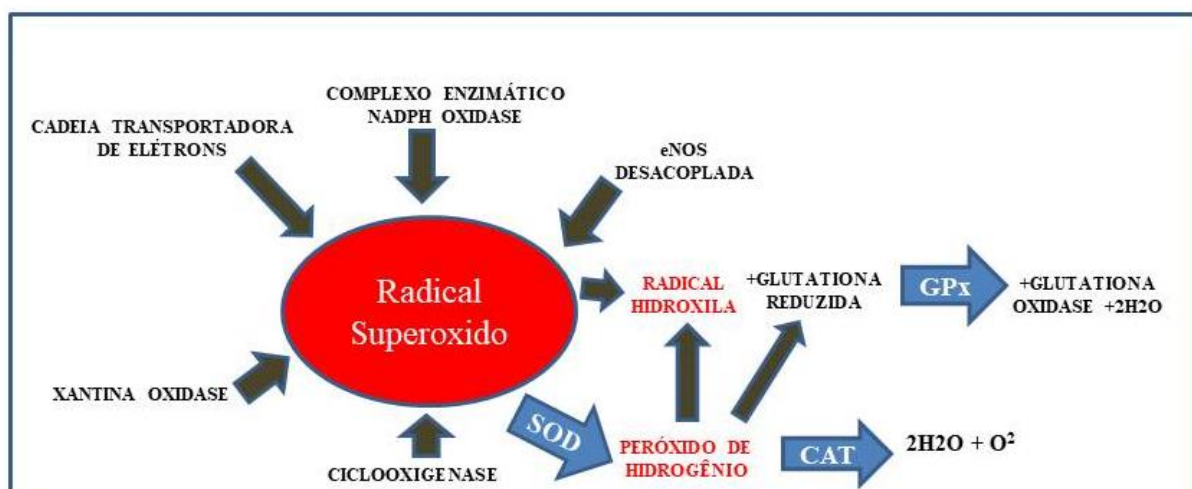
Na célula as espécies mais reativas são: ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), radical peroxila ( $\text{HO}_2^\cdot$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), óxido nítrico ( $^\cdot\text{NO}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Os mecanismos de defesa antioxidantes são agrupados em enzimáticos (primeiros a agir) e não enzimáticos que incluem compostos antioxidantes de origem dietética como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (POWERS; JACKSON, 2008).



As EROS são formadas por redução de oxigênio que pode ocorrer por diversos mecanismos. Um exemplo, na mitocôndria, na cadeia ramificada transportadora de elétrons, cerca de 2 a 5% do oxigênio que se forma são reduzidos a radicais superóxidos ou por xantina oxidase – enzima responsável por converter hipoxantina e oxigênio em radicais superóxidos e peróxidos de hidrogênio ou pela NOS desacoplada, provocada por diminuição das concentrações de BH<sub>4</sub>, responsável por regular a NOS, e promover diminuição em produção de NOS além do aumento de radicais superóxidos. Pode haver também formação de radicais livres por atividade das ciclooxigenases (COX), ou pelo complexo enzimático NADPH – responsável por transformar oxigênio em radicais superóxidos, sobretudo na presença de angiotensina II, respostas inflamatórias e outras (CAI; HARRISON, 2000).

Com relação ao sistema antioxidante este atua em prevenir e controlar a formação de EROs. Sistema que se divide em dois grupos: o primeiro que engloba: SOD - atua por transformar os ânions superóxidos em ânions peróxido de hidrogênio; CAT – converte ânions peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a GPx – que converte glutatona reduzida e ânions peróxido de hidrogênio em glutatona oxidada e água. E o segundo grupo que compreende o sistema de defesa não-enzimático relacionado a compostos de origens dietética (EATON, 1991) (Figura 7).

**Figura 7:** Possíveis mecanismos de formação de EROS e ações das enzimas antioxidantes.



Legenda: Mecanismos possíveis de formação de EROS (vermelho) e ação das enzimas antioxidantes (azul). SOD- superóxido desmutase; CAT- catalase; GPx-glutationa peroxidase e NADPH Oxidase - Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase. Fonte: Adaptado de FINKEL; HOLBROOK, 2000.

O  $\text{OH}\cdot$  é apontado como de grande potencial reativo e bastante instável isopropicia a produção de danos oxidativo alterando funções biológicas das membranas celulares, resultante de danos nos lipídios o que leva a produção de  $\text{ROO}\cdot$ ; e  $\text{ROOH}\cdot$  que atuam modificando a fluidez das membranas celulares e assim diminui a capacidade de manutenção do equilíbrio no gradiente de concentração aumentando a permeabilidade da membrana e levando a processos inflamatórios que então reagem com as bases do DNA (AKHGARI et al., 2003).

A SOD é responsável pela reação que reduz radical superóxido a peróxido de hidrogênio ( $\text{O}_2\cdot^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtido como produto final da atividade da SOD é inativado pela atividade da CAT e da GSH-Px, nos peroxissomos e no citosol, respectivamente. Existem três tipos de SOD, SOD-1 é encontrada no citosol e no núcleo, dependente de zinco e de cobre, a SOD-2 está presente na parte interna da mitocôndria, dependente de manganês e a SOD-3 é encontrada no meio extracelular. Todas requerem um metal redox de transição ativo no sítio ativo para realizar a decomposição catalítica do ânion superóxido (POWERS; JACKSON, 2008).

O estudo de Shefer et al., (2016) relata que o estresse oxidativo aumentado leva ativação do sistema renina-angiotensina, assim na síndrome de Cushing pode haver o aumento da resposta pressórica. Isso resulta da ativação plaquetária o que propicia a riscos cardiovasculares. Sendo que há uma relação direta com a reatividade vascular por meio do desequilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação (RIZZONI et al., 2009), com possíveis ligações na redução do óxido nítrico e peptídeo natriurético atrial além do aumento de prostanóides, angiotensina II, vasopressina, endotelinas e catecolaminas (CAREY; SIRAGY, 2003).

Em sua pesquisa, FALLO et al., (2009) mostra que pacientes com síndrome de Cushing possuem um desequilíbrio simpátovagal em que há presença da atividade parassimpática. Isso não seria acompanhado por aumento da concentração de catecolaminas circulantes. Pode haver também uma redução na variabilidade cardíaca e aumento do balanço autonômico simpático levando assim a um maior risco em mortalidade cardíaca naqueles pacientes.



## 2.5 Efeitos Metabólicos dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada – ACR

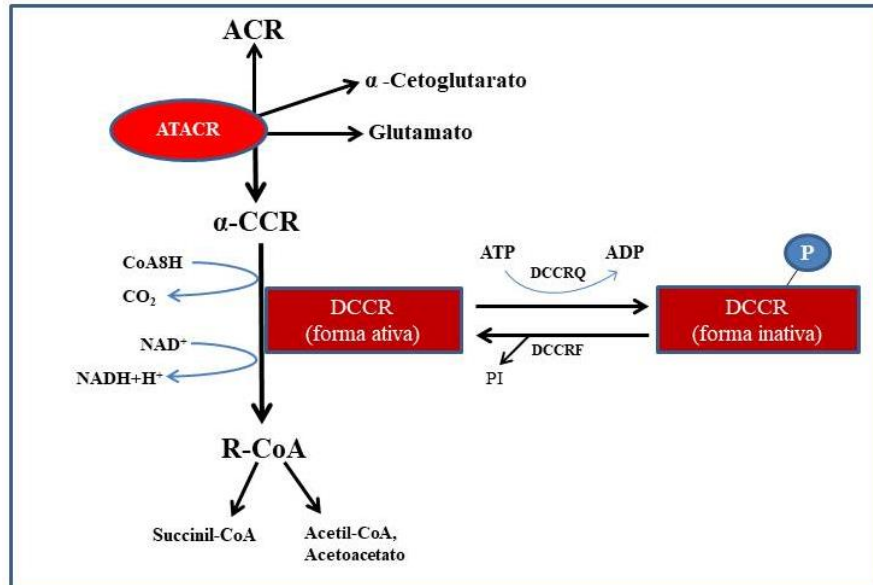
Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), leucina, valina e isoleucina- nos últimos anos vem sendo bastante investigados quanto aos seus efeitos metabólicos. Apresentam respectivamente concentração plasmáticas médias de 120, 220 e 63  $\mu\text{mol/L}$ . Em concentrações intramusculares em forma livre média estão em 133, 253 e 68  $\mu\text{mol/L}$  de água intracelular. Em adultos, os ACR são fundamentais para manter os níveis de proteínas corporais além de servirem como fontes de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina (SHIMOMURA et al., 2006).

Demais funções dos ACR estão relacionadas a importantes efeitos terapêuticos visto que são capazes de atenuar diminuição de massa magra quando houver diminuição de massa corporal, melhorar processo de cicatrização, em indivíduos idosos, favorecer o balanço proteico, além de serem benéficos em tratamentos de patologias hepáticas e renais (SHIMOMURA et al., 2006).

Quanto às vias bioquímicas envolvidas no catabolismo desses aminoácidos, diferente do que ocorre com outros aminoácidos que primeiro se metabolizam no tecido hepático, os ACR possuem seus sistemas enzimáticos mais ativos localizados no musculo esquelético. No entanto apesar do fígado não catabolizar de forma direta os ACR, possuem um importante sistema ativo para degradação de cetoácidos de cadeia ramificada advindos dos correspondentes ACR. Isso vem em decorrência de as duas primeiras enzimas envolvidas no catabolismo dos ACR estarem em distribuição única, ou seja, aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR) catalisar a transaminação dos ACR em uma ação reversível, e o complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR) que catalisa a descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada, em reação irreversível (LYNCH; ADAMS, 2014).

A transaminação pelas isoenzimas ATACR constitui a primeira reação envolvida no catabolismo dos ACR, elas aceitam os três aminoácidos ACR como substrato e dependem de piridoxal- fosfato (vitamina B6). Em células de mamíferos, duas ATACR estão presentes – uma mitocondrial e outra citosólica- possuem alta atividade em coração e rim, atividade intermédiana em músculo esquelético e baixa atividade em fígado (SHE et al., 2007).

**Figura 8:** Regulação do complexo enzimático desidrogenase de  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR).



Legenda: (ATACR =aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada;  $\alpha$ -CCR=  $\alpha$  cetoácidos de cadeia ramificada; R-CoA= acil-CoA). A atividade do complexo DCCR é regulada por um ciclo de fosforilação/desfosforilação. A enzima DCCR quinase (DCCRQ) promove inativação da DCCR por meio da fosforilação (P) da subunidade E1 $\alpha$  desse complexo, enquanto isso a DCCR fosfatase (DCCRF) é responsável pela ativação do complexo pela desfosforilação da subunidade E1 $\alpha$ . Modificado de SHIMOMOURA et al., (2006b). Pela reação catalisada por ATACR, ocorre a conversão da leucina em  $\alpha$ -cetoisocaproato; isoleucina em  $\alpha$ -ceto- $\beta$ - metilvalerato; e valina em  $\alpha$ -cetoisovalerato. Junto à isso há conversão em glutamato do  $\alpha$ -cetoglutarato – receptor de nitrogênio oriundos dos ACR. Com isso a transaminação dos ACR favorece meios para transferir nitrogênio dos ACR a depender da necessidade dos tecidos por glutamato ou outros aminoácidos não essenciais (SHE et al., 2007).

Após a reação catalisada pela ATACR pode haver descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada pela mediação do complexo enzimático DCCR – presentes na superfície interna da membrana mitocondrial interna. Em que derivados da leucina, isoleucina e valina são convertidos em isovaleril-CoA, 2-metilbutiril-CoA e isobutilil-CoA, respectivamente. Constituindo a principal enzima a regular a via catabólica dos ACR a DCCR atua a controlar o fluxo do catabolismo destes. Sua atividade é regulada por um ciclo de fosforilação/desfosforilação (BROSNAN, BROSNAN, 2006) (Figura 8).

Há na literatura estudos que mostram a importância dos ACR no consumo humano. Em uma pesquisa randomizada, Koopman et al., (2005) faz uma avaliação em síntese e degradação muscular após o treino com ingestão de carboidratos junto ou não com proteína ou leucina livre. Em que oito jovens, sexo do masculino, não treinados e saudáveis foram divididos em três grupos, grupo carboidrato (CHO),

grupo carboidrato com proteína (CHO+PRO) e carboidrato com proteína e leucina (CHO+PRO+LEU), como resultados houve menor degradação muscular e maior síntese protéica em CHO+PRO+LEU e CHO+PRO. Com adição de leucina, no grupo CHO+PRO+LEU houve menor oxidação de proteínas e os valores de insulina foram elevados quando comparados com grupo CHO+PRO.

Esse aminoácido atua em tecidos periféricos como fígado, músculo e o tecido adiposo podendo afetar homeostase glicêmica, metabolismo de lipídios, peso corporal, atividade mitocondrial e mesmo o metabolismo oxidativo (FREUDENBERG; PETZKE; KLAUS, 2012).

É relatado por Zanchi et al. (2009) que uma alimentação suplementada com leucina promove síntese e degradação proteica muscular além de inibição da proteólise o que ocorre em treinamentos intensos, quando em estados catabólicos. Glynn et al. (2010) relata que exercícios de resistência prévia promove perturbação da homeostase do musculo esquelético ocasionando ativação de processos catabólicos e anabólicos no interior da célula muscular. No entanto, não há na literatura trabalhos que relacionem a suplementação de leucina com indivíduos sedentários portadores de alguma síndrome metabólica, dessa forma torna se importantes um estudo que faça essa relação.

## **2.6 Metabolismo Lipídico**

Os lipídios obtidos na dieta, ou mesmo que formados pelo próprio organismo, em virtude a pouca solubilidade em meio aquoso são transportados por lipoproteínas (LP). Moléculas que são compostas de um núcleo hidrofóbico formado por triglicerídeos e colesterol esterificados envolvidos por uma capa hidrofílica constituída por proteínas (apoproteínas ou apolipoproteínas) e lipídios (fosfolipídios e colesterol livre) (SANTOS; GUIMARÃES; DIAMENT, 1999).

Os componentes lipídicos, em especial os ácidos graxos (AGs), desempenham importantes funções na estrutura de membranas celulares em processos metabólicos. Os AGs são ácidos carboxílicos compostos por longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila em uma extremidade e um metila em outra (CALDER, 2005). Podem ser saturados ou insaturados – na

ausência de duplas ligações são classificados como saturados e na presença de duplas ligações, insaturados (RUXTON et al., 2004).

As duplas ligações são importantes por aumentar a flexibilidade da cadeia e consequentemente a fluidez das membranas biológicas quando esses ácidos graxos são incorporados. Podem ser classificados como AGs de cadeia curta (2 a 4 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa quando acima de doze carbonos (HIRABARA et al., 2012).

Por meio das lipoproteínas é possível a solubilização e o transporte de lipídios, - geralmente substâncias hidrofóbicas em meio aquoso plasmático. As lipoproteínas são compostas por lipídios e proteínas denominadas apolipoproteínas (apos). Essas apos desempenham funções no metabolismo das lipoproteínas formando partículas lipoproteicas como as apos B100 e B48, além da atuação como ligantes a receptores de membrana como as apos B100 e E ou cofatores enzimáticos, como as apos CII, CIII e AI (CEFALU, 2001).

As classes de lipoproteínas podem ser separadas em dois grupos: (1) ricas em TAG, - maiores e menos densas, sua representação se dá por quilomícrons, de origem intestinal e por lipoproteínas VLDL, de origem hepática; (2) as ricas em colesterol, - incluem as LDL e as HDL (GRUNDY et al., 2013).

Os lipídios possuem seu metabolismo influenciado pela ação de duas enzimas, a lipase hormônio sensível (LHS) e a lipase de lipoproteínas (LLP). Localizadas em células endoteliais e agindo sobre quilomícrons e VLDL esta a LLP que realiza a hidrólise de triglicerídeos e fosfolipídios em glicerol e ácidos graxos (CHARLTON-MENYS; DURRINGTON, 2008).

Ao entrarem nas células os AGs são transportados para o interior da mitocôndria através de acil-transferases, esses podem ser convertidos em TAG e armazenados na própria célula, podem ser incorporados nas membranas, seguir na via da beta-oxidação ou ainda entrar no núcleo e ativarem ou inibirem expressão gênica (MARTIN et al., 2009).

Após o processo de lipólise, AGs são capturados por células musculares, adipócitos, os quilomícrons e AGs remanescentes também capturados pelo fígado e utilizados na formação de VLDL (GRUNDY et al., 2013).

A insulina também está diretamente ligada ao processo de oxidação dos nutrientes e atua em metabolismo de lipídios, reduzindo a oxidação de gorduras por inibição da LHS, estimulando o depósito por ativação da LLP. Aumentando a disponibilidade de AGs com diminuição na captação de glicose (ciclo de Randle). O aumento em conteúdo de acetil-CoA resultante de AGs aumenta a produção de citrato que junto com a razão ATP/ADP elevada, inibe a atividade da fosfofrutocinase, resultando em diminuição da atividade da via glicolítica. Com isso há aumento em conteúdo de glicose-6-fosfato, que passa a inibir a hexoquinase II, isso leva ao aumento de glicose intracelular e diminuição em seu transporte. Assim, os AGs levam a inibição da captação e utilização de glicose, ocasionando RI (RANDLE et al., 1963).

Com a RI há alteração no uso adequado da glicose, promovendo aumento da lipólise com elevação de ácidos graxos livres plasmáticos. Decorrente disso as alterações mais comuns são quadro de hipertrigliceridemia e redução de HDL-c (JÉQUIER; TAPPY, 1999).

As HDL produzidas no intestino delgado e fígado, removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos e retorna para o fígado, funcionando também como depósito circulante de proteínas importantes para o metabolismo lipídico. Além disso, atribui-se à HDL atividade anti-inflamatória, antitrombótica (MINEO et al., 2006) e antioxidante (KONTUSH; CHANTEPIE; CHAPMAN, 2003).

## **2.7 Mecanismos de Controle do Comportamento Alimentar**

Sinais internos e externos são coordenados pelo sistema nervoso central (SNC) e então há o controle da fome, gastos energéticos e níveis de saciedade dessa forma permitindo um controle de peso corporal. Quando ocorrem alterações metabólicas como resistência a insulina ou intolerância à glicose há modificação em controle de homeostase podendo ocasionar problemas como a obesidade. O tronco encefálico, as áreas corticais e o hipotálamo integram as principais estruturas encefálicas responsáveis pelo controle da homeostase energética (ZHENG; BERTHOUD, 2008).

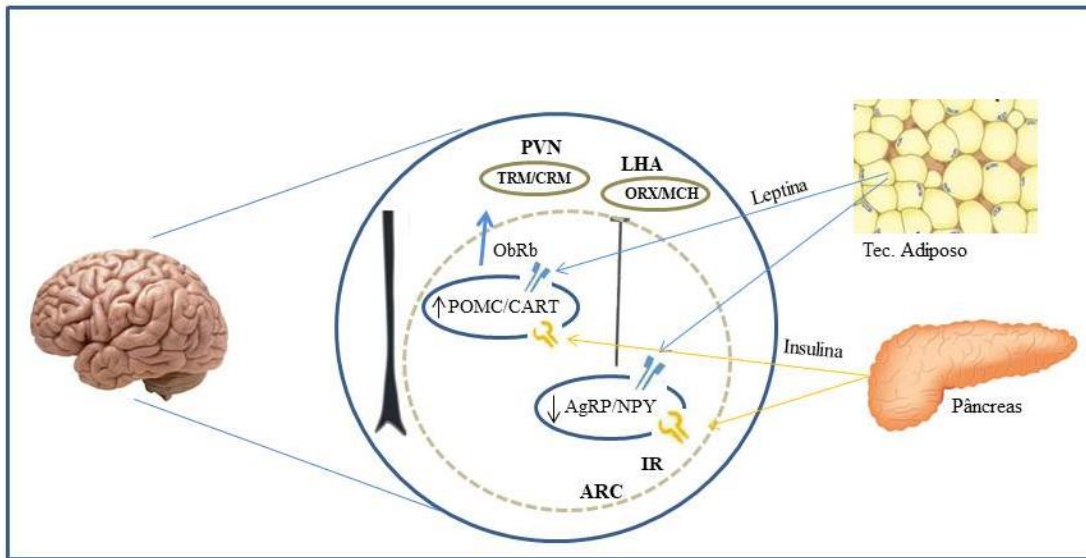
O núcleo arqueado (ARC), dentro do hipotálamo, constitui numa área de maior integração entre sinais advindos da periferia e tronco cerebral definindo

ações que buscam adequar o balanço energético do organismo. Informações que vêm desse núcleo são levadas para outras áreas cerebrais que enviam sinais efetores e assim elevam a fome e reduzem o gasto energético ou aceleram (LUQUET; MAGNAN, 2009). Essa área é importante por localizar neurônios tidos como de primeira ordem por receberem sinalizações diretas e se intercomunicarem com outros núcleos desenvolvendo respostas fisiológicas adequadas a estado pós-prandial e jejum (FAIPOUX et al., 2008).

