

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**Citrato altera o metabolismo hepático, a
sinalização da insulina e o processo
inflamatório *in vivo***

Jessica Magalhães Cotias Ristow Branco

Rio de Janeiro

2018

CIP - Catalogação na Publicação

M816c Magalhães Cotias Ristow Branco, Jessica
 Citrato altera o metabolismo hepático, a
 sinalização da insulina e o processo inflamatório in
 vivo / Jessica Magalhães Cotias Ristow Branco. --
 Rio de Janeiro, 2018.
 104 f.

 Orientadora: Patricia Zancan.
 Coorientadora: Mauro Sola-Penna.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
 Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
 Graduação em Bioquímica, 2018.

 1. Citrato. 2. Obesidade. 3. Resistência à
 Insulina. 4. Fígado. 5. Dieta Ocidental. I. Zancan,
 Patricia, orient. II. Sola-Penna, Mauro, coorient.
 III. Título.

Jessica Magalhães Cotias Ristow Branco

Citrato altera o metabolismo hepático, a sinalização da insulina
e o processo inflamatório *in vivo*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Rio de Janeiro

2018

Jessica Magalhães Cotias Ristow Branco

Citrato altera o metabolismo hepático, a sinalização da insulina e o processo inflamatório *in vivo*

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Rio de Janeiro, ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr.^a Patricia Zancan
Prof.^a Associada da Faculdade de Farmácia, UFRJ
(Orientadora)

Dr. Mauro Sola-Penna
Prof. Titular da Faculdade de Farmácia, UFRJ
(Coorientador)

Dr.^a Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Prof.^a Associada do Centro de Ciências Biológicas, UEM
(Coorientadora)

Dr.^a Mônica Ferreira Moreira
Prof.^a Associada do Instituto de Química, UFRJ

Dr. Wagner Seixas da Silva
Prof. Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Dr.^a Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Prof.^a Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Dr. Bruno Lourenço Diaz
Prof. Associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ
(Suplente)

Dr. André Luis Souza dos Santos
Prof. Associado do Instituto de Microbiologia, UFRJ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, carregada de confiança no conhecimento que adquiri ao longo dessa fase.

À amada minha orientadora e “mãe científica” Patricia Zancan por ter aberto as portas de seu laboratório sem me conhecer e estando no seu período sabático. Eu serei eternamente grata por ter me dado essa grande oportunidade de realizar um sonho, por todos os ensinamentos que me foram passados nesses anos dentro e fora do laboratório e por ter se tornado muito mais do que só uma orientadora para mim, mas ser alguém que amo, admiro e sei que poderei sempre contar. O meu “muito obrigada” nunca será o suficiente.

Ao Mauro Sola-Penna por, apesar de toda a implicância, me co-orientar nessa fase, usando um alto teor de sarcasmo em nossas conversas, mas nunca sem responder minhas infinitas dúvidas ou me explicar meus erros.

À Prof^a Dr^a Vilma Godoi, minha “Vilmãe” do laboratório. Que teve toda a paciência de me conquistar quando chegou ao laboratório, mas que se tornou uma das pessoas mais especiais que eu conheci nesse período. Obrigada pela paciência e por todo o carinho.

À minha aluna de iniciação, Amanda Moreira, que cresceu comigo durante todo o mestrado, me ajudando no quesito de ensinar as técnicas e conteúdo de forma didática e divertida. Isso sem contar toda a ajuda prática nos experimentos e paciência com o meu temperamento nos momentos de estresse.

Aos membros da banca, pelo aceite do convite e por contribuir construtivamente para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Aos meus amigos do LabOMol e LabECoM que me ensinaram muito sobre coisas relacionadas ao laboratório e a vida. Obrigada por todas as risadas, cantorias, pela paciência para me ensinar sertanejo, pelas cervejas, desabafos, sucessos e viagens. Especialmente Larissa Paixão e Angélica Lauria, dois tesouros que o laboratório me deu.

Aos meus amigos que contribuíram de alguma forma para a minha formação e crescimento científico, me ajudando no desenvolvimento de ideias, pelo companheirismo, amizade e carinho.

Aos meus pais por terem aceitado o caminho que trilhei e por todo o suporte e investimento que fizeram em mim com carinho, amor, rigidez, sabedoria e aprendizados desde sempre.