Dentre os sinais que vêm do tecido adiposo esta a leptina que informam ao cérebro sobre reservas de gordura corporal. No ARC a leptina inibe a produção de dois importantes orexígenos: o Neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene Agouti (AgRP); juntos são estimuladores da ingestão alimentar. Outra subpopulação de neurônios expressos é a pró-ópio-melanocortina (POMC) que possuem relação com a anfetamina e cocaína (CART). A POMC é precursora de vários produtos em especial o  $\alpha$ MSH ou o melanotan II (MTII), análogo estável, e agem levando a perda do apetite por agirem em receptores de melanocortina (principalmente o tipo 4 – MC4R) (JOURNEL et al., 2012).

Os neurônios NPY atuam na produção do ácido gama aminobutírico (GABA) que inibem neurônios POMC por receptores Y1 como também de receptores GABA. Quando ausente a atividade GABAérgica há um comportamento orexígeno (ZHENG; BERTHOUD, 2008). Neurônios NPY/AgRP e da POMC além de expressarem receptores de leptina possuem regulação direta por esta. Sendo assim quando em há diminuição na concentração de leptina ocorre aumento de apetite enquanto na elevada concentração ocasiona redução do apetite (CONE, 2005). Os principais ativadores do sistema de integração do controle do comportamento alimentar são os hormônios leptina e insulina (Figura 10).

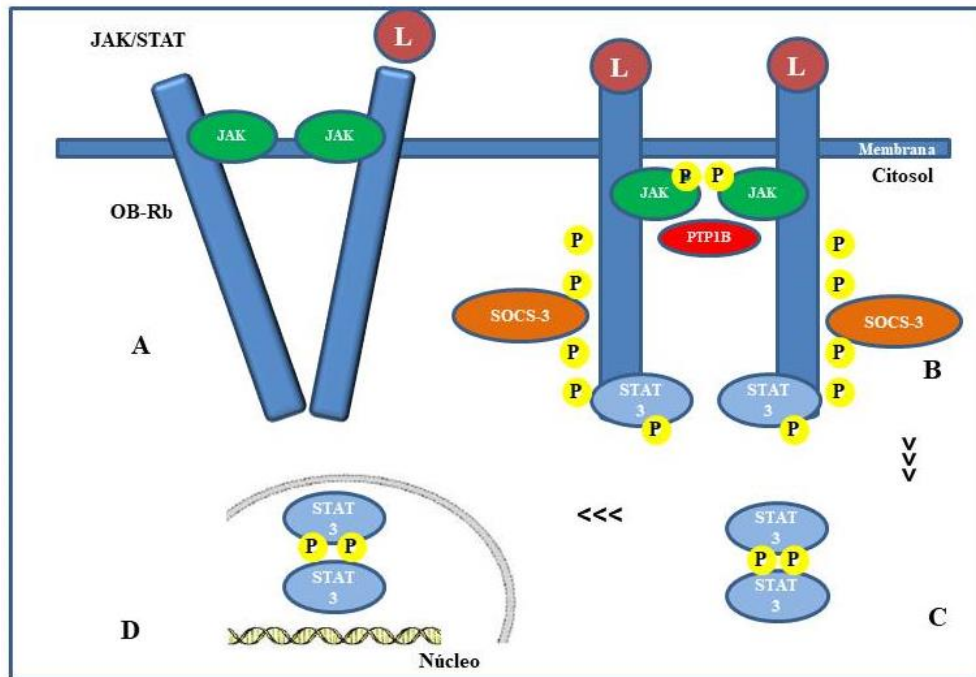
**Figura 9:** Regulação funcional de neurônios hipotalâmicos em resposta à ação da insulina e leptina.



Legenda: ARC = núcleo arqueado; PVN = núcleo hipotalâmico paraventricular; LHA = área hipotalâmica lateral; POMC = pró-ópio-melanocortina; CART = transcrito regulado pela cocaína e anfetamina; AgRP = peptídeo relacionado ao agouti; NPY = neuropeptídeo Y; ObRb = forma longa do receptor de leptina; IR = receptor de insulina. Leptina e insulina são secretadas pelo tecido adiposo e pâncreas respectivamente, informando ao hipotálamo sobre o status energético do organismo. Adaptado de ROSEBERRY et al., 2004.

A leptina por meio dos receptores da classe das citocinas, ativa as enzimas janus quinase 2 (JAK2) e STATs, em especial o STAT 3, além de exercer efeitos em outras vias intracelulares que incluem a ERK (quinase sensível a estímulos externos), PI3K (fosfatidil inositol 3 quinase) e cAMP/PDE3B (AMP cíclico e fosfodiesterase 3B). Quando ocorre perda do sinal PI3K há atenuação da inibição do apetite induzida pela leptina e estimulação do sistema nervoso simpático (SNP) com então aumento de gastos energéticos - por estimulação do sistema nervoso simpático (Figura 9) (WADA et al., 2014).

**Figura 10:** Mecanismo de ativação da via JAK/STAT pela Leptina (L)



Legenda: Após a leptina se ligar ao seu receptor ocorre uma mudança conformacional (OB-Rb) (A) isso permite a justaposição e ativação de JAKs que se tornam capazes de ativar resíduos de tirosina de outras JAKs e também do receptor de leptina (B). Com a JAK2 ativada há fosforilação de resíduos de tirosina do domínio intracelular do receptor e assim permite associação das proteínas STATs, que são fosforiladas pelas JAKs e dissociam-se dos receptores, formando dímero (C) que se deslocam até o núcleo para regular expressão gênica ligando se a regiões promotoras específicas de genes-alvos (D). Adaptado de FRUHBECK,2006.

Quanto à insulina, esta age, no cérebro suprimindo atividade dos neurônios que produzem NPY e elevando a atividade dos neurônios que produzem POMC, assim torna-se um potente anoréxico no SNC. Sendo assim é evidente que há ações superpostas de insulina e leptina a explicação para isso esta no fato de que ambas ativam o PI3K no interior de neurônios hipotalâmicos com então requerimento do PI3K para supressão do apetite (VARELA & HORVATH, 2012).

A leptina por via metabolismo da glicose é estimulada pela insulina, e inibida por catecolaminas e tiazolidinedionas (por supressão do PPAR gama). Leptina e insulina possuem ações coincidentes em inibir o apetite além de apresentarem o PI3K como fator comum de sinalização. Sendo que os receptores de leptina são expressos em diversas estruturas telencefálicas como o hipocampo, neocortex, núcleo accumbens ou mesmo receptores de paladar (BERTHOUD, 2007).

Em indivíduos obesos as altas concentrações de leptina não são capazes de levar o bloqueio do apetite pelo desenvolvimento de resistência à leptina. Com isso é



possível inferir que esse hormônio não tenha surgido de forma evolutiva para prevenir a obesidade. Suas ações biológicas se dão em baixas concentrações plasmáticas e sua ausência é um forte estímulo para ingestão alimentar. Porém, quando em concentrações normais a elevação de leptina não leva a redução do apetite. Provavelmente isso tenha ocorrido porque haveria desvantagem para espécies que habitavam em ambientes com restrição alimentar então houve evolução para mecanismos que produziu resistência à leptina (ROSEBERRY et al., 2004).

A resistência à leptina pode ocorrer por defeito nos receptores que sinalizam neurônios produtores de NPY e POMC. Sendo que a deleção de dois dos reguladores negativos da sinalização de leptina - supressor da sinalização de citocina 3 ou SOCS3 e tirosina fosfatase PTB1B- é capaz de proteger camundongos de virem a ter resistência à leptina (JOURNEL et al., 2012).

Por ação parácrina, a proteína ativadora da acetilação (ASP), atua no tecido adiposo com estímulo da insulina, por quilomícrons além de VLDL com isso há aumento em captação de glicose e elevação do diacilglicerol acil- transferase o que reduz lipase sensível a hormônio e aumento da síntese de triglicerídeos. Quando suprimida a ação da ASP ocorre resistência à obesidade. Com efeitos em fígado, músculo e SNC levando a uma maior sensibilidade à insulina, diminuição de produção hepática de glicose e elevação em oxidação de ácidos graxos (LENARD; BERTHOUD, 2008).

Importante ressaltar que além dos neurônios já citados, o comportamento alimentar é também influenciado por sinalização neural periférica transmitida na presença de alimentos no trato gastrointestinal. Sendo que nestes, os receptores são ativados por presença de substâncias ou pelo estiramento produzido pelo conteúdo luminal tendo assim uma comunicação entre intestino e cérebro (ZHENG; BERTHOUD, 2008).

Dentre os sinais provenientes do trato gastrointestinal estão grelina, orexina e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1). A grelina é produzida principalmente por células Gr do TGI e em menores quantidades em rins, placenta, coração além do SNC (ZHENG; BERTHOUD, 2008). Suas funções estão relacionadas ao estímulo da liberação do hormônio do crescimento – GH por células somatotróficas da

hipófise anterior além de serem capazes de estimular NPY e AgRP e inibir  $\alpha$  – MSH (KORBONITS; GROSSMAN, 2004).

Quanto as orexinas ou hipocretinas são neuropeptídeos expressos por uma população específicas de neurônios na área hipotalâmica lateral (LHA) relacionada a alimentação, excitação e comportamento (CHEMELLI et al., 1999). Possuem ações motivadas por receptores tipo 1 (OX1-R) e tipo 2 (OX2-R) ambos acoplados a proteína G. Sendo o tipo 2 predominante em áreas cerebrais envolvidas no controle alimentar. As orexinas também agem estimulando a ingestão alimentar, a leptina suprimem a transcrição do RNAm da orexina (YAMANAKA et al., 2003).

O GLP1 também envolvido no balanço energético e produzido nas células L em intestino delgado e no colon distal, possuem suas respostas vindas com a ingestão de alimentos com capacidade para promover a saciedade (WILLIAMS; BASKIN; SCHWARTZ, 2006; DALLINGA-THIE; NIEUWDORP, 2015).

## **2.8 Influencia Da Leucina no Comportamento Alimentar**

Os efeitos metabólicos dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) – leucina, valina e isoleucina – têm recebido muita atenção no decorrer dos anos e, em especial, a leucina é descrita como nutriente sinalizador de ação direta em adipócitos.

Diversos são os efeitos da leucina, é conhecida por atuar estimulando a secreção de insulina, glucagon, hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), atua na regulação da síntese protéica no TAB. Também exercem seus efeitos em síntese protéica nos adipócitos por envolver ativação do mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos). Ativado o mTORC1 provavelmente seja essencial na diferenciação de pré-adipócitos, na morfogênese do TAB, hipertrofia e por secretar leptina. Funções essas, provavelmente, reguladas por leucina (TORRES-LEAL et al., 2011).

O estímulo à via de sinalização do complexo mTORC1 parece atuar em relações como redução do consumo de energia e peso corporal provocadas por suplementação com leucina. Os efeitos da leucina no comportamento alimentar por esta via foram estudados por Cota et al. (2006), em que foi administrado leucina ICV e foi verificado supressão na ingestão alimentar de ratos.

O mTORC1 também pode integrar sinais de favoráveis a energia celular junto a sinais hormonais em neurônios específicos e assim controlar ingestão de alimentos. Isso é mostrado por Cota et al. (2006) onde a leucina é capaz de inibir o apetite por ativação de via mTOR-S6K no MBH. Além disso, foi visto que quando administrado junto à rapamicina que inibe a mTOR onde foi bloqueado os efeitos anorexigênicos deste aminoácido.

Em seu estudo BLOUET et al. (2009) mostra que a leucina leva a um comportamento anoréxico por ativar neurônios POMC no MDH. Essa regulação leva a envio de estímulos a neurônios que expressam ocitocina no PVN capazes de inibir ingestão alimentar pelos sinais de saciedade que são enviados para o NTS.

Analisando os efeitos da leucina em hamsters em uma relação entre ingestão alimentar e peso corporal por administração oral na água de beber ou por gavagem, Koch et al. (2013) não encontra efeito em ingestão de ração ou e ganho de peso. Porém quando feito infusão de leucina ICV é observado efeitos catabólicos na ingestão alimentar e peso corporal.

A explicação que se tem para os efeitos da suplementação com leucina sobre o consumo alimentar provavelmente esteja relacionada com a via de administração do aminoácido. Em que quando diretamente no cérebro há uma melhor ultrapassagem da barreira hematoencefálica quando comparado a administração na dieta ou água (ZAMPIERI et al., 2014).

Uma suplementação com leucina ajuda a melhorar o metabolismo da glicose e do colesterol. Sendo também capaz de reduzir a resistência a insulina (MACOTELO et al., 2011). Além de influenciar na diminuição das concentração de colesterol total, e apresentar ações antioxidantes (ZHANG et al., 2007).. Porém apesar desses achados, não há estudos que relatem a influencia da suplementação com leucina na síndrome de Cushing.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito da suplementação com leucina em modelo síndrome de *Cushing* sobre o estresse oxidativo hepático e o metabolismo lipídico.

#### **3.2 Especifico**

##### **Estudo 1:**

- Caracterizar a síndrome no modelo experimental com parâmetros de determinação: da massa corporal, do consumo de ração, e da massa dos seguintes órgão e tecidos: tecido adiposo epididimário, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo mesentérico, e adrenais;
- Avaliar pressão arterial em ratos com SC
- Avaliar tolerância a glicose e insulina
- Determinar concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total, HDL-c, albumina e glicose;

##### **Estudo 2:**

- Avaliar a influência da suplementação com leucina em modelo experimental de síndrome de *Cushing* sobre o:
  - Estresse oxidativo hepático;
  - Metabolismo lipídico;
  - Variáveis plasmáticas – ALT e AST
  - Concentrações de TAG hepático
  - Determinar concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total, HDL-c, albumina e glicose;

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados seguiram os princípios éticos de experimentação animal e segue as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí e aprovada com protocolo N° 314/17.

### 4.2 Animais

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, adulto-jovem com peso entre 250-300g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em sala sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa de  $55 \pm 10\%$  e foto período de 12 horas no claro e 12 horas no escuro (luzes acesas às 8 horas da manhã). Foram utilizadas caixas de polipropileno, forradas com maravalha, com livre acesso a água e a ração para roedores (Presence<sup>®</sup>, Paulínea-SP).

### 4.3 Eutanásia

Ao fim de cada um dos experimentos foi feita a eutanásia dos animais com injeção intraperitoneal de solução de tiopental sódico - 100 mg/kg de massa corporal (m.c), misturada com lidocaína (10 mg/mL) via intraperitoneal.

### 4.4 Drogas e Reagentes

O Decadronal (Decadronal<sup>®</sup>, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, Guarulhos, SP, Brasil) apresenta em sua composição a dexametasona na forma de acetato, e de atuação prolongada, porém com início imediato. Além da dexametasona foram utilizadas as seguintes substâncias: ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), Tiopental sódico (Thiopentax<sup>®</sup>, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, SP, Brasil); Cloridrato de lidocaína (Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda, Anápolis, Goiás, Brasil); Insulina (Humulin<sup>®</sup>, Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil); Glicose 50% (Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil).

## 5.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ESTUDO 1

O estudo 1 foi realizado com o objetivo de caracterizar a melhor dose de dexametasona que induzisse a síndrome de *Cushing*. Para isso os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: Grupo Veículo - que recebeu NaCl 0,9%, (n=5) e Grupos DEXA (n=5) que receberam dexametasona via intraperitoneal nas doses (0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/kg) de massa corporal (m.c), respectivamente.

Para todos os grupos o tratamento teve duração de quatro semanas com frequência de aplicação de salina ou dexametasona quatro vezes por semana (segundas, terças, quintas e sextas-feiras). O tratamento se realizou sempre no mesmo horário (12:00h), com variação de  $\pm$  30 minutos. A massa corporal e o consumo de ração foram monitorados 3x por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), com auxílio de uma balança digital de precisão com escala 0,1g. Na quarta semana, todos os grupos foram submetidos aos testes de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) e testes de tolerância à insulina intraperitoneal (TTlip) como descritos adiante (Figura 11).

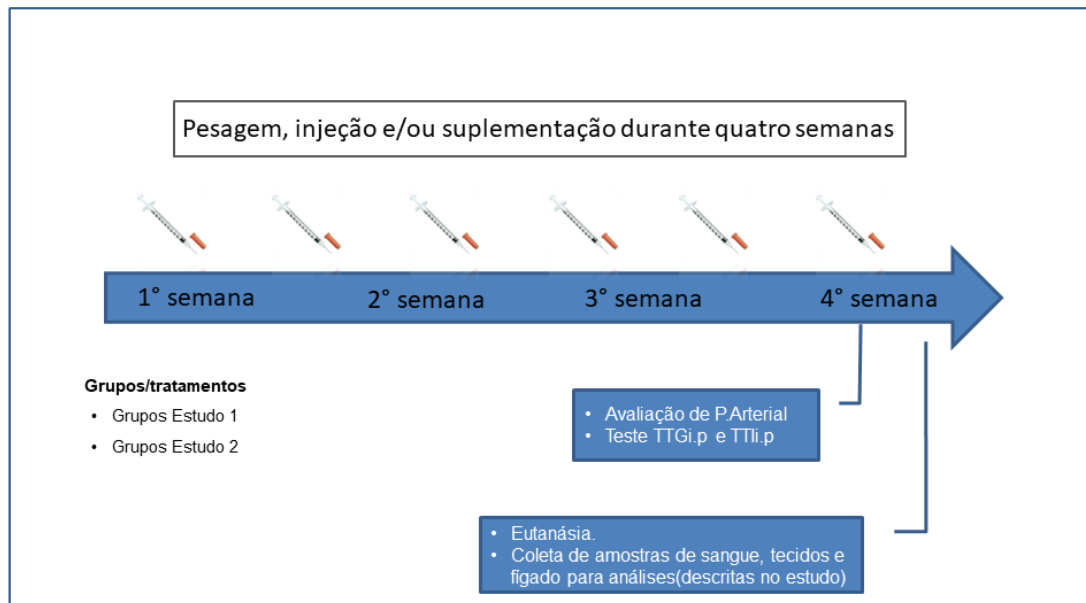
A dose que caracterizou a SC foi determinada por meio de estudo piloto seguindo dados da literatura que mostram trabalhos com uso de dexametasona (CHIMIN et al., 2014). Por outro lado, inicialmente havíamos testado doses menores e em menor frequência e não conseguimos caracterizar a SC.

Os aminoácidos de cadeia ramificada são degradados no músculo esquelético. Apresenta vários aspectos sobre o papel metabólico e fisiológico na hipertrofia muscular no metabolismo atuando como substrato para síntese protéica, como substrato energético e também como sinalizador. A leucina também desempenha diversos papéis metabólicos cuja funcionalidade é em proporção com a concentração celular que é dependente da ingestão dietética e do aumento da concentração de leucina no tecido (LAYMAN; BAUM, 2004). Por ser um aminoácido cujos efeitos são doses dependentes as quatro semanas de tratamentos do estudo seria o necessário para os efeitos da leucina surgirem no organismo.

A literatura mostra que a leucina desempenha seus efeitos no organismo por meio do processo de síntese protéica, ressalta ainda que em ratos e seres humanos saudáveis, a suplementação com leucina é capaz de promover aumento na síntese protéica muscular possuindo, portanto, propriedades anti-catabólicas (ZANCHI et

al., 2012). Sendo que seus efeitos demonstram ser tempo dependente (BOHÉ et al., 2001). Estas observações sugerem que não só o uso crônico, mas também o uso repetido de leucina promova melhor resposta ao organismo.

**Figura 11: Esquema representativo dos procedimentos realizados nos estudos 1 e 2**



**Legenda:** Tratamento realizado durante as quatro semanas, com aplicação de dexametasona em quatro dias da semana (segundas, terças, quintas e sextas-feiras) e verificação de consumo de ração e água em três dias (segundas, quartas e sextas-feiras). Na quarta semana de tratamento foi realizado os testes de verificação de pressão arterial, teste de tolerância a glicose e tolerância à insulina. Ao finalizar a quarta semana foi realizada a eutanásia e coletado o sangue dos animais, os tecidos – epididimal, mesentérico e retroperitoneal, adrenais e amostras do fígado para análises bioquímicas e de estresse oxidativo.

Para a eutanásia, os animais foram mantidos em jejum de 08 horas. A ração foi removida por volta das 06:00 horas e a eutanásia às 14:00 horas. Para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e a morte dos animais a ordem desta foi rotativa em relação aos grupos, ou seja, um animal de cada grupo era eutanasiados até que se repetisse o mesmo grupo. Dessa forma, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum.

Após eutanasiados, o sangue foi coletado em um tubo, sem anticoagulante, para obtenção da porção sérica do sangue. Em média seis animais foram sacrificados por dia. Após centrifugação foram separadas as porções séricas de cada tubo e armazenados em microtubos de 1,5 mL. Procurou-se colocar em cada

microtubo uma quantidade necessária para uma única análise e assim evitar que as amostras fossem congeladas e recongeladas.

Logo após a coleta de sangue foi realizado laparotomia mediana e retirado fígado e tecidos adiposos (epididimal, retroperitoneal e mesentérico). As glândulas adrenais também foram dissecadas e pesadas. Esses órgãos citados foram pesados, e pequenos fragmentos do fígado foram armazenados em microtubos e posteriormente mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  juntamente com as amostras de soro.

### **5.1 Avaliação do consumo de ração e de água:**

A mensuração do consumo de ração (estudo 1 e 2) e água (estudo 2) foi obtida pela diferença da ração ou água ofertada subtraída do total remanescente (não consumida). A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. Sendo que a quantidade média de ração ou água consumida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração consumida por gaiola pelo número de animais nela existente. Esse procedimento foi realizado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), o fornecimento se dava sempre nos mesmos horários (Figura 11). Há trabalhos que mostram que esse tipo de avaliação é eficaz onde os resultados desse procedimento são equivalentes aos obtidos com animais que foram colocados em gaiolas metabólicas, após normalização por peso corporal e número de animais por caixa (RAFACHO et al., 2011; NUNES et al., 2013).

Os resultados de consumo acumulado de ração e água foram calculados semanalmente onde foram somados os valores dos três dias de forma crescente.

Exemplo:

- Consumo de segunda-feira = X
- Consumo de quarta-feira = Y
- Consumo de sexta-feira = Z
- SOMA:  $X + (X+Y) + (X+Y+Z) =$  Consumo Semanal Acumulado

A ingestão de água foi acompanhada pela medida da diferença de água ofertada pela consumida. A diferença representa o consumo por gaiola e para



cálculo da média por animal foi dividido o consumo pelo número de animais existentes em cada caixa. A oferta de água se dava sempre nos mesmos dias (segundas, quartas e sextas-feiras) e horário (12h00min horas). A partir do consumo de água foi calculado o consumo de leucina como descrito a seguir:

$\frac{1 \text{ litro de água}}{\text{Água consumida}} = \frac{\text{quantidade X de leucina}}{\text{leucina consumida}}$
---

### 5.2 Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal (TTGip)

O TTGip realizado no estudo 1 teve como o objetivo avaliar se os tratamentos com dexametasona poderia alterar a homeostase glicêmica dos animais. Para a realização do protocolo, os animais foram mantidos em jejum de 8 horas, e em seguida foram submetidos ao TTGip (RAFACHO et al., 2008a). Imediatamente após a coleta de sangue da veia caudal para mensuração de glicemia “baseline 0”, foi realizado administração de solução de glicose a 50% (200 mg/100g de p.c.) por via intraperitoneal. Após a administração da glicose foram colhidas amostras de sangue da veia caudal nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos, para avaliação da glicemia, a qual foi determinada por meio de fitas reativas e glicosímetro (*On Call Plus, Acon Laboratories Inc.*). A curva glicêmica foi determinada pelas médias das medidas de glicemia. A partir desses valores calculou-se a área sob a curva (AUC) (NAGAJYOTHI et al., 2013).

### 5.3 Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTIip):

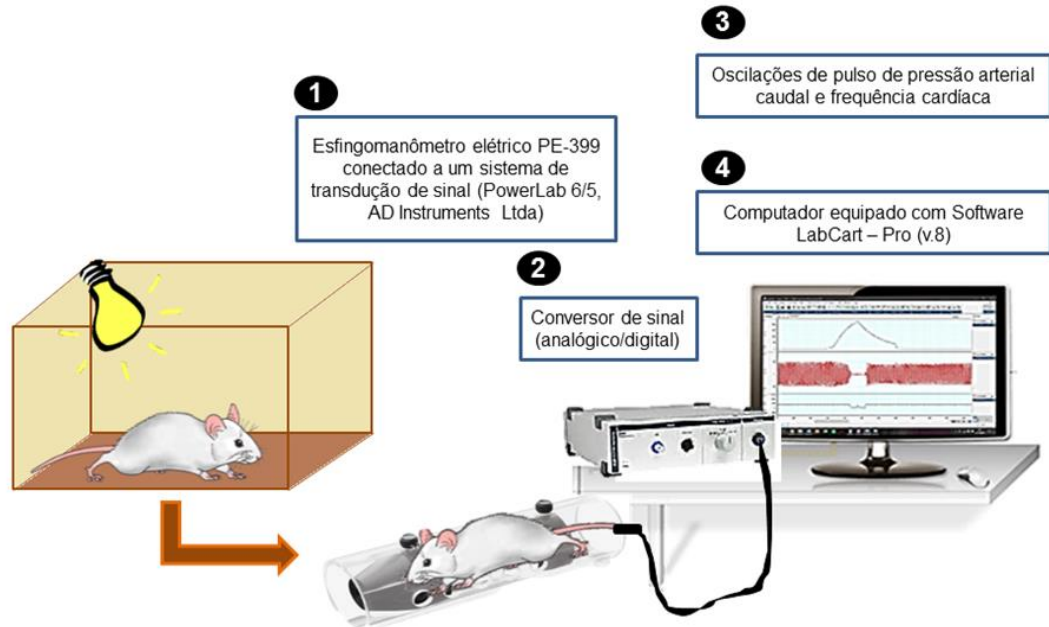
O TTIip foi realizado 72 horas após o TTGip. Os animais tiveram um jejum prévio de 8 horas (RAFACHO et al., 2009), com início às 06 da manhã. A glicemia basal foi determinada com uso de fitas reativas e glicosímetro (*On Call Plus, Acon Laboratories Inc.*), seguido da administração intraperitoneal de solução de insulina regular (2 U/kg p.c.) diluída em salina e após isso foi coletado pela veia cauda do animal amostras de sangue nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos para avaliação da glicemia (RODRIGUES et al., 2014). A constante de decaimento da glicose (kitt) foi calculado pela fórmula  $0,693/t_{1/2}$ , onde  $t_{1/2}$  é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de

decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos 5 a 60 minutos após infusão de insulina. Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior a sensibilidade a insulina (BONORA et al., 1989).

#### **5.4 Avaliação indireta da pressão arterial (PA) através de plestimografia de cauda**

A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda foi realizada na quarta semana de tratamento nos grupos veículo e dexametasona 1,0mg/kg m.c. O método utilizado para verificar a PAS indireta dos animais foi o proposto por Magaldi (1944). Inicialmente, os animais passaram por um período de adaptação por 5 dias em um contensor cilíndrico, a fim de minimizar possíveis variações pressóricas ocasionadas pelo estresse. Este procedimento foi realizado uma vez ao dia durante cinco dias para adaptar o animal ao ambiente propício para aferição da pressão caudal. Após o procedimento de adaptação foram iniciados os protocolos para determinação dos níveis PAS dos animais. Para isso os ratos foram aquecidos por 10 minutos em caixa de madeira contendo uma lâmpada de 150 watts para promover dilatação da artéria caudal e facilitar a medida da PAS e posteriormente colocados no cilindro de contenção. Um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-399 conectado a um sistema de transdução de sinal (PowerLab 4/S, ADInstrument Pty Ltda) e este, estava ligado a um computador contendo um programa adequado para análise desse sinal (LabChart 7 Pro - ADInstruments Pty Ltda). Após o início de aferição da PAS através da artéria caudal dos animais, os mesmos foram monitorados e tiveram a pressão definida através da média aritmética realizada após três medidas sequenciais, feitas no intervalo de dois em dois minutos (figura 12).

**Figura 12:** Ilustração do sistema de pletismografia de cauda utilizado.



Fonte: Adaptado e modificado de Silva, 2017.

### 5.5 Análises bioquímicas:

Foram analisadas as concentrações sérica de glicose, triacilglicerol (TAG), lipoproteína de alta densidade (HDLc), de baixa densidade (LDLc), colesterol total, albumina, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) utilizando kits comerciais (Glicose HK liquiform, Triglicérides liquiform, HDL, albumina labtest diagnóstica, ALT/TGP liquiform, AST/TGO liquiform – Labtest diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) no equipamento automatizado LabMax PLENNO (LABTEST DIAGNÓSTICA, LAGOA SANTA-MG-BRASIL). Todas as concentrações foram expressas em mg/dL.

### 6.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ESTUDO 2:

No estudo 2 os animais foram distribuídos aleatoriamente em 05 grupos: Veículo, DEXA, e DEXA + Leucina em três concentrações (0,5g de leucina/litro, 1,0 g de leucina/litro e 1,5 g de leucina/litro). Os lotes do aminoácido L-leucina, foram gentilmente doados pela empresa Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil. O tratamento durou quatro semanas sendo que para o grupo

veículo utilizou-se NaCl 0,9% e os demais grupos receberam dexametasona na dose 1,0 mg/kg de m.c já que esta foi a dose que melhor caracterizou a SC, sendo que três grupos receberam dexametasona acompanhado da suplementação com leucina nas doses citadas acima. As variáveis massa corporal, consumo de ração e de água seguiram o mesmo padrão de monitoramento mostrado ESTUDO 1 (Figura 11).

Ao final da quarta semana, os animais foram eutanasiados, seguido de laparotomia para a dissecação dos tecidos (fígado, adrenais, tecidos adiposos – epididimal, retro peritoneal e mesentérico). A partir das amostras coletadas de fígado foram desenvolvido as mesmas análises realizadas no ESTUDO 1, além das atividade enzimáticas relacionadas ao estresse oxidativo, expressão gênica, bem como das análises bioquímicas – TAG, ALT e AST.

### **6.1 Avaliações do Conteúdo de Triglicerídeos Hepáticos:**

Para determinação da gordura hepática, 100 mg de fígado foram transferidas para tubos de 10 mL contendo NaCl (1M) e homogeneizados em ultraturrax. Posteriormente foi adicionado clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 min. Formou-se 3 fases e a fase inferior (metanólica) foi retirada para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspendida em TritonX100/Metanol (2:1) e agitada. Logo após, foi realizada a dosagem do triacilglicerol por método enzimático colorimétrico de acordo com instruções do fabricante (*Triglicérides* Liquiform, *Labtest Diagnostica*, Lagoa Santa, MG, Brasil) (adaptado de Trinh et al., 1998).

### **6.2 Análise da expressão gênica**

O RNA total foi extraído a partir de alíquotas de cerca de 100 mg de tecido, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante. Para analisar as concentrações do RNA foi com determinação medindo a absorvância em comprimento de onda equivalente a 260nm/280nm em espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). O RNA total extraído do fígado foi armazenado a -80°C para posterior análise por RT-qPCR com Deoxiribonuclease I, DNase altamente purificada, para a remoção de DNA genômico.

Reação de transcrição reversa (RT) e RT- *qPCR* – as amostras de RNA total foram transcritas para DNA complementar (cDNA) em termociclador (Veriti®). Para síntese do cDNA foi utilizado 2 µg de RNA total na reação de cada amostra com *Randon primer*, utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Invitrogen no. 4375575) num volume final de 20 µl.

Em ciclo único foi efetuada a transcrição reversa em várias etapas como descritas: I) 10 minutos a 25 °C; II) 120 minutos a 37°C; III) 5 segundos a 85 °C; IV) com término a 4° C. Para a reação em cadeia polimerase – tempo real (*qPCR-RT*) – as concentrações de RNA mensageiro em genes de interesse foram estimadas, comparando as amostras e o controle interno (GPDH) em duplicatas, com base na detecção em tempo real de produtos do PCR medidos por fluorescência com quantificação com detector da sequência ABI ABI Prism 7300 (Applied Biosystems), seguindo a metodologia descrita por (BUSTIN, 2000).

Em condições de ciclagens – pré-determinadas – ocorreu a reação, em duas etapas: por 2 minutos em 50 °C e 95 °C por 10 minutos e a segunda com amplificação em 40 ciclos: desnaturação por 15 segundos a 95 °C e a 63 °C por 60 segundos o anelamento com extensão por 2 minutos a a 72 °C. Usando o banco de dados Genbank foi desenhado os primers. De forma prévia foi padronizado as concentrações de *primers* (200-800 nM) e amostra (50 ng de cDNA). Foram avaliados no fígado os seguintes genes do estresse oxidativo FATP2, SOD, CAT e NOX4.

### **6.3 Avaliação sobre marcadores de estresse oxidativo em tecido hepático – ESTUDO 2**

#### **6.3.1 Concentrações hepáticas de malondialdeído (MDA)**

As concentrações de MDA foram determinadas pela produção de substância reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com adaptações. Para isso, 200 µL de plasma, homogenato de fígado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 ou água destilada (branco) foram adicionados a 350 µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 0,5%. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria por

45 minutos a 100°C e posteriormente resfriada em banho de gelo durante 15 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se à mistura 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, centrifugando por 15 minutos a 12.000 rpm a 25°C.

A leitura do sobrenadante foi realizada nos comprimentos de onda de 532, 510 e 560 nm no espectrofotômetro e calculou-se a absorbância corrigida usando a fórmula proposta para minimizar a interferência dos pigmentos heme e da hemoglobina:  $ABS = 1,22 \times [A532 - (0,56 \times A510) + (0,44 \times A560)]$  (PYLES; STEJSKAL; EINZIG, 1993). Uma curva analítica de calibração foi preparada utilizando MDA como padrão, em concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 nmol/mL. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mL de plasma ou por g de homogenato.

### **6.3.2 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)**

A medida de atividade da MPO baseou-se na velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, realizada pela observação do aumento da absorbância da mistura a 450 nm (BRADLEY et al., 1982). A leitura foi realizada em microplaca ELISA por adição de 10 µL de solução de tecido hepático em 200 µL da solução de leitura, constituída com 27 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 3 mL de tampão fosfato pH 6,0, 15 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% e 5 mg de o-dianisidina. A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada pela observação do aumento da absorbância da mistura a 450 nm, obtendo-se leitura no tempo zero e após um minuto. A atividade da MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação, e o resultado expresso em unidade de MPO por microlitro (U MPO/µl) de amostra, sendo uma unidade de MPO definida como a quantidade em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **6.3.3 Avaliação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela enzima por meio do decréscimo da densidade óptica a 230 nm a 37°C. A CAT propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. O

meio de reação foi preparado utilizando 9 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 nM, 0,5 mL de tampão Tris HCl 1 M EDTA 5 mM pH8,0 e 0,4 mL de água Milli-Q. Para a reação, foram utilizados 7,5 µL do homogenato diluído em tampão fosfato de potássio e 250 µL do meio de reação. As amostras foram incubadas a 37°C e realizadas leituras das absorvâncias a cada minuto durante 6 minutos no leitor de placas automático modelo SynergyMx. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 37°C em pH 8,0.

#### **6.3.4 Avaliação da atividade da glutathiona reduzida hepática**

A atividade da enzima glutathiona foi determinada de acordo com o método descrito por Sies (1979). Para homogeneização do tecido utilizou-se – homogenato 10% em EDTA 0,02M. E foi adicionado 500mg de tecido + 5ml de EDTA 0,02M gelado. Para preparo da amostra utilizou-se 2ml de homogenato adicionado a 2ml de TCA a 10% que foi agitado por 30 segundos e centrifugado a 3000rpm (rotação por minuto) por 15 minutos. Após isso foi transferido para outro tubo 1ml do sobrenadante mais 2ml de Tris 0,4M EDTA 0,2M pH 8,9.

Para leitura foi adicionado 50 ul de DTNB 0,01 M, o comprimento de onda foi ajustado para 412 nm e zerado com o branco (1ml de água + 2ml de tampão Triscom 50 ul de DTNB). Após ser colocado o DTNB, tampado o tudo que foi hogeneizado por inversão e limpo com lenço de papel foi realizado a leitura.

#### **6.3.5 Avaliação da atividade de superóxido dismutase (SOD) hepática**

A atividade da enzima foi determinada de acordo com o método descrito por McCord e Fridovich (1969), que verifica a produção de ânion superóxido produzido pela xantina oxidase na presença da xantina. Nesta reação o ânion superóxido produzido reduz o citocromo C e esta redução é medida pelo aumento da densidade óptica a 550 nm a 25° C. O meio de reação foi preparado com 4,96 mg de citocromo C, 2 mL de água MilliQ, 2 mL de Xantina 500 µM, 2 mL de EDTA 1 mM e 14 mL da solução tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Posteriormente, em uma placa de Elisa foram adicionados 10 µL do homogenato, 7,5 µL de Xantina oxidase e 250 µL do meio de reação. O branco foi estabelecido com 7,5 µL de xantina oxidase e 250 µL do meio de reação. As leituras a cada minuto no período de 6 minutos foram

realizadas no leitor de placas automático modelo SynergyMx. A determinação foi feita em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Considerou-se uma unidade (U), a atividade da enzima que promoveu 50% de inibição da xantina a 25° C em pH 7,8.

#### **6.4 Análise Estatística:**

Os dados do estudo são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Antes de realizar a análise estatística, foi realizado teste de normalidade para testar se as amostras seguiam uma distribuição gaussiana. O teste de Shapiro-Wilks foi usado para um conjunto de amostras de  $n \leq 20$  e  $\geq 7$ , e o teste de Kolgomorov-Smirnof quando  $n \leq 6$ . Quando as populações analisadas apresentam distribuição normal, foram aplicados testes estatísticos paramétricos e, quando não passam no teste de normalidade, foram realizados testes estatísticos não paramétricos. Para comparações de duas populações, foram utilizados testes t de *student* não-pareado (bicaudal), como indicado nas legendas das figuras; para o teste de comparação múltipla, foi realizado um ANOVA one-way ou two-way, seguido do teste de comparação múltipla *post hoc* de Newman-Keuls (one-way) e de Dunnett's ou de Bonferroni (TTGip e TTlip). Em todas as análises, uma diferença estatisticamente significativa foi considerada a partir da probabilidade  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism versão 7.0 a (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).