Epígrafe

“Your time has come to shine
All your dreams are on their way”

Simon & Garfunkel - Bridge Over Troubled Water

RESUMO

Nas últimas décadas, o número de casos de obesidade no Brasil aumentou de 30% para 56% da população, promovendo um crescimento semelhante nas condições patológicas associadas, como Diabetes Mellitus Tipo 2 e Síndrome Metabólica. O consumo de dietas ocidentais, caracterizado por alimentos altamente processados, contendo alta quantidade de açúcares, sal, gordura e aditivos, está diretamente associado à prevalência de obesidade. Entre todos os aditivos alimentares, o citrato é predominante. O citrato é amplamente utilizado por ser considerado um produto natural, metabolizado pelo corpo e inerte. No entanto, o destino metabólico da sobrecarga de citrato alimentar é desconhecido. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito agudo do citrato no fígado de camundongos. Foram utilizados camundongos C57BL/6 tratados ou não com citrato, submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica por 24h. Foi observado que o citrato: diminui a resposta insulinêmica, por aumentar a intolerância à glicose e diminuir a resposta de marcadores essenciais da sinalização da insulina, como AKT e mTOR; não modifica a expressão proteica de seu transportador, apesar de modular sua expressão gênica; altera o metabolismo de lipídeos, por aumentar a síntese e diminuir a oxidação de ácidos graxos; aumenta marcadores inflamatórios e diminui a expressão de reguladores metabólicos chave, como AMPK e SIRT1. Nossos resultados sugerem, portanto, que o consumo de citrato pode predispor camundongos a alterações metabólicas que contribuem para o desenvolvimento de resistência insulínica e inflamação no fígado. Assim, o consumo elevado de citrato, até então ignorado, pode corroborar com a alimentação contemporânea na epidemia de obesidade.

Palavras-chave: Citrato, Obesidade, Resistência à Insulina, Fígado, Dieta ocidental

ABSTRACT

In the last decades, the number of obesity cases in Brazil increased from 30% to 56% of the population, promoting similar growth of the associated pathological conditions, such as Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. The consumption of western diets, characterized by highly processed foods containing high amounts of sugars, salt, fat and additives, is directly associated with the prevalence of obesity. Among all food additives, citrate is prevalent. Citrate is widely used as it is considered a natural product, metabolized by the body and inert. However, the metabolic destination of food citrate overload is unknown. The objective of this study was to analyze the acute effect of citrate on the liver of mice. C57BL/6 mice were treated with or without citrate, submitted to the standard or hyperlipidic diet for 24 h. It has been observed that citrate: decreases insulinemic response by increasing glucose intolerance and decreasing the response of essential markers of insulin signaling, such as AKT and mTOR; does not modify the protein expression of its transporter, despite of modifying its gene expression; alters the metabolism of lipids, by increasing the synthesis and decreasing the oxidation of fatty acids; increases inflammatory markers and decreases the expression of key metabolic regulators, such as AMPK and SIRT1. Our results suggest, therefore, that the consumption of citrate may predispose mice to metabolic alterations that contribute to the development of insulin resistance and inflammation in the liver. Thus, the high consumption of citrate, previously ignored, can corroborate with the contemporary diet for the obesity epidemic.

Key-words: Citrate, Obesity, Insulin Resistance, Liver, Western Diet

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACLY	ATP:citrato liase
ACT	β -actina
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos Graxos
AHFD	Dieta rica em gordura aterogênica (<i>Atherogenic High Fat Diet</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (<i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>)
Arg 1	Arginase 1
AS160	Substrato de AKT de 160kDa (<i>AKT Substrate of 160kDa</i>)
ASP	Aspartato
AST	Aspartato aminotransferase
ASTR	Transportador de aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido Bicinchonínico
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CFA	Ciclo Filina A
ChREBP	Proteína de ligação de elemento regulador de carboidratos (<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>)
CIC	Transportador de citrato (<i>Citrate carrier</i>)
CO ₂	Gás carbônico
CoA	Coenzima A
CPT 1 α	Transportador carnitina-palmitoil 1 α (<i>Carnitine palmitoyl transporter 1α</i>)
CS	Citrato sintase

DGHA	Doença gordurosa hepática alcóolica
DGHNA	Doença gordurosa hepática não alcóolica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGTA	Ácido egtazico (<i>Egtazic Acid</i>)
EGR2	Proteína de resposta precoce ao crescimento 2 (<i>Early growth response protein 2</i>)
EMR 1	Módulo semelhante a EGF contendo um hormônio parecido à mucina 1 (<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>)
ERK	Cinase reguladora extracelular (<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>)
F1,6BP	Frutose 1,6-Bifosfato
F1,6BPase	Frutose-1,6-Bifosfatase
F2,6BPase	Frutose-2,6-Bifosfatase
F2,6BP	Frutose 2,6-Bifosfato
F6P	Frutose- 6-Fosfato
FADH ₂	Dinucleótido de Flavina Adenina (<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>)
FASN	Ácido graxo sintase (<i>Fatty acid synthase</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FPP	Farnesil pirofosfato
FPR2	Receptor 2 do peptídeo N-formil (<i>N-formyl peptide receptor 2</i>)
G3P	Gliceraldeído-3-Fosfato
G6P	Glicose-6-Fosfato
G6Pase	Glicose-6-Fosfatase
GLUT	Transportador de Glicose
GLS	Glutaminase