## 7 RESULTADOS

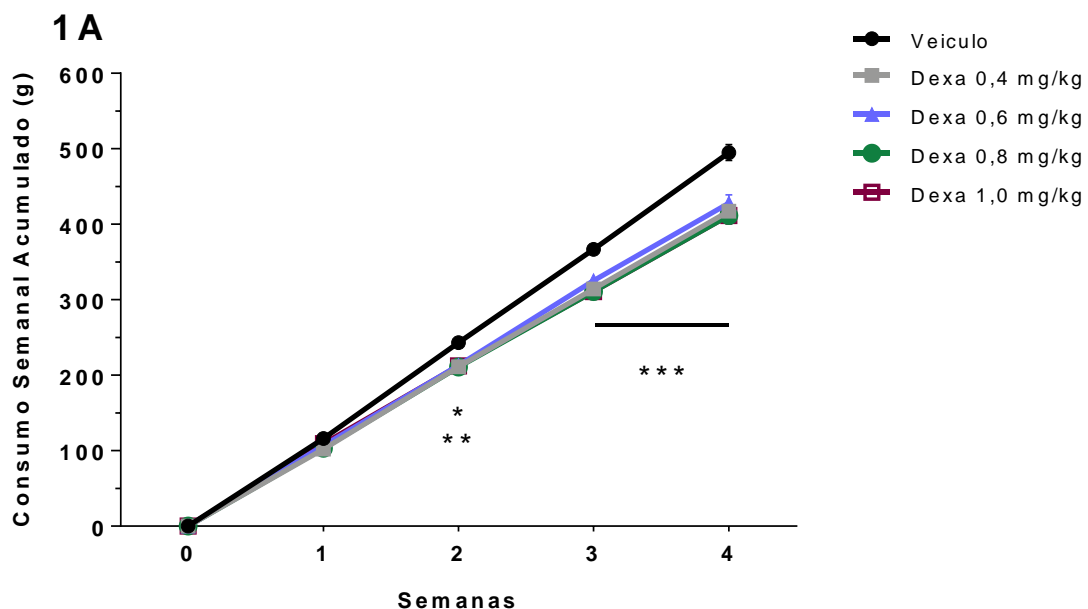
### Estudo 1

No presente trabalho avaliamos diferentes grupos a fim de encontrar a dose que melhor caracterizasse a SC. Após análises dos resultados vimos que alguns grupos não apresentaram diferenças significativas quando comparados com grupo veículo em várias análises mostrando que esses animais não apresentaram a SC. Os resultados referentes a esses grupos estão mostrados como anexo no final do trabalho.

#### 7.1 Avaliação do consumo semanal acumulado de ração dos animais

Ao longo das quatro semanas de tratamento observamos o consumo semanal acumulado dos animais (Figura 13), onde é visto que animais que receberam administração de DEXA apresentaram menor consumo alimentar a partir da segunda semana de tratamento quando comparados ao grupo veículo.

**Figura 13:** Efeitos crônicos da DEXA sobre o consumo alimentar acumulado de ratos em quatro semanas de tratamento

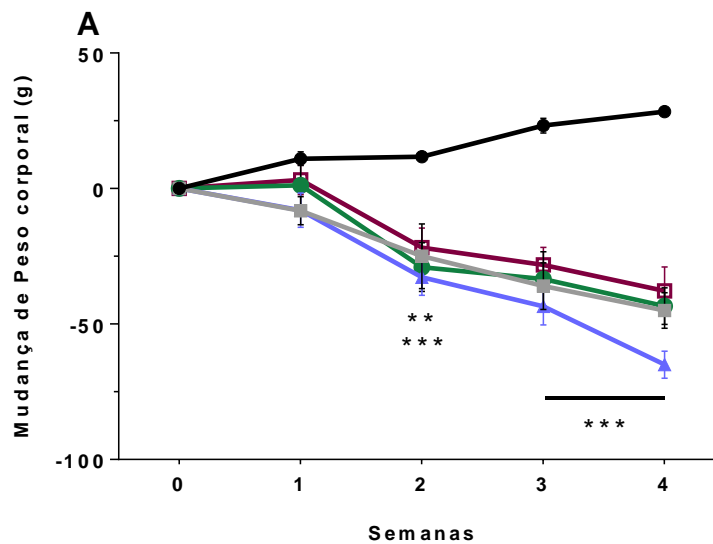


**Legenda:** Efeitos crônicos da DEXA sobre o consumo alimentar acumulado de ratos. Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Sendo o  $n=5$  animais por grupo.

## 7.2 Resultados da análise de massa corporal dos grupos e análise da massa tecidual em animais tratados com DEXA na dose de 1,0mg/kg

Com relação à mensuração da massa corporal é visto que enquanto o grupo veículo manteve ganho de peso corporal durante todo o tratamento, os animais das diferentes doses de DEXA apresentaram redução da massa corporal, a partir da primeira semana, perdurando até o final do tratamento (Figura 14).

**Figura 14:** Efeitos crônicos da DEXA sobre a massa corporal dos ratos em quatro semanas de tratamento.



**Legenda: Efeitos crônicos da DEXA sobre o peso corporal dos ratos.** Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Sendo o  $n=5$  animais por grupo.

No presente trabalho observa-se (Tabela 1) redução significativa da massa da adrenal no grupo dexta 1,0 mg/kg e maior adiposidade nos coxins adiposos epididimal e mesentérico, bem como na soma de todos os depósitos adiposos avaliados quando comparados ao grupo veículo.

**Tabela 1:** Efeitos crônicos da DEXA 1,0mg/kg sobre o peso de adrenais e tecidos gordurosos.

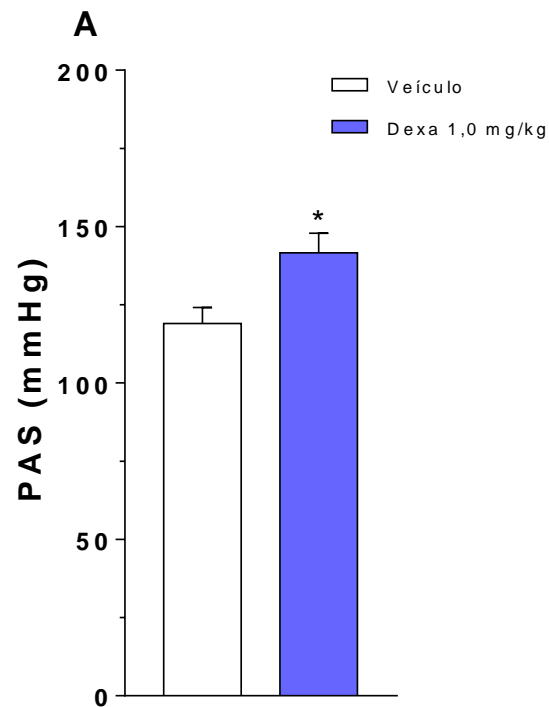
Grupos	Veículo	Dexa 1,0 mg/kg
Adrenal	0,0053± 0,00	0,0033 ±0,00***
TAB. R.P	0,695 ± 0,18	0,874 ± 0,31
TAB. EPID	1,236 ± 0,13	1,635 ± 0,15**
TAB. MES	0,685 ± 0,11	1,074 ± 0,15**
Adiposidade	2,61 ± 0,11	3,92 ± 0,35*

Média ± EPM (erro padrão da média) de 5 animais/grupo. Teste *t de student*. \* estatisticamente diferente do grupo veículo onde adrenal (p=0,0006), TAB. EPID. (p=0,002), TAB MES (p=0,0014) e Adiposidade (p=0,0152).

### 7.3 Tratamento com DEXA na dose 1,0mg/kg aumenta a pressão arterial

Os animais tratados com DEXA na dose de 1,0 mg/kg ( $142 \pm 6,27$ ) apresentaram valores significativamente mais elevados da pressão arterial sistólica quando comparados ao grupo veículo ( $119 \pm 5,07$ ) (Figura 15A), indicando quadro de hipertensão arterial sistólica.

**Figura 15:** Efeito crônico sobre a PAS de ratos tratados com DEXA



**Legenda:** Efeito crônico da DEXA sobre a PAS de ratos tratados com DEXA. Teste *t de student*. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p < 0,05$ . Sendo  $n=5$  animais por grupo.

#### 7.4 Determinações bioquímicas em animais tratados com DEXA na dose 1,0 mg/kg.

Foi avaliado (tabela 2) se a DEXA era capaz de comprometer o perfil lipídico dos animais, assim, observamos que os animais tratados com a dose 1,0 mg/kg quando comparados ao grupo veículo apresentaram maiores concentrações de triglicerídeos, colesterol total e HDL. Além destes, verificamos um efeito decorrente do excesso de DEXA que é o aumento da albumina sérica.

**Tabela 2:** Valores de parâmetros avaliados em concentrações plasmáticas sanguíneas de ratos tratados com DEXA

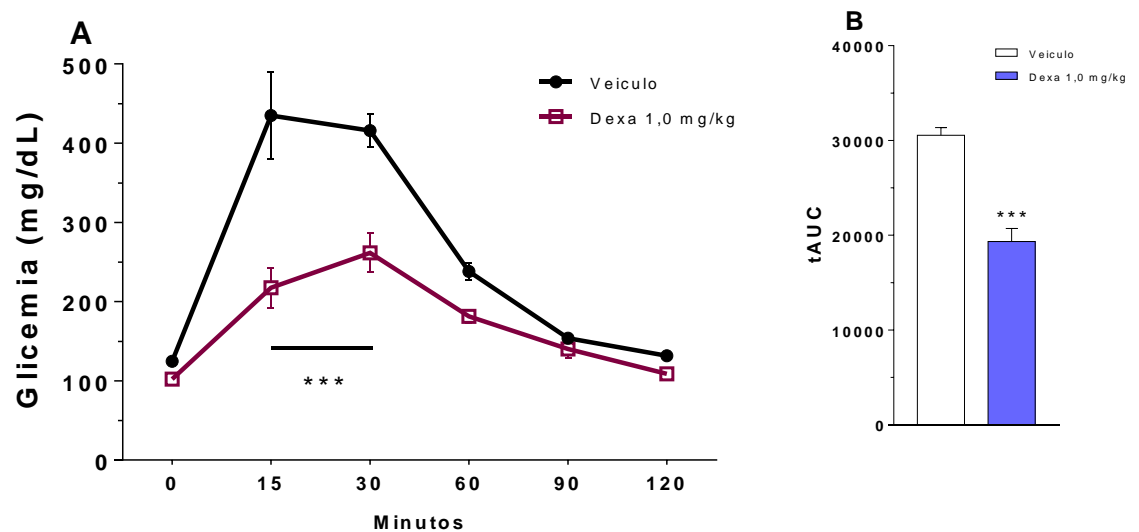
Grupos	Veículo	Dexa 1,0 mg/kg
TG	102,41± 31,67	141±29,31*
COL	51 ± 6,52	71,4 ± 9,45*
ALB	1,99 ± 0,15	2,33 ± 0,24*
GLI	126,8 ± 4,09	148,5 ± 12,77
HDL	16,4 ± 2,19	26,4 ± 5,37*
Fração não HDL	12,56 ± 6,33	20,48 ±5,83

Média ± EPM (erro padrão da média) de 5 animais/grupo. Teste *t de student*. \* Estatisticamente diferente de grupo Veículo com TG (p=0,0365), COL (p=0,0497), ALB (p=0,0273) e HDL (p=0,0021).

## 7.5 Efeito da DEXA sobre a tolerância à glicose e à insulina em animais tratados com DEXA na dose 1,0mg/kg

Para verificar se os animais estavam intolerantes à glicose e resistentes à insulina, - características do quadro de SC foram aplicados os testes de TTGip e TTlip nos animais. Houve diferença na área sob a curva entre os dois grupos no teste TTGip, indicando que os animais do grupo veículo estavam intolerante à glicose (Figura 16) ( $p < 0,05$ ).

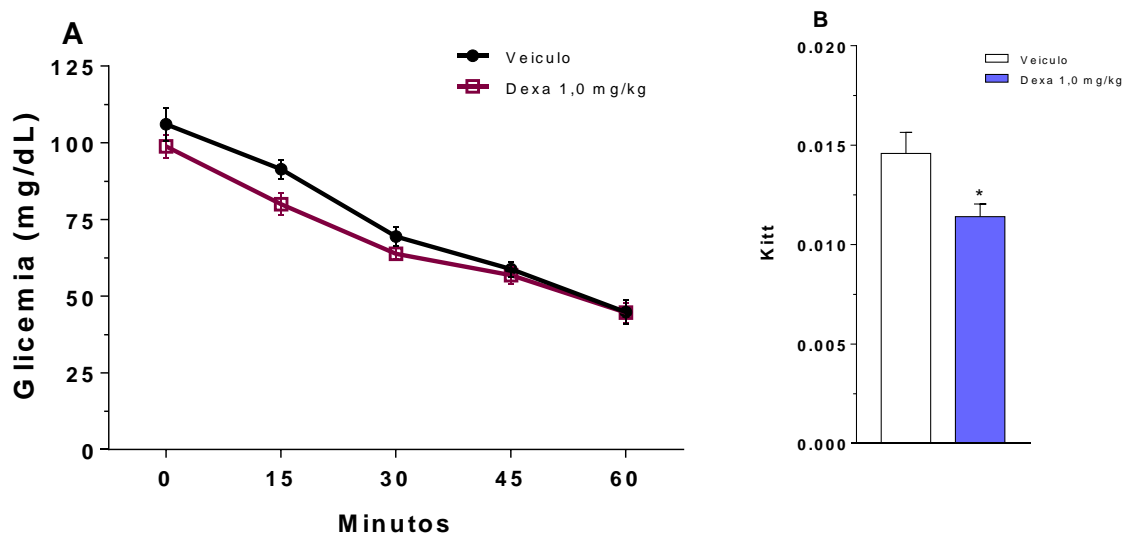
**Figura 16:** Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipTTG) e área total sob a curva (tAUC)



**Legenda: Efeitos crônicos da DEXA sobre a curva glicêmica e tAUC de ratos. (3A)** Curva glicêmica; **(3B)** Área total sob a curva (tAUC). \*\*\* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p < 0,001$ . Sendo (Gráfico 16A) com teste ANOVA two-way e (Gráfico 16B) teste *t de student*. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=05 animais por grupo).

Por outro lado, no que diz respeito ao TTlip nota-se que não houve diferença significativa entre os dois grupos durante os sessenta minutos do teste (Figura 17A). Porém quando avaliado à constante de decaimento de glicose (KITT), nota-se um quadro de resistência à insulina no grupo DEXA (Figura 17B). Isso provavelmente está associado à uma maior secreção de insulina e com isso aumentando a tolerância à glicose no TTGip.

**Figura 17:** Curva glicêmica do teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipTTI) e taxa de decaimento de glicose (kitt)



**Legenda:** Efeitos crônicos da DEXA sobre a curva glicêmica no teste de tolerância à insulina e taxa de decaimento de glicose (kitt) de ratos. (17A) Curva glicêmica; (17B) taxa de decaimento da glicose (kitt). \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p=0,05$ . Sendo (Gráfico 17A) com teste ANOVA two-way e (Gráfico 17B) teste *t de student*. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ( $n=05$  animais por grupo).

## **8 Estudo 2**

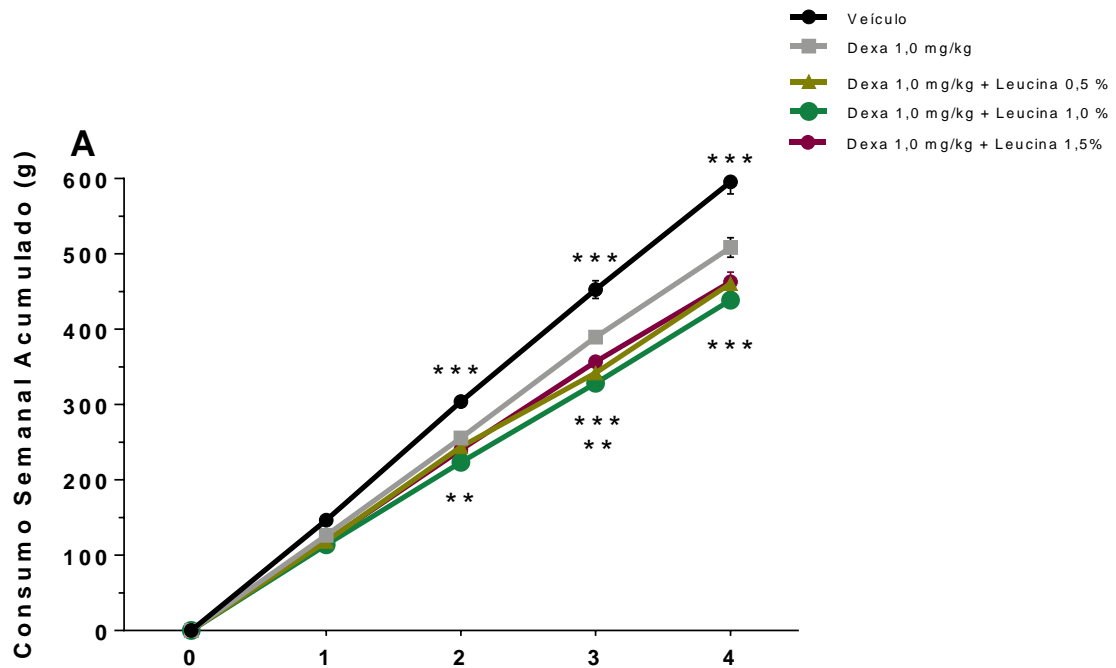
O estudo 2 procurou verificar quais os efeitos da administração de leucina em animais com SC conforme modelo experimental apresentado no estudo 1. Para isso constituímos 05 grupos experimentais sendo – grupo veículo, grupo DEXA 1,0 mg/kg, grupo DEXA 1,0mg/kg + leucina 0,5%, grupo DEXA 1,0 mg/kg + leucina 1,0%, grupo DEXA 1,0mg/kg + leucina 1,5%. No entanto, no decorrer das análises demonstramos que a leucina em doses maiores apresentou piores efeitos sobre a massa corporal, sendo essa variável determinante a escolha da menor dose de leucina nas futuras análises.

### **8.1 Avaliação de consumo semanal acumulado de ração e hídrico dos animais que receberam administração de leucina**

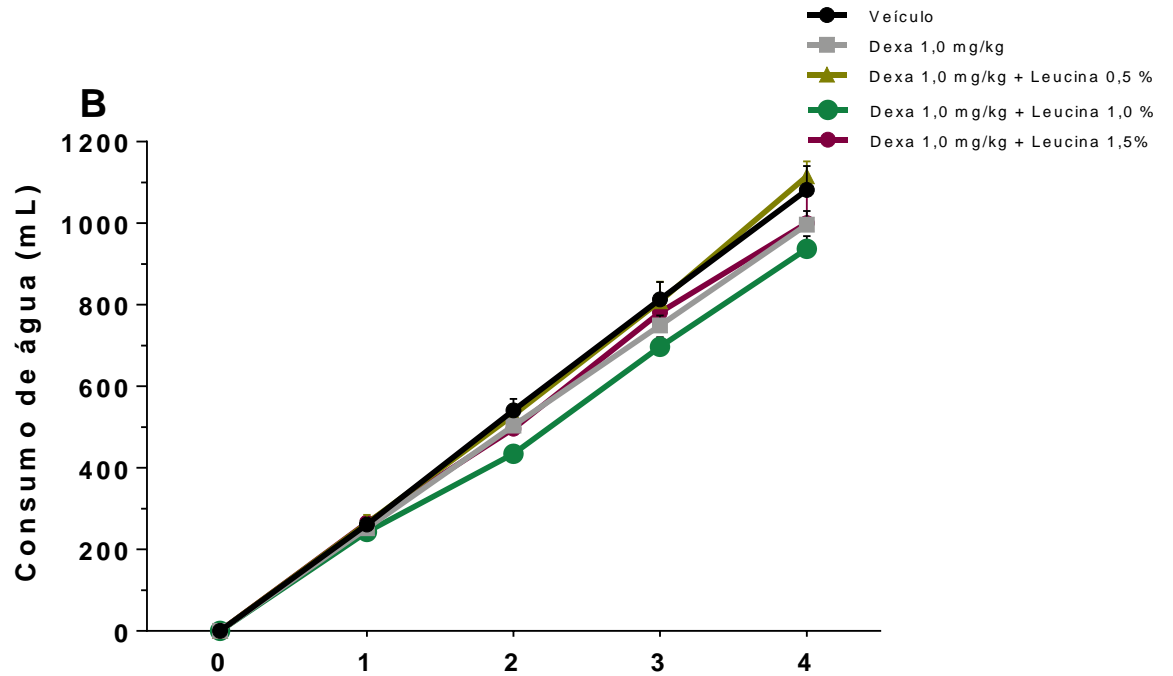
Com relação ao consumo semanal alimentar acumulado (Figura 18A) os animais que receberam administração de leucina apresentaram menor consumo alimentar quando comparados com grupo dexta 1,0mg/kg a partir da segunda semana, efeito esse mantido até a quarta semana de tratamento. Quanto ao consumo hídrico (Figura 18B) não houve diferenças significativas entre os grupos testados.



**Figura 18:** Efeitos da leucina sobre o consumo alimentar acumulado de ratos em quatro semanas de tratamento



**Legenda:** Efeitos crônicos da leucina sobre o consumo alimentar acumulado de ração em ratos com SC. Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Sendo o  $n = 7-10$  animais por grupo.

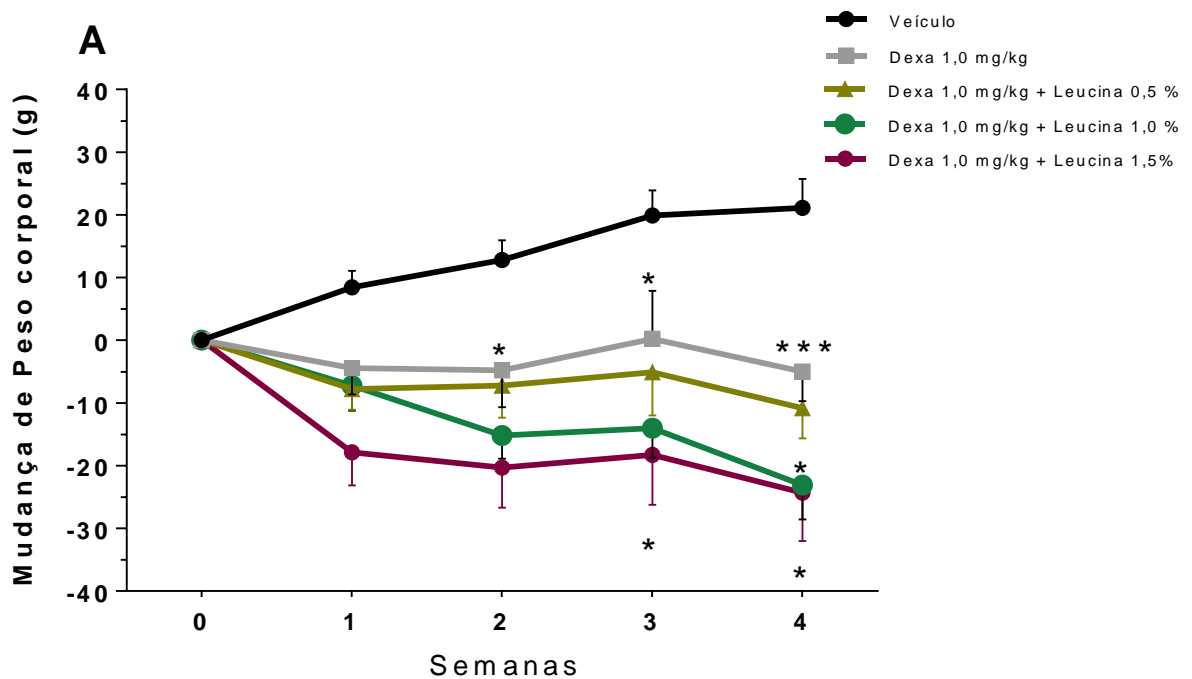
**Figura 18B:** Efeitos da leucina sobre o consumo hidrico de ratos com SC

**Legenda:** Efeitos da leucina sobre o consumo hídrico de ratos com SC. Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Sendo o  $n = 7-10$  animais por grupo.

## 8.2 Resultados da análise da massa corporal dos grupos e análise de massas teciduais em ratos suplementados com leucina

Nota-se que os animais com SC tratados com leucina (dose 1,0 e 1,5%) acentuaram ainda mais a redução da massa corporal a partir da segunda semana de tratamento, no entanto, a menor dose de leucina (dose 0,5%) foi à única dose testada a não favorecer tal efeito quando comparado com grupo veículo (Figura 18A).

**Figura 18:** Efeitos da leucina sobre o peso corporal dos ratos com SC



**Legenda: Efeitos da leucina sobre o peso corporal de ratos com SC.** Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Sendo o  $n = 10$  animais por grupo.

No nosso trabalho avaliamos a massa relativa das adrenais e tecidos gordurosos e a relação destes com a leucina. A partir dos nossos resultados, podemos destacar uma redução significativa em massa de adrenais nos grupos tratados com leucina quando comparados com grupo veículo. Nota-se também que a leucina agravou a adiposidade propiciando ao aumento de tecido adiposo epididimal, mesentérico e adiposidade (Tabela 3).

**Tabela 3:** Efeitos da leucina sobre a massa de adrenais e tecidos gordurosos de ratos com SC.

Grupos	Veículo	Dexa1,0mg/kg	Dexa+Leucina 0,5%	Dexa+Leucina 1,0%	Dexa+Leucina 1,5%
<b>Adrenal</b>	0,007± 0,0 <sup>@</sup>	0,0024± 0,0 <sup>***</sup>	0,0027± 0,0 <sup>*@</sup>	0,0035 ± 0,0 <sup>*</sup>	0,0034 ± 0,0 <sup>*</sup>
<b>TAB R.P</b>	0,76 ± 0,13	0,73 ± 0,22	0,84 ± 0,35	0,69±0,37	0,61±0,35
<b>TAB EPID</b>	1,36± 0,15 <sup>@</sup>	1,86 ± 0,12 <sup>**</sup>	1,95 ± 0,15 <sup>*@</sup>	1,96±0,44	2,02± 0,34
<b>TAB MÊS</b>	1,007±0,11 <sup>@</sup>	1,37 ± 0,14 <sup>*</sup>	1,67 ± 0,25 <sup>*@</sup>	1,75±0,32	1,77±0,23
<b>Adiposidade</b>	2,95 ± 0,34 <sup>@</sup>	3,60± 0,76 <sup>*</sup>	4,38 ± 0,58 <sup>*@</sup>	5,24±0,89	6,11±0,85

Variáveis de peso de adrenais e tecido adiposos. Teste ANOVA two-way com Tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média ± erro padrão da média. <sup>x</sup> = Variável não avaliada no grupo. \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com \*p<0,05. @: Estatisticamente diferente do grupo DEXA 1,0 mg/kg com p<0,05. Sendo n=7-10 animais por grupo.

### 8.3 Análise de determinações bioquímicas em animais tratados com leucina

As concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol, albumina e glicose foram analisadas no soro dos animais (Tabela 4). Nessas análises verificamos que a leucina à 0,5% levou a um quadro de hipertrigliceridemia, colesterolemia e albuminemia, além de aumento nos níveis de HDL (Tabela 4).

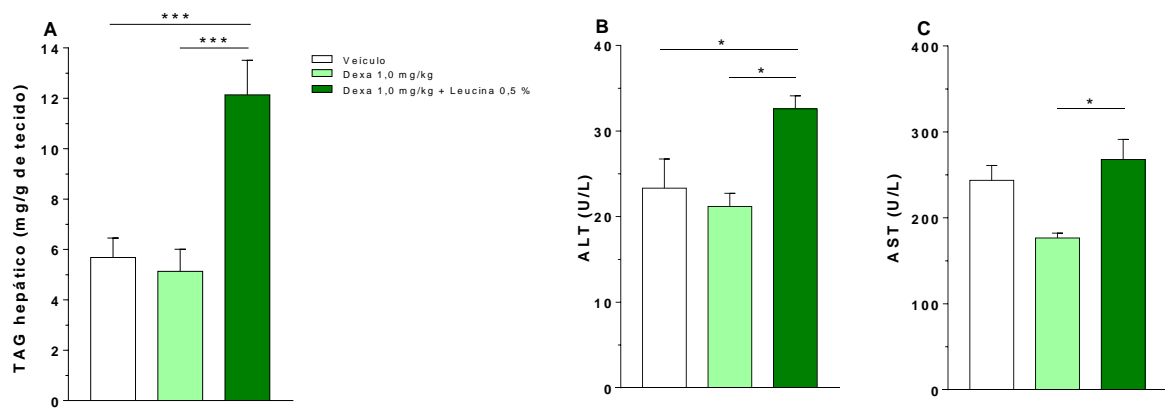
**Tabela 4:** Avaliação de concentrações bioquímicas plasmática de ratos com SC que receberam administração de leucina.

Grupos	Veículo	Dexa 1,0mg/kg	Dexa 1,0mg/kg + Leucina 0,5%
TG	92±10,39 <sup>@</sup>	132±20,61	132±20,02* <sup>@</sup>
COL	51±6,52	74,66±11,68	84,25±10,14* <sup>@</sup>
ALB	1,99±0,15 <sup>@</sup>	2,33±0,24*	2,80±0,20*
GLI	126,8±4,09	135,5±9,85	136,4±5,13
HDL	16,4±2,19	26,4±5,37	18,4±2,19*
Fração não HDL	22,04±6,07	29,4±6,97	28,3±6,63

**Concentrações bioquímicas plasmática de ratos com SC que receberam administração de leucina.** Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Dados expressos como média ± erro padrão da média. <sup>\*</sup> Estatisticamente diferente do grupo veículo com \*p<0,05. <sup>@</sup> Estatisticamente diferente do grupo dexa 1,0 mg/kg (m.c) com p<0,05. Sendo n=7-10 animais por grupo.

Ao analisar as concentrações de triglicerídeos hepático (Figura 21A) observa-se que a leucina favoreceu maior acúmulo de TAG nos hepatócitos e maior dano hepático observado a partir das maiores concentrações de ALT e AST (Figura 21 B e C, respectivamente).

**Figura 21:** Efeitos da leucina sobre as concentrações de TAG hepático e concentrações plasmáticas de ALT e AST

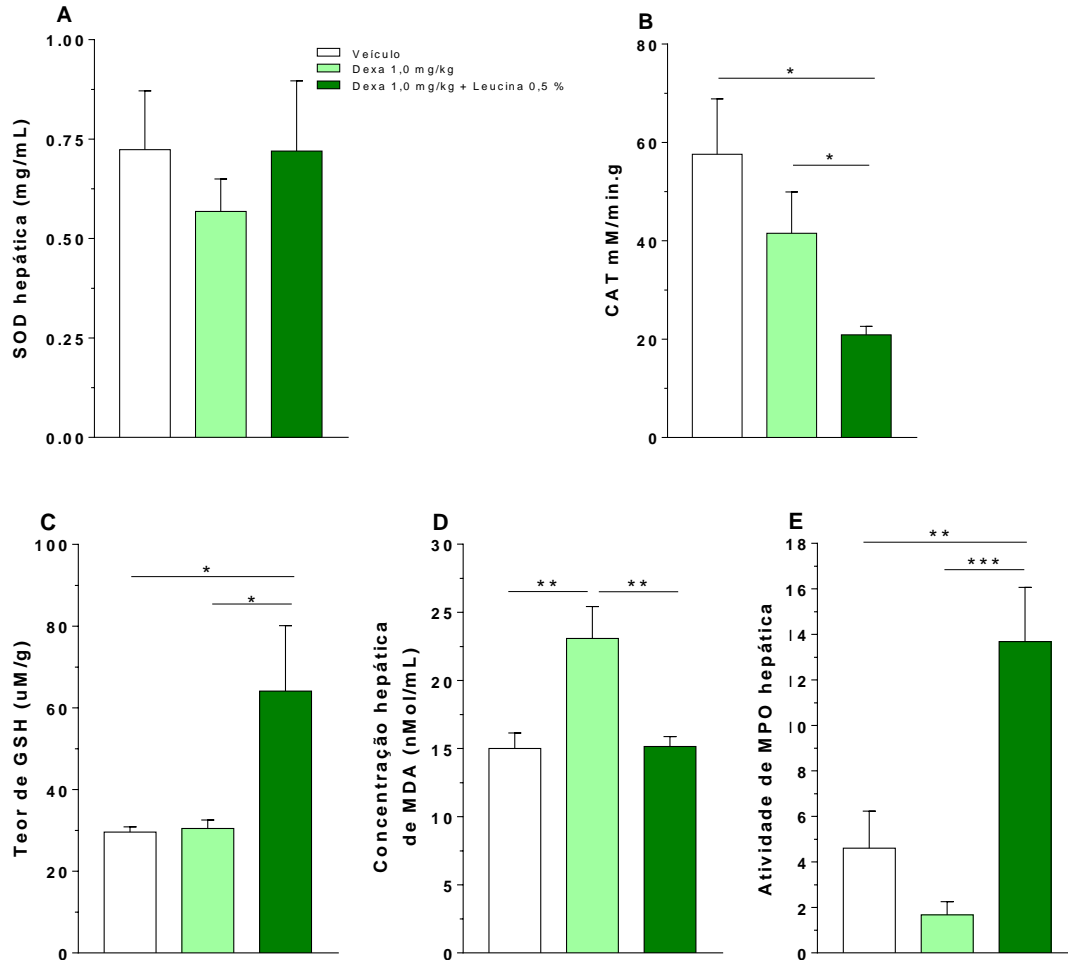


**Legenda:** Avaliação das concentrações de TAG hepáticos e concentrações de ALT e AST de ratos com SC que receberam administração de leucina. Figura 21 (A-C): realizados com Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Sendo 7A. (concentrações de triglicerídeos hepático, 21B (concentrações plasmáticas de ALT) e 21C (concentrações plasmáticas de AST). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $*p < 0,05$ . Sendo  $n = 7-10$  animais por grupo.

#### **8.4 Avaliação de estresse oxidativo e análise de expressão gênica em fígado**

Os resultados referentes às concentrações de SOD, CAT e MDA estão apresentados nas Figuras 22 A, B, e D, respectivamente. A leucina foi capaz de reduzir as concentrações hepáticas de malondialdeído (Figura 22D) um importante marcador de peroxidação lipídica. Ademais, verifica-se que a leucina favorece a menor formação de peróxido de hidrogênio a partir do baixo teor da enzima catalase (Figura 22B). Por outro lado, nota-se que a defesa antioxidante referente ao resultado de GSH encontra-se aumentada nos animais tratados com leucina (Figura 22C), possivelmente essa resposta seja decorrente da maior atividade da mieloperoxidase (MPO) hepática (Figura 22 E), uma condição adaptativa frente ao estresse.

**Figura 22:** Efeitos da leucina sobre estresse oxidativo de ratos com SC que receberam administração de leucina

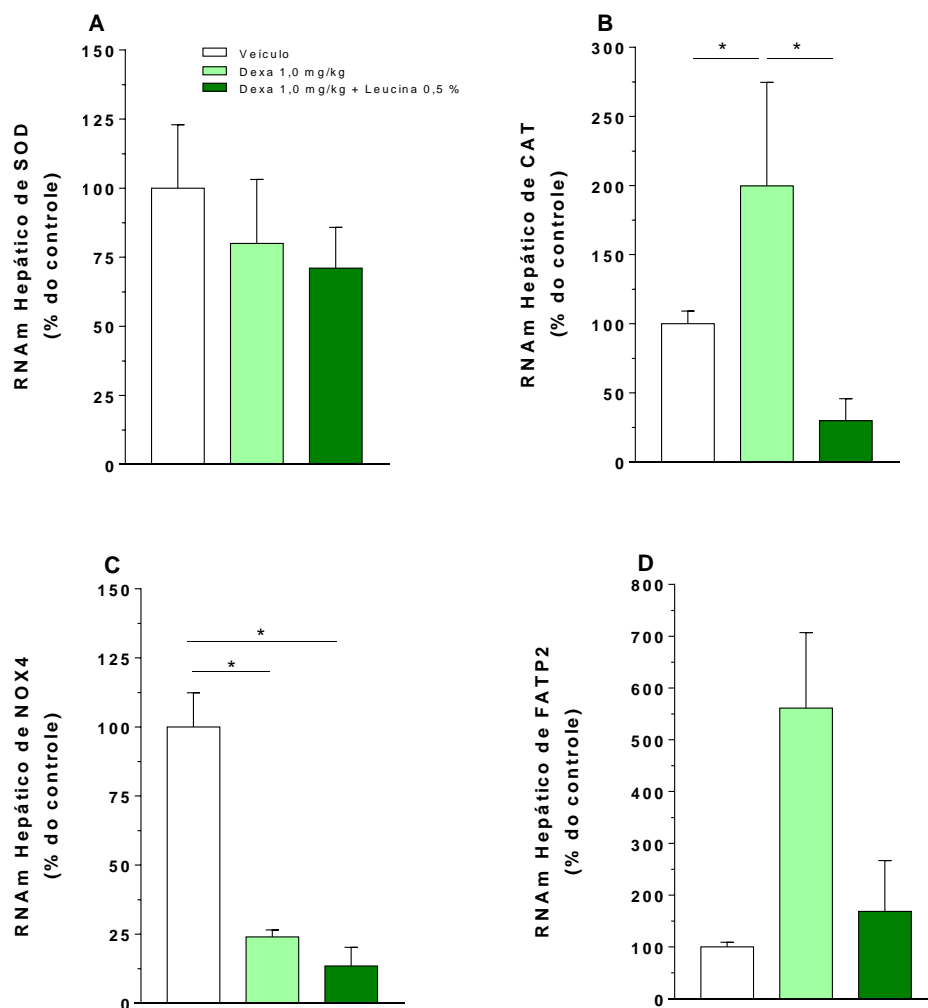


**Legenda: Avaliação de estresse oxidativo em ratos que receberam administração de leucina:** Figura 22: (a) teor de SOD, (b) CAT, (c) GSH, (d) concentração hepática de MDA, (e) atividade de MPO. Todos esses testes foram realizados com n=7 a 10 animais por grupo. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p = 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,001$ .



Ao analisar a expressão gênica em RNAm hepático nas enzimas SOD, CAT, NOX4 e FATP2 representados na Figura 23 A-D, respectivamente, observa-se que o grupo tratado com leucina favoreceu a redução dos valores de CAT e NOX4 quando comparados ao grupo veículo ou DEXA 1,0 mg/kg.

**Figura 23:** Análise de expressão gênica de RNAm em tecido hepático de ratos com SC que receberam administração de leucina



**Legenda:** Expressão gênica de RNAm em fígado de ratos com SC que receberam administração de leucina: (a) RNAm de SOD, (b) RNAm de CAT, (c) RNAm de FATP 2, (d) RNAm de NOX4. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Todos com n=7 a 8 animais por grupo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p < 0,05$ .

## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 Caracterização do modelo experimental

Ao certo, a DEXA – potente glicocorticoide sintético – pode levar alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, e atuar em outros tecidos sendo seus efeitos dependentes do tempo de tratamento e dose (RAFACHO et al., 2008). Devido a importância que é a SC e diante da ausência de estudos, até onde sabemos, a respeito dos efeitos da LEU, faz-se necessário conhecer os potenciais efeitos desse aminoácido no modelo experimental em estudo. No nosso trabalho a SC foi alcançada e dentre as diversas manifestações biológicas presentes encontramos um quadro de obesidade visceral, de hipertensão arterial, de atrofia das adrenais, e a presença de alterações bioquímicas com diminuição de triglicerídeos, colesterol total, albumina e VLDL. Estes efeitos foram acompanhados do menor massa corporal e consumo de ração e maior tolerância à insulina.

Observamos que animais tratados com DEXA apresentaram redução no massa corporal que, por sua vez, foi acompanhada pelo menor consumo de ração. Esses efeitos podem estar associados com redução nas concentrações de grelina e aumento das concentrações de leptina, - responsáveis por sensação de fome e de saciedade, respectivamente, contribuindo desse modo para a redução da massa corporal (BAREL et al., 2010; TONOLO et al., 1988).

Ao aumentar a concentração de leptina, esta somada à hiperinsulinemia inicia os sinais de saciedade no hipotálamo e ao interagirem entre si exercem efeitos complementares no controle central da fome (CHEN et al., 2006; MAO et al., 2011). Além do aumento circulante da leptina a inibição da atividade da grelina por GC apresenta relação direta com a redução do massa corporal (LEE et al., 2007). Outro aspecto que pode ser atribuído à redução do massa corporal é a atrofia muscular – efeito negativo do uso crônico da DEXA (MACEDO et al., 2014), acompanhado do aumento da proteólise muscular e inibição da síntese de proteínas e incremento da lipólise (SHAH et al., 2005; FRANCO-COLIN et al., 2000).

A atrofia das adrenais é um efeito clássico na SC que é decorrente do tratamento crônico com GC (CHIMIM et al., 2014). O tratamento com GC inibe o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, desse modo, o hipotálamo deixa de liberar o hormônio

liberador de corticotropina, responsável por sintetizar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), assim este não atua promovendo o trofismo celular sobre as adrenais, desse modo, acarretando na atrofia dessa glândula (RAFACHO et al., 2008).