GPP	Geranyl pirofosfato
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GRAS	Geralmente reconhecidas como seguras
GTP	Guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HFHSLF	Dieta Hiperlipídica, hipersacarídica e com baixo teor de fibras (<i>High Fat High Sucrose Low Fiber</i>)
HK	Hexocinase
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA
HMGCR	HMG-CoA Redutase
IDH	Isocitrato Desidrogenase
IGF 1	Fator de crescimento semelhantes à insulina 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IL-6	Interleucina-6
INDY	Transportador de membrana de citrato (<i>I'm Not Dead Yet</i>)
IR	Receptor de insulina (<i>Insulin receptor</i>)
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1 (<i>Insulin receptor substrate-1</i>)
J774	Linhagem celular de macrófagos de camundongos
LCFA	Ácidos Graxos de Cadeia Longa (<i>Long Chain Fatty Acid</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial
MAPK	Via das quinases ativadas por sinal mitogênico (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MARCO	Receptor de macrófagos com estrutura colagenosa (<i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i>)
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MCT 1	Transportadores de monocarboxilato 1 (<i>Monocarboxylate transporter 1</i>)
MDH	Malato desidrogenase;
mGPAT	G3P aciltransferase mitocondrial

MLYCD	Malonil-CoA Descarboxilase
MRC 1	Receptor de manose de macrófagos 1 (<i>Macrophage mannose receptor 1</i>)
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína de mamíferos alvo da rapamicina (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
mTORC1	Complexo proteico responsivo à rapamicina
mTORC2	Complexo proteico não responsivo à rapamicina
MUFA	Ácidos Graxos Monoinsaturados (<i>Monounsaturated Fatty Acid</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADPH	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NaF	Fluoreto de sódio
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
NaPPi	Sódio pirofosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
OAA	Oxalacetato
oGTT	Teste de tolerância oral à glicose (<i>Oral glucose tolerance test</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	Proteína Ativadora do Plasminogênio
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDH	Piruvato desidrogenase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpirucato carboxicinase
PFK	Fosfofrutocinase

PGC-1 α	Coativador 1- Alfa do receptor do proliferador de peroxissomo ativado (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PK	Piruvato cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonilo (<i>Phenylmethane sulfonyl fluoride</i>)
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturado (<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>)
PPAR α	Receptor alfa de proliferador de peroxissomo ativado (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>)
PPP	Via das Pentose Fosfato
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RTK	Receptores tirosina-cinases
S6K	Proteína ribossomal S6 cinase
SCD 1	Esteroil-CoA desaturase 1 (<i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>)
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta (<i>Short Chain Fatty Acid</i>)
SDH	Succinato Desidrogenase
SDS	Dodecilsulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS -PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SIRT	Sirtuína
SREBP-1c	Proteína de ligação de elemento regulador de esteroil 1c (<i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i>)
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (<i>Signal transducers and activators of transcription</i>)
TAG	Triglicerídeos
TNF α	Fator de necrose tumoral α
ULK 1	Cinase ativadora de autofagia semelhante à Unc-51 (<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>)

USF-1	Fator estimulador 1 a montante (<i>Upstream Stimulatory Factor 1</i>)
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
ZIP	Transportador de Zinco
Zn	Zinco

Lista de Ilustrações

Figura 1: Gráfico representativo do aumento da prevalência da população com sobrepeso no mundo, nos EUA e no Brasil nos últimos 40 anos.23

Figura 2: Sinalização do receptor de insulina. Na sinalização do receptor de insulina há interação com o seu substrato que promoverá uma a ativação da via metabólica da PI3K e da MAPK. Adaptado de (POLOZ; STAMBOLIC, 2015).28

Figura 3: Esquema metabólico das possíveis origens e destinos do citrato na célula. O citrato mitocondrial pode ser gerado pelo metabolismo da glicose- via glicólise e conversão do piruvato formado em Acetil-CoA pelo complexo PDH, um dos substratos da citrato sintase (CS), ou pelo metabolismo da glutamina mitocondrial, que após ser desaminada à α -cetoglutarato será convertido em isocitrato pela ação da isocitrato desidrogenase (IDH) e posteriormente em citrato. O citrato citosólico pode ter como origem o citrato mitocondrial ou o metabolismo da glutamina citoplasmática. Esse citrato citosólico será convertido à Acetil-CoA pela ATP: citrato liase (ACLY) que é destinado para a via da síntese de ácido graxos, para a via do mevalonato ou para reações de acetilação. Siglas: ACLY – ATP: citrato liase; ACC 1 – Acetil-CoA carboxilase; AG – Ácidos graxos; α -KG – α -cetoglutarato; ECM - Matriz extracelular; FASN – Ácidos graxos sintase; FFP, Farnesil-pirofosfato; GG-PP - Geranyl-pirofosfato; GLS1, glutaminase citosólica; GLS2, glutaminase mitocondrial; HMGCR - HMG-CoA Redutase; IDH 1 – Isocitrato desidrogenase citosólica; IDH 2 – isocitrato desidrogenase mitocondrial; PDH – complexo piruvato desidrogenase. Adaptado de (ZAIDI; SWINNEN; SMANS, 2012).31