Além dos efeitos anteriormente citados durante a SC o metabolismo dos hormônios insulina e glucagon são comprometidos. Esses são responsáveis por controlar a concentração intracelular de colesterol e, sendo alterados, conseqüentemente levariam ao aumento do colesterol e o desencadeamento da redução da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima limitante na biossíntese de colesterol (CHARLTON-MENYS; DURRINGTON, 2008).

Com o aumento do colesterol total ao certo haveria um aumento nos níveis de HDL-c, sendo importante ressaltar que apesar do incremento das concentrações de HDL-c (frequentemente tido como cardioprotetor), o mesmo deve ser observado com cautela, pois, também houve aumento em níveis de VLDL-c, o que neutraliza os efeitos benéficos do HDL-c (SIKORSKI, J. A, 2006). Como houve elevado níveis de colesterol e triglicerídeos, como forma de compensação do organismo é provável que o aumento na albumina tenha sido conseqüente a isso visto que uma de suas funções é carrear este tipo de substância (PYZIK et al., 2017).

Os GCs sintéticos quando administrados, especialmente aqueles que não possuem efeitos mineralocorticoides (dexametasona, por exemplo) são capazes de inibir o eixo hipotalâmico hipofisário supra-renal e assim com ausência do ACTH há diminuição das células do cortex adrenal e por conseqüência redução da produção de aldosterona - responsável por regular a homeostase do sódio (CHIMIM et al., 2014). O aumento dos níveis de albumina se dá pela diminuição do volume circulante, onde ao perder líquido por poliúria, desencadeia hiperalbuminemia (PEREIRA et al., 2003).

O quadro de hipertensão arterial atribuído ao excesso de GC possui relação com a retenção de sal atribuído principalmente ao comprometimento do receptor mineralocorticoide na zona glomerulosa da adrenal – o uso crônico de GC compromete a síntese desse hormônio, que estando sob o controle da angiotensina II regulam os níveis de sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) no organismo (HRICIK DE; SCHULAK JA, 1993).

Com o metabolismo alterado e conseqüente problema renal há alteração no sistema de enzima renina que pode levar a um desequilíbrio nas enzimas e hormônios do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que leva a absorção de sódio (STANTON et al., 2003). Um excesso de sódio provoca constrição das arteríolas e conseqüentemente aumento de pressão arterial. O hormônio antidiurético (ADH) leva a reabsorção de água pelo rim de volta a corrente sanguínea aumentando o volume de sangue que leva ao aumento da PA (NISHI et al., 2010).

AO certo, o uso crônico de GC favorece maior adiposidade visceral (MACFARLANE et al., 2009), em nosso estudo verificamos estes efeitos que são atribuídos à maior atividade da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11HSD1), que catalisa a transformação dos GC em sua forma ativa e que encontra-se aumentada justificando a ação exacerbada dos GC nesse tecido (MASUZAKI et al., 2001). Além disso, os GC agem nos pré-adipócitos induzindo a diferenciação e aumento da massa adiposa, além de aumentar a atividade da lipase lipoproteica (LPL) (CAMPBELL et al., 2011).

A literatura apresenta estudos mostrando que os GC promovem a diminuição do transporte de glicose estimulada por insulina (OLEFSKY, 1975; TANAKA et al., 1992). E quando em excesso, levam à diminuição da captação e oxidação desse substrato no músculo esquelético (DIMITRIADIS et al., 1997). Efeitos esses provavelmente responsáveis por promover intolerância à glicose e resistência à insulina. Quando administrados por um período prolongado ou mesmo em altas doses, os GCs promovem intolerância à glicose, pois a síntese elevada e a secreção pelas células  $\beta$ -pancreáticas de insulina não conseguem compensar a exigência metabólica (NOVELLI et al., 1999). No nosso trabalho os GC promoveram uma melhora da tolerância à glicose que esta associada a uma adaptação morfológica do pâncreas, pois os GC favorecem hipertrofia das células  $\beta$ -pancreáticas e conseqüente aumento na secreção de insulina, resposta essa compensatória que favoreceu maior tolerância à glicose (PAREDES; ALVES, 2016; RAFACHO et al., 2009). Em conjunto, estes efeitos ainda são acompanhados de um quadro de resistência à insulina nos animais do grupo que receberam maior dose de DEXA.

No Estudo 1 resolvemos testar diferentes doses de DEXA e escolher a que melhor caracterizasse a SC. Com base nos resultados apresentados e análise da

literatura podemos inferir que os animais que receberam DEXA na dose 1,0 mg/kg durante as quatro semanas de tratamentos foram induzidos à SC.

## **9.2 Animais com síndrome de Cushing que receberam administração de leucina**

No estudo 2 investigamos os efeitos da suplementação com LEU concomitante a administração de DEXA segundo modelo experimental apresentado no Estudo 1. Verificamos que os animais tratados com LEU acentuaram ainda mais a redução do consumo alimentar e perda de massa corporal (grupos 1,0 e 1,5%), bem como, verificou-se maior adiposidade, acúmulo de gordura hepática, dislipidemia e piora na atrofia das adrenais. Quanto a avaliação de perfil antio-oxidante a LEU não promoveu melhora de atuação de antioxidantes, no entanto parece haver uma compensação entre atuação das enzimas.

O consumo de LEU é capaz de levar a diminuição no consumo de ração (FREUDENBERG; PETZKE; KLAUS, 2012). Porém, muitos estudos não encontraram o mesmo efeito (KOCH et al., 2013; WANG et al., 2012). Provavelmente, esta resposta possa estar relacionada com o sinergismo destes dois compostos (DEXA + LEUCINA). Ademais, a administração de DEXA em excesso *per si* leva a redução de massa corporal (DRGONOVA et al., 2013) e quando associado à LEU, seu efeito é mais pronunciado quando testada em maiores doses (1,0 e 1,5%), efeito esse decorrente principalmente do menor consumo de ração. Além disso, no presente trabalho é visto que não houve em nenhum dos grupos tratados redução de consumo hídrico quando comparados ao grupo veículo então a redução de consumo e conseqüente redução da massa corporal não tenha sido provocada por desidratação nos animais conseqüentes do consumo de água.

Na literatura, a maioria dos trabalhos relacionados à suplementação com LEU emprega esse aminoácido junto a carboidratos, proteínas, ou outros aminoácidos. Contudo quando suplementado na ausência de outros ACR - isoleucina e valina - ou com dieta pobre em proteínas e carboidratos os animais apresentam diminuição de consumo alimentar, redução da massa corporal e mesmo redução de crescimento (SAUBERLICH, 1961). Essas publicações de certa forma corroboram com os dados do presente trabalho em que apesar dos animais deste trabalho não terem sido submetidos restrição de outros nutrientes, e a LEU empregada de forma isolada, os

animais de modo consistente apresentaram redução do consumo de ração e massa corporal.

Nosso trabalho também apresenta dados referentes ao aumento de gordura hepática. Observamos que a leucina junto à dexametasona levou ao aumento dos níveis de TAG. Efeitos também observados nos níveis das enzimas ALT e AST. A primeira limitada ao citosol dos hepatócitos é um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e em certos limites indica danos sofrido pelo fígado. E ao verificarmos o aumento da AST, observa-se que a LEU – dose 0,5% favoreceu o dano hepático, o bastante para provocar aumento dessas duas enzimas (AL-HABORI; STAHMANN, 2002).

O sistema de defesa antioxidante atua reduzindo os danos causados pelos radicais livres e por essas espécies reativas, sendo que quando há peroxidação lipídica advinda com aumento de gordura ocasiona um desequilíbrio no sistema oxidante e antioxidante (YANG et al., 2017). Com o aumento de gordura pode haver lesão celular progressiva e cumulativa devido à pressão pela grande massa corporal onde, à injúria celular, que libera como fator de necrose tumoral as citocinas gerando espécies reativas de oxigênio (TURRENS, 1997).

O estresse oxidativo pode desencadear uma adaptação ou lesão celular. Quando adaptadas as células toleram o estresse oxidativo por meio da regulação da síntese das defesas antioxidantes até o reestabelecimento do equilíbrio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995). Esse quadro de estresse oxidativo pode provocar dano nos mais diversos tipos de biomoléculas entre elas o DNA, proteínas e lipídios. Sendo que o alvo do estresse oxidativo varia a depender da célula, tipo de exposição ou mesmo à intensidade do estresse (FRIDOVICH, 1998).

No nosso trabalho em ratos com SC é visto que em valores referentes à NADPH oxidase 4 a LEU levou à redução da expressão de NOX4. Um desequilíbrio no funcionamento da atividade das NADPH oxidase favorece a processos deletérios ao organismo como, por exemplo, ao acúmulo de gordura e aterosclerose resultante de um desequilíbrio favorável as espécies reativas de oxigênio (DESAI, 2014).

Há evidências que alterações no estresse oxidativo se relacionam com o desenvolvimento de doenças e isso pode ocorrer por efeitos diretos e indiretos ao DNA como alteração de sinais na transdução, proliferação celular, morte celular e

comunicação intercelular. O dano pode ser direto por meio do ataque químico ao DNA nas bases purina e pirimidina ou desoxirribose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995).

Diversas enzimas fazem parte do mecanismo de defesa entre elas, a SOD, a CAT e a glutathione peroxidase (GPx) e outras que não estão relacionadas diretamente ao processo como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP), além dessas enzimas ainda existem as antioxidantes não-enzimáticas como vitamina E, vitamina C, flavonoides entre outras moléculas (RITTER et al., 2004).

Os componentes do sistema antioxidante exercem efeitos protetores, como por exemplo, lesões de reperfusão pós-isquemia em coração e fígado, que podem ser prevenidas por SOD e CAT (LEFER e GRANGER, 2000). A SOD importante enzima antioxidante e que age sobre o radical  $O_2^-$ , dismutando-o a  $H_2O_2$ . Em nosso trabalho é visto que a LEU não levou ao aumento da atividade da SOD, porém a LEU promoveu aumento em atividade de CAT. Esse aumento em atividade de CAT e não alteração em SOD provavelmente tenha ocorrido porque essas enzimas agem em cooperação para manter as espécies reativas (ER) em concentrações fisiológicas. A SOD e CAT atuam principalmente em região hidrofílicas sendo a SOD com especificidade para a dismutação de  $O_2^-$ , gerando peróxido de hidrogênio, enquanto a CAT decompõe  $H_2O_2$  (MICHIELS et al., 1994).

Outro ponto observado em nosso trabalho é o aumento de atividade de GSH importante por atuar contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos. Este benefício antioxidante ocorre pelo grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína e a GSH (REISCHL et al., 2007). Além de atuar diretamente na síntese de proteínas, DNA, prostaglandinas e no metabolismo celular (KAMESH et al., 2001).

O MDA é um biomarcador e produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endo-ciclicação de ácidos graxos polinsaturados, tais como o ácido linoleico, araquidônico e docosaenoico (GROTTO et al., 2007). Na SC há o desencadeamento de processos inflamatórios, e a MPO – importante indicador inflamatório esta atrelada a esses processos, tendo em vista que a liberação dessa enzima se deve por macrófagos ativados durante a inflamação e que as espécies

reativas produzidas por elas podem ativar fatores de transcrição, incluindo a via de sinalização de NF- $\kappa$ B (fator de transcrição envolvido na síntese de citocinas pró-inflamatórias) aumentando o processo inflamatório (REUTER et al., 2010).

Em nosso trabalho as concentrações de MDA em fígado mostra aumento da atividade dessa enzima do grupo DEXA em relação ao grupo que recebeu LEU indicando redução da peroxidação lipídica mediada pela ação da LEU. Porém, esses valores devem ser observados com cautela, pois o grupo que recebeu LEU apresenta valores significativamente maiores de MPO assim esses dados não são capazes de indicar se a LEU de forma isolada foi capaz de controlar todo o sistema antioxidante celular.

Supõe-se que a suplementação com leucina contribui para maior concentração de RNA em fígado por estimular principalmente os mecanismos intracelulares envolvidos com a síntese de componentes que constituem o aparato responsável pelo processo de tradução proteica (DONATO et al., 2012; ESCOBAR et al., 2005).

Em nosso trabalho é visto que os fígados dos ratos que receberam leucina apresentaram redução na expressão de RNAm de enzimas antioxidantes e de NOX4, provavelmente isso se deve ao fato da pequena expressão desses genes não ter refletido na atividade das enzimas. O FATP2 - importante no transporte de ácidos graxos e metabolismo não se mostrou com diferenças estatísticas entre os grupos, apesar desse marcador está relacionado com fígado gorduroso (DONNELLY et al., 2005).

O modelo de indução de SC usando DEXA em ratos é pouco visto na literatura, houve dificuldades em encontrar a dose que caracterizasse a síndrome. Esse estudo foi importante por apresentar resultados da LEU frente à SC. Resultados que devem ser visto com cautela, pois apresenta resultados que não indicam se a LEU de forma isolada é benéfica no tratamento da síndrome.



## **10. CONCLUSÃO**

A DEXA na dose 1,0 mg/kg seguindo modelo de estudo 1 foi capaz de levar os animais ao desenvolvimento da SC.

Quanto ao estudo 2 nossos resultados demonstram que a suplementação dietética de LEU não foi hábil em demonstrar efeitos benéficos nos diversos parâmetros avaliados onde mesmo com administração de LEU os animais apresentaram redução de consumo alimentar e perda de massa corporal, elevação de parâmetros bioquímicos com aumento de gordura em fígado e plasma além de que a LEU de forma isolada não foi eficaz em promover melhoria em marcadores de estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHGARI, M., ABDOLLAHI, M., KEBRYAEEZADEH, A., HOSSEINI, R., SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Human & Experimental Toxicology**, 2003; 22:205-211.

AL-HABORI; STAHMANN. Toxicological evaluation of Catha edulis leaves: a long term feeding experiment in animals. **Ethno-Pharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ANAGNOSTIS P, ATHYROS V, TZIOMALOS K, KARAGIANNIS A, MIKHAILIDIS D. The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2009;94(8):2692-2701.

ANDREWS, R. C., & WALKER, B. R. (1999). Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical Science*, 96(5), 513–523.

ASENSIO C, MUZZIN P, ROHNER-JEANRENAUD F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. **Int J Obes**. 2004;28 Suppl 4: S45-S52.

BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 5, p. 999-1007, Mar 2010.

BLOUET, C.; SCHWARTZ, G. J. Brainstem nutrient sensing in the nucleus of the solitary tract inhibits feeding. **Cell Metab**, v. 16, n. 5, p. 579-87, Nov 2012.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.68, n.2, Feb, p.374-8. 1989.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. **J. Nutr.**, v.136, p.207S-211S, 2006.

BRUEHL H, RUEGER M, DZIOBEK I, SWEAT V, TIRSI A, JAVIER E, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** 2007;92:2439–45.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct 2000.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, p. 840–844, 2000.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, v. 57, p. 91-97, 2012.

CAREY RM, SIRAGY HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr Rev** 2003;24:261-71.

CASTRO RB et al. Tissue-specific adaptative levels of glucocorticoid receptor alpha mRNA and their relationship with insulin resistance. **Genet Mol Res** 2012; 11(4): 3975-87.

CEFALU, W.T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. **Exp. Biol.**, v.226, p.13-26. 2001.

CHEMELLI, R. M. et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 437-51, Ago 1999.

CHANG DJ, JI C, KIM KK, CASINGHINO S, MCCARTHY TL, CENTRELLA M. Reduction in transforming growth factor beta receptor 1 expression and transcription factor CBFa1 on bone cells by glucocorticoid. **J Biol Chem**. 1998; 273(9): 4892-96.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 1, p. 27-42, 2008.

CHEN, X.; LI, D.; YIN, J.; DING, Y.; ZHANG, H.; YI, G. Regulation of dietary energy level and oil source on leptin and its long form receptor mRNA expression of the adipose tissues in growing pigs. **Domest Anim Endocrinol**, v. 31, n. 3, p. 269-83, Out 2006.

CHIMIN, P.; FARIAS, T. S. M.; TORRES-LEAL, F. L.; BOLSONI-LOPES, A.; CAMPAÑA, A. B.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F. B. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 211, n. 2, p. 409-20, Jun 2014.

CAMPBELL, J. E.; PECKETT, A. J.; D'SOUZA, A. M.; HAWKE, T. J.; RIDDELL, M. C. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. **Am J PhysiolCell Physiol**, v. 300, n. 1, p. 198-209, Out 2011.

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

CHUNG, S.; SON, G. H.; KIM, K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1812, n. 5, p. 581-591, 2011.

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nat.Neurosci**, v. 8, n. 5, p. 571-78, Mai 2005.

COTA, D.; PROULX, K.; SMITH, K. A. B.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 927-30, Mai 2006.

DE BOSSCHER K, HAEGEMAN G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. **Mol Endocrinol** 2009; 23: 281–91.

DESAI LP, ZHOU Y, ESTRADA AV, DING Q, CHENG G, COLLAWN JF, and THANNICKAL VJ. Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. **J Biol Chem** 289: 18270–18278, 2014.

DIMITRIADIS, G. et al. Effect of glucocorticoids excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. **Biochem. J. Portland.**, v. 321, p. 707-712, 1997.

DONATO, J. JR.; TIRAPEGUI, J. Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. **Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182-9, Fev 2012.

DONNELLY KL, SMITH CI, SCHWARZENBERG SJ, JESSURUN J, BOLDT MD, Parks EJ. **J Clin Invest.** 2005;115:1343–1351.

DRGONOVA, J.; JACOBSSON, J. A.; HAN, J. C.; YANOVSKI, J. A. FREDRIKSSON, R.; MARCUS, C.; SCHIÖTH, H. B.; UHL, G. R. Involvement of the neutral amino acid transporter SLC6A15 and leucine in obesity-related phenotypes. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e68245, Set 2013.

EATON, J. W. Catalase and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, p. 3-4, 1991.

ESCOBAR, J; FRANK, J.W; SURYAWAN, A; NGUYEN, H.V; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S; DAVIS, T.A. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched chain amino acids in neonatal pigs. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 290:E612-E621, 2006.

FALLO F, MAFFEI P, DALLA POZZA A, et al. Cardiovascular autonomic function in Cushing's syndrome. **J Endocrinol Invest** 2009, 32: 41–5.

FAIPOUX, R.; TOME, D.; GOUGIS, S.; DARCEL, N.; FROMENTIN, G. Proteins inactivate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. **J Nutr**, v. 138, n. 6, p.1172–8, Jun 2008.

FERREIRA DS, Amaral FG, Mesquita CC, Barbosa AP, Lellis-Santos C, Turati AO, et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **PLoS One**. 2012; 7:e38795.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, E., P.M. Stewart, and M.S. Cooper, The pituitary-adrenal axis and body composition. **Pituitary**, 2009. 12: p. 105-115.

FINDLING JW, RAFF H, ARON DC. The low-dose dexamethasone suppression test: a reevaluation in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89: 1222-1226.

FRANCO-COLIN, M.; TELLEZ-LOPEZ, A. M.; QUEVEDO-CORONA, L.; RACOTTA, R. Effects of long-term high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue and splanchnic area in rats. **Metabolism**, v. 49, n. 10, p. 1289-94, Oct 2000.

FREUDENBERG, A.; PETZKE, K. J.; KLAUS, S. Comparison of high-protein diets and leucine supplementation in the prevention of metabolic syndrome and related disorders in mice. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 11, p. 1524-30, Nov 2012.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology** 1998; 201:1203-1209.

FRUHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochem. J.**, v. 393, p.7-20,2006.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, v. 148, n. 1, p. 452-60, Jan 2007. hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism**, v. 50, n. 9, p. 1054-58, Sep 2001.

GRUNDY, S. M.; ARAI, H.; BARTER, P.; BERSOT, T. P.; BETTERIDGE, D. J.; CARMENA, R. et al. An International Atherosclerosis Society Position Paper: global recommendations for the management of dyslipidemia-full report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 1, p. 29-60, 2014.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med**. 1995 Jan;18(1):125–126.

HIRATA, A. et al. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity- related adipocyte dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun**, v.419, n.2, p.182-7, Mar 9 2012.

GLASS CK, ROSENFELD MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev** 2000; 14: 121-41.

GROTTO D, SANTA MARIA LD, BOEIRA S, VALENTINI J, CHARAO MF, MORO AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J Pharm Biomed Anal**. 2007;4:619---24.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed., New York, Oxford University Press Inc, 1999.

HIRABARA, S.M. et al. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **J. Nutr. Biochem.**, 2012.

HRICIK DE, SCHULAK JA. Metabolic effects of steroid withdrawal in adult renal transplant recipients. **Kidney Int** 1993;44 (Supl. 43): S26-S9.

HUSSELL, G. M. et al. Rapid Glucocorticoid Receptor-Mediated Inhibition of Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Ultradian Activity in Healthy Males. **The Journal of Neuroscience**, Washington, DC, v. 30, n. 17, p. 6106-6115, 2010.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Phys. Rev.**, v. 79, n. 2, p. 451-480, 1999.

JIN JY, DUBOIS DC, ALMON RR, JUSKO WJ. Receptor/gene-mediated pharmacodynamics effects of methylprednisolone on phosphoenolpyruvate carboxykinase regulation in rat liver. **J Pharmacol Exp Ther.** 2004;309(1):328–39.

JOURNEL, M.; CHAUMONTET, C.; DARCEL, N.; FROMENTIN, G.; TOMÉ, D. Brain Responses to High-Protein Diets. **Adv. Nutr**, v. 3, n. 3, p. 322-329, Mai 2012.

KAMESH V.; SUMATHI T. Antihypercholesterolemic effect of *Bacopa monniera* linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. Asian Pac. **J. Trop. Med.** p. 949-955. 2012.

KIMURA A, MORA S, SHIGEMATSU S, PESSIN JE, SALTIEL AR. The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. **J Biol Chem** 2002;277: 30153–8.

KOCH, C. E.; GÖDDEKE, S.; KRÜGER, M.; TUPS, A. Effect of central and peripheral leucine on energy metabolism in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). **J Comp Physiol B**, v. 183, n. 2, p. 261-8, Fev 2013.

KONTUSH, A.; CHANTEPIE, S.; CHAPMAN, M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 10, p. 1881-1888, 2003.

KORBONITS, M.; GROSSMAN, A.B.; Ghrelin: update on a novel hormone system. **Eur J Endocrinol (Oslo)**, v. 151, suppl. 2, p. S67-S70, Ago 2004.

LAYMAN, D.K.; BAUM, J.I. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. **J Nutr.** V. 134, n.4, p.968S-73S, 2004.

LEE, M. J.; WANG, Y.; RICCI, M. R.; SULLIVAN, S.; RUSSELL, C. D.; FRIED, S. K. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 3, p. E858-64, Mar 2007.

LEFER, D. J., GRANGER, D. N. Oxidative stress and cardiac disease. **The American Journal of Medicine** 2000; 109:315-323.



LENARD NR, BERTHOUD HR. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. **Obesity (Silver Spring)** 2008;16(Suppl 3):S11-S22.

LI, X.; WANG, X.; LIU, R.; MA, Y.; GUO, H.; HAO, L.; YAO, P.; LIU, L.; SUN, X.; HE, K.; CAO, W.; YANG, X. Chronic leucine supplementation increases body weight and insulin sensitivity in rats on high-fat diet likely by promoting insulin signaling in insulin-target tissues. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 6, p. 1067-79, Jun 2013.

LUQUET, S.; MAGNAN, C. The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. **Front Biosci (Schol Ed)**, v.1, n. 1, p. 448-465, Jun 2009.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 12, p. 723-36, Dez 2014.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014.

MACFARLANE DP, FORBES S, WALKER BR. Glucocorticoid and fatty acid metabolism in humans: fueling fat redistribution in the metabolic syndrome. **J Endocrinol**. 2009;197(2): 189-204.

MACOTELA, Y.; EMANUELLI, B.; BANG, A. M.; ESPINOZA, D. O.; BOUCHER, J.; BEEBE, K.; GALL, W.; KAHN, C. R. Dietary leucine - an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21187, Jun 2011.

MARTIN, S.O.L.; SANCHEZ MUNIZ, F.J.; VAQUERO, M.P. N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. **Nutr. Hosp.**, v.24, n.2, p.113-27. 2009.

MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; MORTON, N. M.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R.; FLIER, J. S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v. 294, n. ,p. 2166-70, 2001.  
MAO, X.; ZENG, X.; WANG, J.; QIAO, S. Leucine promotes leptin receptor expression in mouse C2C12 myotubes through the mTOR pathway. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 5, p. 3201-6, Jun 2011.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and CU/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 17, n. 3, p. 235-248, Sept, 1994.

MINEO, C.; DEGUCHI, H.; GRIFFIN, J. H.; SHAUL, P. W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circulation Research**, v. 98, n. 11, p. 1352-1364, 2006.

NAGAJYOTHI F, KULIAWAT R, KUSMINSKI CM, MACHADO FS, Desruisseaux MS, Zhao D, et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. **Am J Pathol**. 2013; 182: 886-894.

NISHI, E.E.; OLIVEIRA-SALES, E.B.; BERGAMASCHI, C.T.; OLIVEIRA, T.G.; BOIM, M.A.; CAMPOS, R.R. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. **American Journal of Hypertension**.v.23, n.5, p.473-80. 2010.

NOVELLI M, DE TATA V, BOMBARA M, LORENZINI A, MASINI M, POLLERA M, et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J. Endocrinol**. 1999; 162(3): 425-432. of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25: 331-5.

NUNES, E.A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v.38, p.1137-1146, 2013.

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

OLEFSKY, J.M. et al. The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. **Metabolism**. v. 24, n. 4, p. 517-527, 1975.

PALOU M, SANCHEZ J, PRIEGO T, RODRIGUEZ AM, PICÓ C, PALOU A. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue

in response to short-and medium-term fasting and refeeding. **J Nutr Biochem.** 2010;21(1):23-33

PAREDES, SÍLVIA; ALVES, MARTA. Management and Treatment of Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia. **Acta Médica Portuguesa**, v. 29, n. 9, p. 556-563, 2016.

POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol. Rev.**, 88 (2008), pp. 1243-1276.

PEREIRA AM, VAN AKEN MO, VAN DULKEN H, SCHUTTE PJ, BIERMASZ NR, SMIT JW, et al. Long-term predictive value of postsurgical cortisol concentrations for cure and risk of recurrence in Cushing's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:5858-64.

PROTZEK, A. O et al. Augmented cell function and mass in glucocorticoid-treated rodents are associated with increased islet IR- $\alpha$  /AKT/mTOR and decreased AMPK/ACC and AS160 signaling. **Int J Endocrinol**, p. 9834-53, Set 2014.

PYLES, L. A.; STEJSKAL, E.; EINZING, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2- thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 4, p. 407-419, 1993.

PYZIK M, RATH T, KUO TT, et al. Hepatic FcRn regulates albumin homeostasis and susceptibility to liver injury. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2017; 114: E2862-E2871.

RAFACHO A, ABRANTES JL, RIBEIRO DL, PAULA FM, PINTO ME, BOSCHERO AC, BOSQUEIRO JR. Morphofunctional Alterations in Endocrine Pancreas of Short- and Long-term Dexamethasone-treated Rats. **Horm Metab Res.** 2011; 43(4): 275-281.

RAFACHO, A; GIOZZET, V. A. G.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of

dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284-93, Abr 2008a.

RAFACHO, A.; CESTARI, T. M.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO J. R. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E681-E689, Jan 2009.

RAHMAN I, BISWAS SK, KODE A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **Eur J Pharmacol** 2006;533:222-39.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, p. 785-789, 1963.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

REISCHL, S.*et al.* Beta-TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics. **J. Biol. Rhythms** 22, 375–386, 2007.

RITTER, C., ANDRADES, M. E., REINKE, A., BARRETO, S. M., MOREIRA, J. C. F., PIZZOL, F. D. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine** 2004; 32 (2):342-349.

RIZONI D, PORTERI E, DE CIUCEIS C, RODELLA LF, PAIARDI S, RIZZARDI N. Hypertrophic ulticentre of subcutaneous small resistance arteries in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 94: 5010-5018.

RODRIGUES, M. D.; BORIN, S. H.; PAULINO, P. C.; ARRUDA, E. J.; SILVA, C. A. Comparação das reservas glicogênicas em ratos jovens e envelhecidos tratados com picolinato de cromo. **Rev Bras Med Esporte**, v. 20, n. 5, p. 366-369, Set-Out, 2014.

RUXTON C. Health benefits of omega-3 fatty acids. **Nurs Stand** 2004; 18: 38 – 42.

ROSEBERRY A. G.; H. LIU, A.C. JACKSON, X. CAI, J.M. FRIEDMAN. Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. **Neuron**, 41 (2004), pp. 711-722

SAUBERLICH, H. E. Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats. **J. Nutr.** 75:61-72,1961.

SCHACKE, H.; DOCKE, W-H.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, n. 1, 23-43, 2002.

SCHINNER, S. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 6, p. 674-682, 2005.

SHAH, O. J.; ANTHONY, J. C.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 5, p. E1185-E1190, Nov 2000.

SHE, P.; VAN HORN, C.; REID, T.; HUTSON, S. M.; COONEY, R. N.; LYNCH, C. J. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 6, p. E1552-63, Dez 2007.

SHEFER G, MARCUS Y, KNOLL E, DOLKART O, FOICHTWANGER S, NEVO N, et al. Angiotensin 1-7 Is a Negative Modulator of Aldosterone Secretion In Vitro and In Vivo. **Hypertension** 2016;68:378-84.

SHIMOMURA, Y.; HONDA, T.; SHIRAKI, M.; MURAKAMI, T.; SATO, J.; KOBAYASHI, H.; MAWATARI, K.; OBAYASHI, M.; HARRIS, R.A. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. **J. Nutr.**, v.136, n. p.250S-253S, 2006b.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIKORSKI, J. A. Oral cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors: a potential new approach for treating coronary artery disease. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 49, n. 1, p. 1-22, Jan. 2006.

SILVA, P. M. R. et al. Down-Regulation of Allergic Responses in Conditions of Experimental Diabetes: A Role for Glucocorticoids? **Neuroimmunomodulation, Basel**, v. 16, n. 1, p. 13-18, 2009.

SIMPSON SJ, LE COUTEUR DG, RAUBENHEIMER D, SOLON-BIET SM, COONEY GJ, COGGER VC & FONTANA L (2017). Dietary protein, aging and nutritional geometry. **Ageing Res Rev** **39**, 78–86.

SLUIJS I, BEULENS JW, VAN DER AD, SPIJKERMAN AM, GROBBEE DE & VAN DER SCHOUW YT (2010). Dietary intake of total, animal, and vegetable protein and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL study. **Diabetes Care** **33**, 43–48.

STANTON, A., JENSEN C., NUSSBERGER J., O'BRIEN E. Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. **Hypertension**, v. 42, p. 1137–43, 2003.

TANAKA, H. et al. Glucocorticoid receptor and inhibition of 3-O-methyl-D-glucose uptake by glucocorticoids in peripheral blood leukocytes from normal humans: correlation between receptor level and hormone effect in vitro. **Acta Endocrinol. Bucharest**, v. 126, p. 29-36, 1992.

TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B. & KAHN, C. R. *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** **7**, 85–96 (2006).

TAVES, M. D.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; SOMA, K. K. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. 11-24, 2011.

TONOLO, G. et al. Chronic low-dose infusions of dexamethasone in rats: effects on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. **J Hypertens**, v. 6, n. 1, p. 25-31, Jan 1988.

TRINH, K.Y. et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J Biol Chem.**, v.273, n.47, p. 31615-20, 1998.

TURRENS JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep.** 1997;17:3---8.

VIENBERG SG, BJÖRNHOLM M. Chronic glucocorticoid treatment increases de novo lipogenesis in visceral adipose tissue. **Acta Physiologica** (Oxford, England). 2014;211(2): 257-259.

WADA, N.; HIRAKO, S.; TAKENOYA, F.; KAGEYAMA, H.; OKABE, M.; SHIODA, S. Leptin and its receptors. **J Chem Neuroanat**, v. 61- 62, p. 191-9, Nov 2014.

WATSON S, GALLAGHER P, RITCHIE JC, FERRIER IN, YOUNG AH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. **Br J Psychiatry**. 2004;184:496-502.

XING, Y. et al. The effects of ACTH on steroid metabolomic profiles in human adrenal cells. **Journal of Neuroendocrinology**, Bristol, v. 209, n. 3, p. 327-335, 2011.

YAMANAKA, A. et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron**, v. 38, n. 5, p. 701-713, Jun 2003.

YANG, Y. H. et al. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 183, n. 2, p. 1435-1445, 2009.

YANG, X.; LI, Y.; LI, Y.; REN, X.; ZHANG, X.; HU, D.; et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 600, p. 1-16, 2017.

YAYOU, K.; NAKAMURA, M.; ITO, S. Effects of AVP V1a and CRH receptor antagonist on psychological stress responses to frustrating condition in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 71, n. 4, p. 431-439, 2009.

YUDT MR, CIDLOWSKI JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. **Mol Endocrinol** 2002;16:1719-26.

ZAMPIERI, T. T.; PEDROSO, J. A.; FURIGO, I. C.; TIRAPEGUI, J.; DONATO, J. JR. Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84094, Dez 2013.

ZAMPIERI, T. T.; TORRES-LEAL, F. L.; CAMPAÑA, A. B.; LIMA, F. B.; DONATO JR., J. L-leucine supplementation worsens the adiposity of already obese rats by promoting a hypothalamic pattern of gene expression that favors fat accumulation. **Nutrients**, v. 6, n. 4, p. 1364-73, Abr 2014.

ZANCHI, N. E. et al. Dose and latency effects of leucine supplementation in modulating glucose homeostasis: opposite effects in healthy and glucocorticoid-induced insulin-resistance states. **Nutrients**, v. 4, n. 12, p. 1851-67, Dez 2012.

ZHANG, Y.; GUO, K.; LEBLANC, R. E.; LOH, D.; SCHWARTZ, G. J.; YU, Y. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multiple mechanisms. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1647-54, Jun 2007.

ZHENG, H.; BERTHOUD, H. R. Neural Systems Controlling the Drive to Eat: Mind Versus Metabolism. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 75-83, Abr 2008.



**ANEXO**

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Sarm Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64249-550  
Telefone (86): 3210-0731; E-mail: ceua@ufpi.edu.br

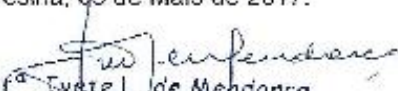


## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *'Influência da suplementação com Leucina e do treinamento resistido sobre o estresse oxidativo em ratos com síndrome de cushing'*, registrada nº **314/17**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. FRANCISCO LEONARDO TORRES LEAL** do Departamento de Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **05/052017**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Julho/ 2017 à Julho/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênica/ wistar
Nº de Animais	150
Peso/ Idade	250-300g/ 90-120 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotório Geral da UFPI

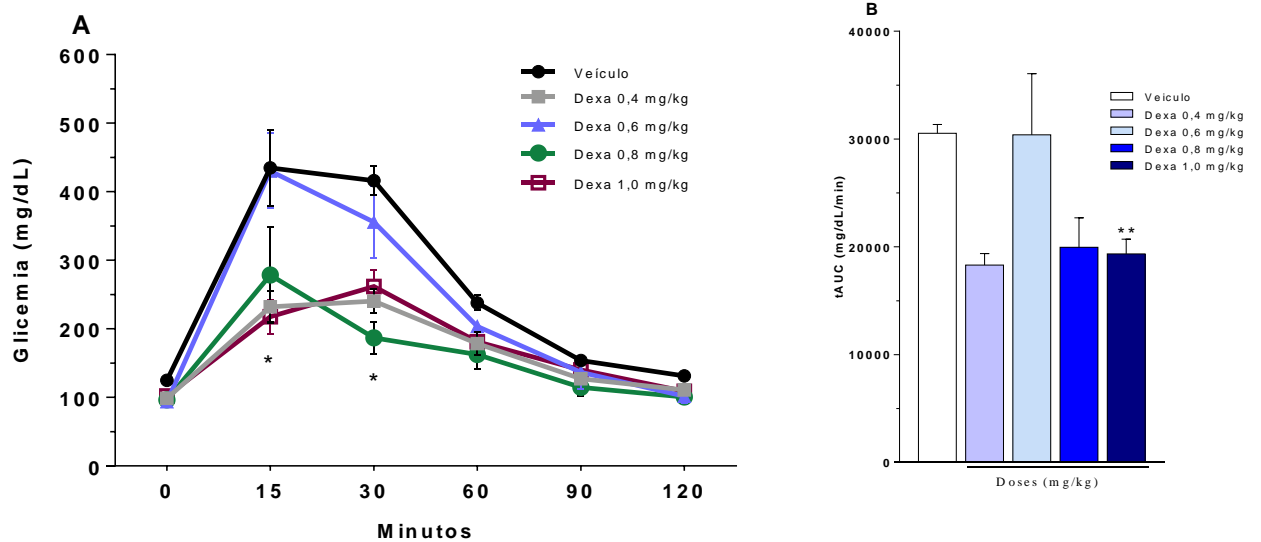
Teresina, 05 de Maio de 2017.

  
Prof.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
Comissão de Ética no Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## Anexo B - Gráficos e tabelas referente a resultados que não foram apresentados no trabalho

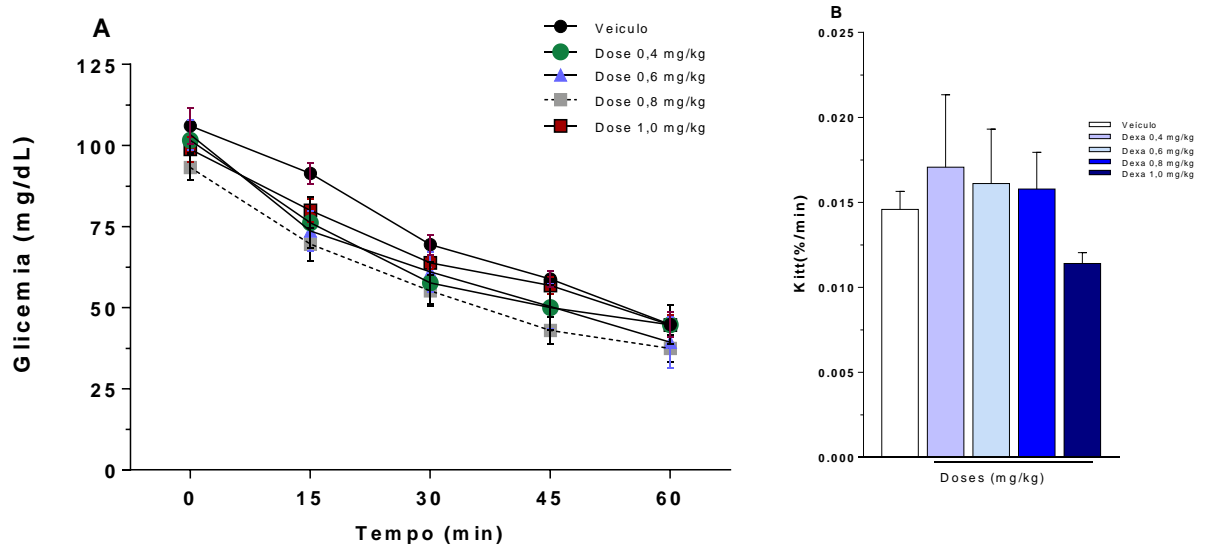
### Estudo 1

**Figura 1:** Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipTTG) e área total sob a curva (tAUC) de animais que receberam administração de DEXA



**Legenda: Efeitos crônicos da DEXA sobre a curva glicêmica e tAUC de ratos. (1A) Curva glicêmica; (1B) Área total sob a curva (tAUC).** \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p=0,05$ . Sendo Figura 1 A com teste ANOVA two-way e Figura 1B - teste *tukey's* para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=05 animais por grupo).

**Figura 2:** Curva glicêmica do teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipTTI) e taxa de decaimento de glicose (kitt) dos animais que receberam administração de DEXA



**Legenda: Efeitos crônicos da dexametasona sobre a curva glicêmica no teste de tolerância à insulina e taxa de decaimento de glicose (kitt) de ratos. (2A) Curva glicêmica; (2B) taxa de decaimento da glicose (kitt).** \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p=0,05$ . Sendo: (Figura 2A) com teste ANOVA two-way e (Figura 2B) teste tukey's para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=05 animais por grupo).

**Tabela 1:** Efeitos crônicos da dexametasona sobre o peso de adrenais e tecidos gordurosos de ratos que receberam DEXA

Grupos	Veículo	Dexa 0,4mg/kg	Dexa 0,6mg/kg	Dexa 0,8mg/kg	Dexa 1,0mg/kg
<b>Adrenal</b>	0,00531±0,0	0,00409±0,0	0,00286±0,0	0,00233±0,0	0,0033 ±0,00***
<b>TAB R.P</b>	0,695±0,18	0,318±0,21	0,592±0,12	0,428±0,25	0,874 ± 0,31
<b>TAB EPID</b>	1,236±0,13	1,348±0,28	1,518±0,15	1,282±0,29	1,635 ± 0,15**
<b>TAB MES</b>	0,685±0,11	0,507±0,04	0,988±0,07	1,006±0,05	1,074 ± 0,15**
<b>Adiposidade</b>	2,616±0,11	2,174±0,63	3,257±0,40	2,518±0,71	3,92 ± 0,35*

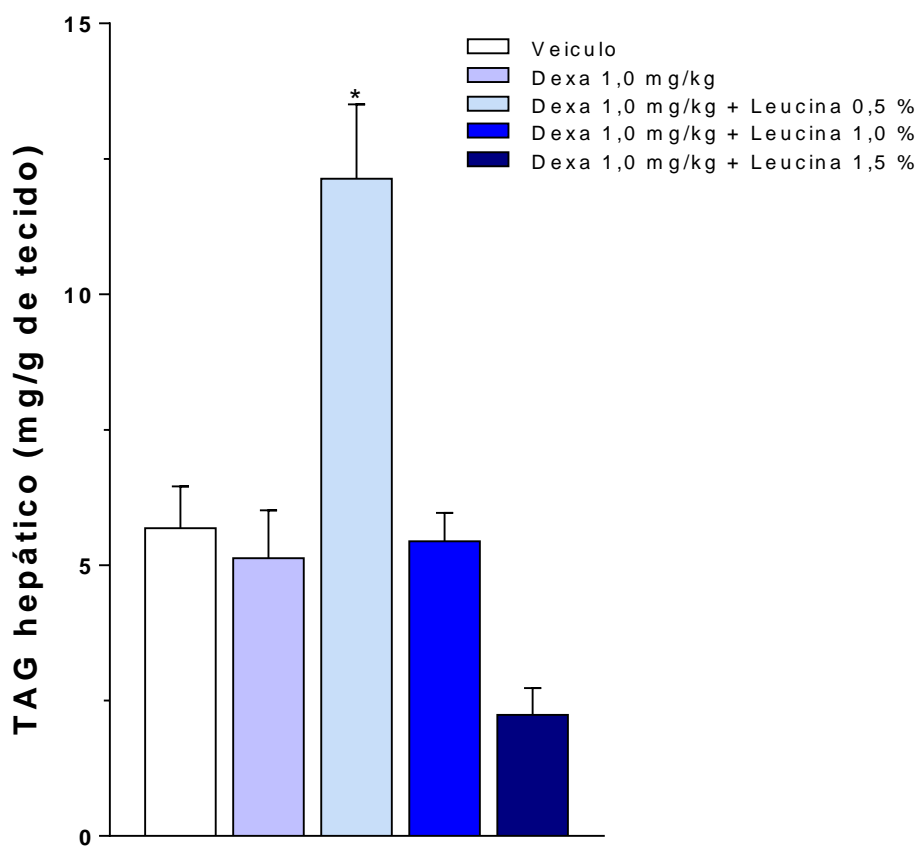
Valores apresentados como média ± EPM (erro padrão da média) de 5 animais/grupo. Teste *t de student*. \* estatisticamente diferente do grupo veículo onde adrenal (p=0,0006), TAB. EPID. (p=0,002), TAB MES (p=0,0014) e Adiposidade (p=0,0152).

## Estudo 2

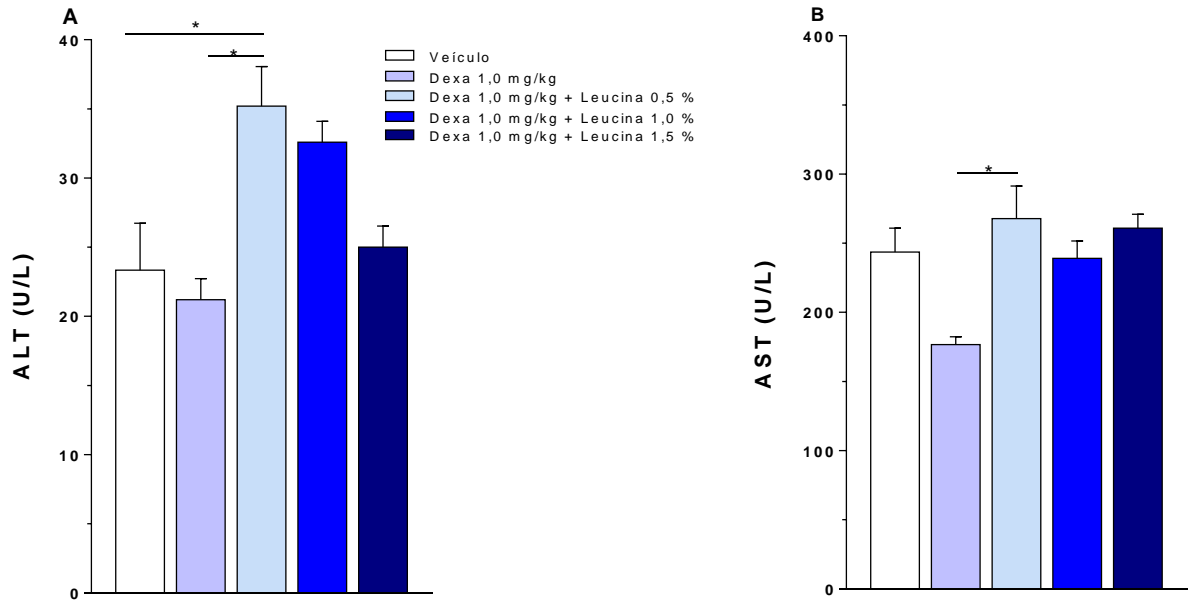
**Tabela 2:** Avaliação de concentrações bioquímicas plasmática de ratos com SC que receberam administração de LEU.

Grupos	Veículo	Dexa 1,0mg/kg	Dexa 1,0mg/kg + Leucina 0,5%	Dexa 1,0mg/kg + Leucina 1,0%	Dexa 1,0mg/kg + Leucina 1,5%
<b>TG</b>	92±10,39 <sup>@</sup>	132±20,61	132±20,02 <sup>*@</sup>	51,2±4,97 <sup>*</sup>	47,6±5,86 <sup>*</sup>
<b>COL</b>	51±6,52	74,66±11,68	84,25±10,14 <sup>*@</sup>	82,2±8,98 <sup>***</sup>	46,8±8,29
<b>ALB</b>	1,99±0,15 <sup>@</sup>	2,33±0,24 <sup>*</sup>	2,80±0,20 <sup>*</sup>	2,51±0,29	2,60±0,21
<b>GLI</b>	126,8±4,09	135,5±9,85	136,4±5,13	136,2±26,69	122,8±27,87
<b>HDL</b>	16,4±2,19	26,4±5,37	18,4±2,19 <sup>*</sup>	30±2,52	47,2±2,28
<b>Fração não HDL</b>	22,04±6,07	29,4±6,97	28,3±6,63	13,13±6,01	12,16±6,03

**Valores de concentrações bioquímicas plasmáticas de ratos com SC que receberam administração de LEU.** Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Dados expressos como média ± erro padrão da média. <sup>\*</sup> Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p < 0,05$ . <sup>@</sup> Estatisticamente diferente do grupo Dexa 1,0 mg/kg (m.c) com  $p < 0,05$ . Sendo n=7-10 animais por grupo.

**Figura 3:** Efeitos da leucina sobre as concentrações de TAG hepático

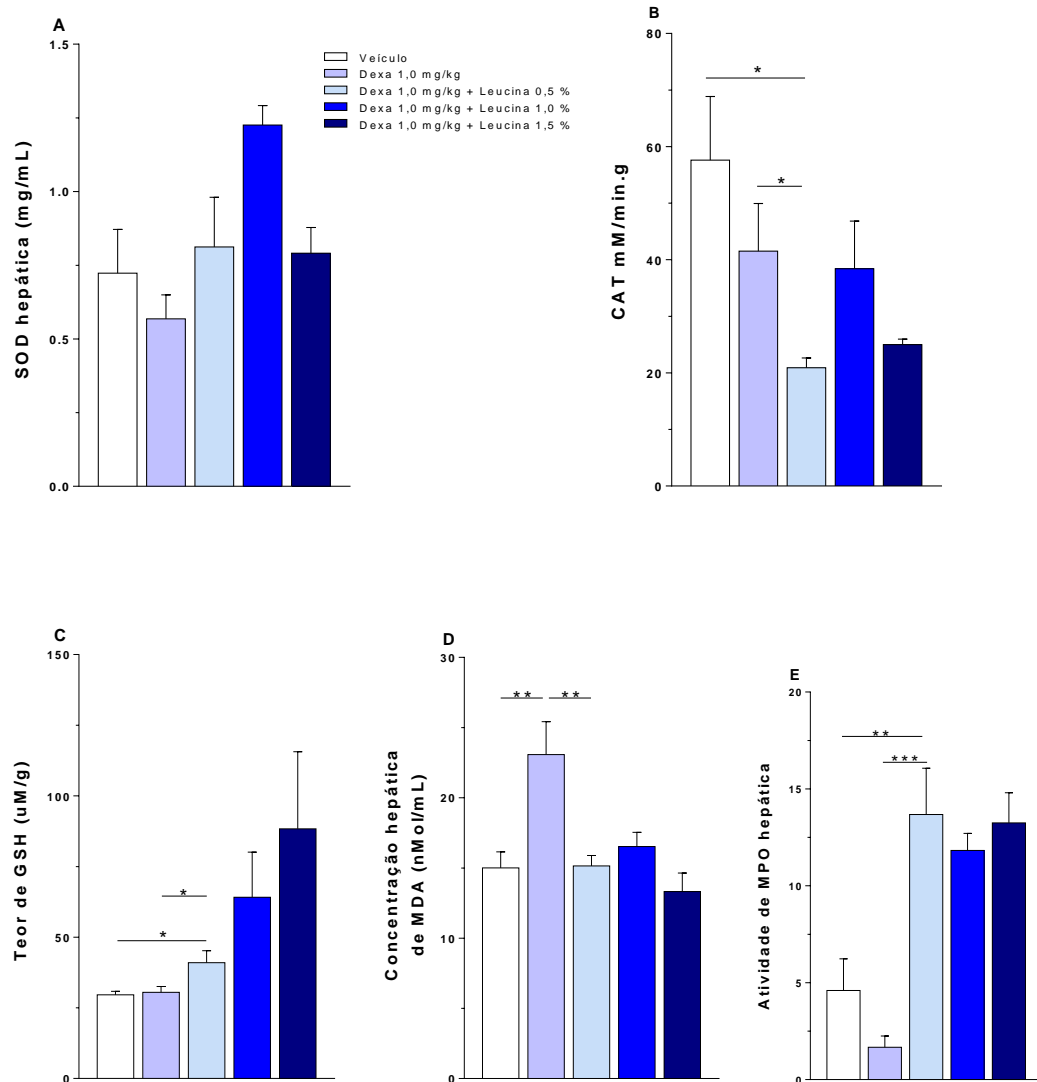
**Legenda:** Avaliação das concentrações de TAG hepáticos em ratos que receberam administração de leucina. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $*p < 0,05$ . Sendo  $n = 7-10$  animais por grupo.

**Figura 4:** Efeitos da leucina sobre as concentrações plasmáticas de ALT e AST

**Legenda:** Efeitos da leucina sobre as concentrações plasmáticas de ALT e AST. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Estatisticamente diferente do grupo veículo com \* $p < 0,05$ . Sendo  $n = 7-10$  animais por grupo.

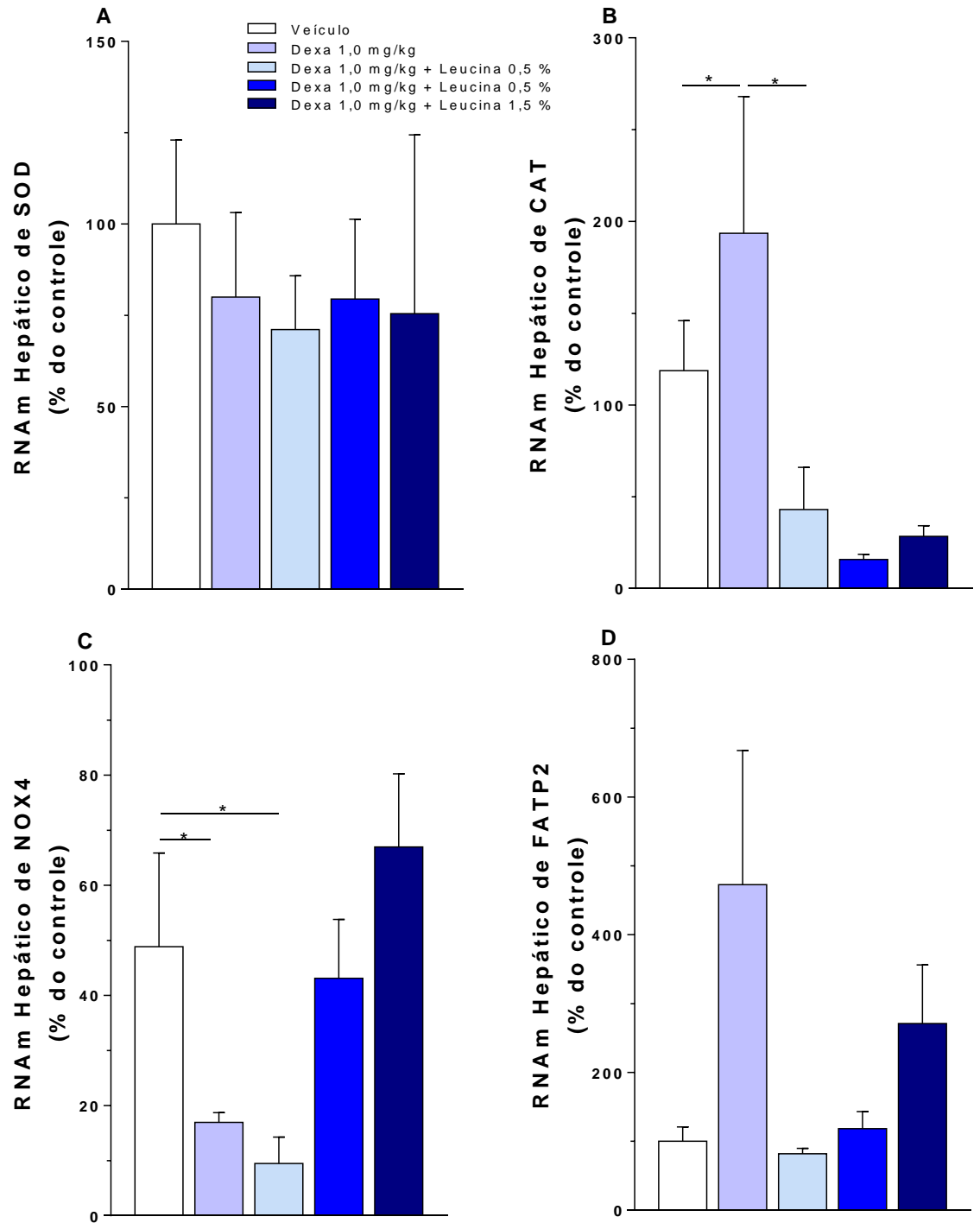


**Figura 5: Efeitos da leucina sobre estresse oxidativo de ratos com SC**



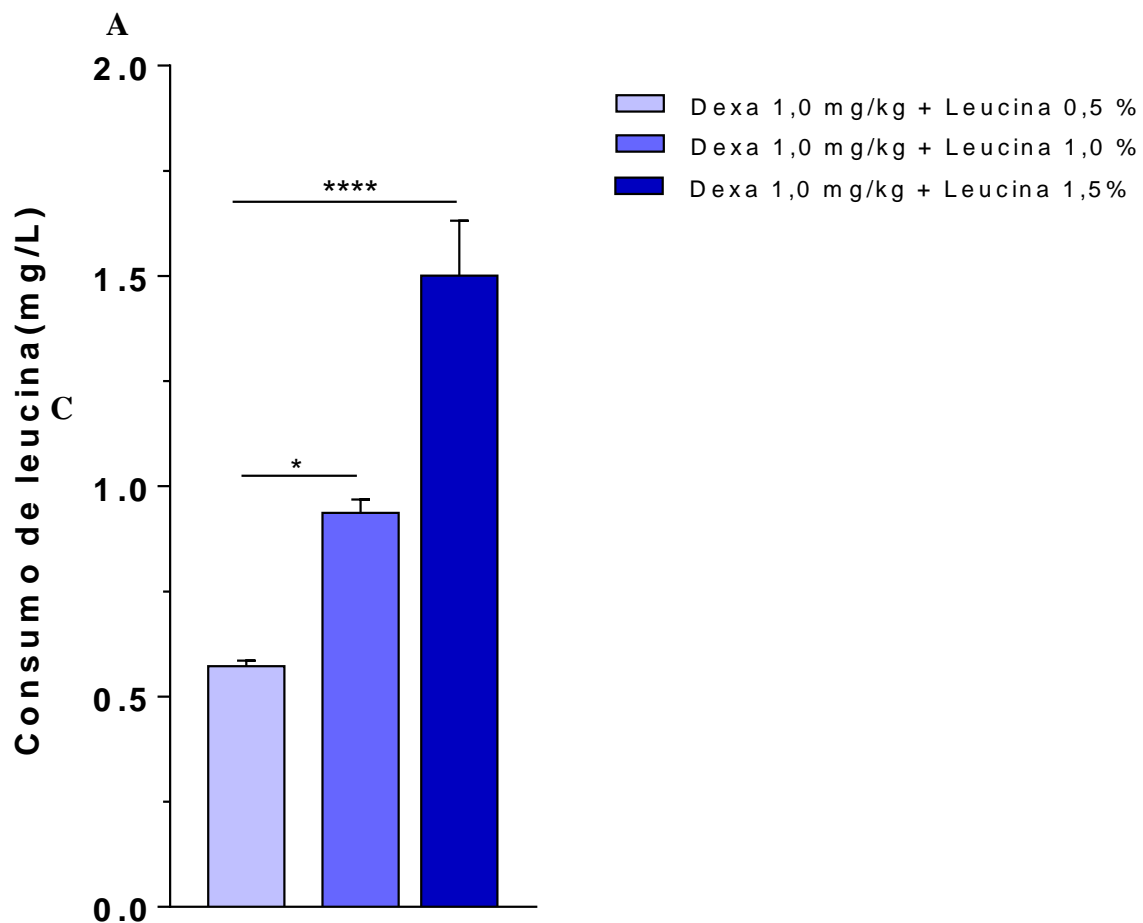
**Legenda: Avaliação de estresse oxidativo em ratos que receberam administração de leucina:** Figura 8: (a) teor de SOD, (b) CAT, (c) GSH, (d) concentração hepática de MDA, (e) atividade de MPO. Todos esses testes foram realizados com n=7 a 10 animais por grupo. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* p<0,05, \*\* p=0,01, \*\*\*p=0,001.

**Figura 6:** Análise de expressão gênica de RNAm em tecido hepático de ratos com SC que receberam administração de LEU



**Legenda:** Expressão gênica de RNAm em fígado de ratos com SC que receberam administração de leucina: (a) RNAm de SOD, (b) RNAm de CAT, (c) RNAm de FATP 2, (d) RNAm de NOX4. Teste ANOVA two-way com Newman-Keuls para múltiplas comparações. Todos com n=7 a 8 animais por grupo. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. \* Estatisticamente diferente do grupo veículo com  $p < 0,05$ .

Figura 7: Consumo de leucina



**Legenda: Consumo de leucina.** Realizado com o *teste tukey's* para múltiplas comparações. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=05 animais por grupo).