Figura 4: Esquema das diferentes formas de utilização do citrato em diferentes células. A - Metabolismo celular típico do citrato através do ciclo do Ácido Cítrico; B - Metabolismo do citrato para a lipogêneses e proliferação celular, onde o citrato proveniente do ciclo do ácido cítrico é externalizado pela proteína transportadora de citrato mitocondrial (CTP) para o citoplasma celular onde poderá ser convertido de AcCoA e OAA pela ACLY, precursores para a síntese de ácidos graxos; C- Metabolismo do citrato em células especializadas na produção de citrato, como por exemplo células do tecido ósseo, onde o aumento dos níveis intracelulares de aspartato, através do ASTR, podem levar ao aumento das concentrações de OAA mitocondrial, pelo reação catalisada pela MAAT, convertendo aspartato em OAA. O aumento das concentrações de OAA acionará o ciclo do Ácido Cítrico, aumentando assim as concentrações de citrato através da ação da CS. O ciclo pode ser interrompido pela presença de Zn na mitocôndria, tendo sua concentração aumentada por seu transportador ZIP, que impede a ação da aconitase. O aumento da concentração mitocondrial de citrato levará a sua externalização pelo CTP para o citosol que será utilizado para manter a homeostase de citrato no plasma. Siglas: AcCoA – Acetil-CoA; ACLY – ATP: citrato liase; ASP – Aspartato; ASTR – Transportador de aspartato; α KG – α Cetoglutarato; CS – Citrato sintase; CTP – Transportador de citrato; Fum – Fumarato; Isocit – Isocitrato; MAAT – Aspartato aminotransferase mitocondrial; MDH – Malato desidrogenase; OAA – Oxalacetato; Succ – Succinato; Zn – Zinco; ZIP – Transportador de Zinco. Adaptado de (COSTELLO; FRANKLIN, 2016).33

Figura 5: Representação esquemática das vias metabólicas que se relacionam com citrato e seu transportador mitocondrial. Em uma condição energética normal numa célula, a glicose é convertida em piruvato, pelo processo da glicólise no citoplasma celular. Esse piruvato é transportado para dentro da matrix mitocondrial através de seu transportador de membrana, descarboxilado a Acetil-CoA e condensado ao OAA, substrato do ciclo do Ácido Cítrico, e convertidos à citrato. O citrato mitocondrial pode ser externalizado para o citosol através de seu transportador de membrana. O citrato citosólico é um inibidor alostérico da enzima PFK-1, uma das enzimas controladoras da glicólise, e um ativador da ACC, ligada a DNL. O citrato citosólico é dissociado em Acetil-CoA e OAA e o Acetil-CoA poderá ser utilizado para síntese de colesterol e síntese de ácidos graxos, carboxilando-o

em Malonil-CoA, pela ação da ACC, que, além de ser um inibidor do transportador de membrana de ácidos graxos (CPT1) e conseqüentemente da β -oxidação, ainda é substrato para a FASN na via de lipogênese *de novo*. Siglas ACC - Acetil-CoA carboxilase; CPT 1 – transportador de carnitina-palmitoil 1; CPT 2 – Transportador de carnitina-palmitoil 2; DNL – Via de lipogênese *de novo*; FASN – ácido graxo sintase; IMS – Membrana interna mitocondrial; OAA – oxalacetato; OMM – Membrana externa mitocondrial; PFK 1 – fosfofrutocinase 1. Adaptado de (GIUDETTI et al., 2016).36

Figura 6: Representação esquemática do ciclo do Ácido Cítrico, que ocorre no interior na membrana interna mitocondrial. O Oxaloacetato e acetil-CoA, pela ação da citrato sintase, são convertidos em citrato. O citrato, pela ação da enzima aconitase, é convertido em isocitrato. O isocitrato, através da isocitrato desidrogenase, é convertido em α -cetoglutarato, liberando uma molécula de NADP⁺. α -cetoglutarato então é convertido em Succinil-CoA pela α -cetoglutarato desidrogenase, liberando uma molécula de NADH e CO₂. A succinil-CoA é convertida em succinato pela succinato-CoA ligase, liberando uma molécula de trifosfato (ATP/GTP). O succinato, através da succinato desidrogenase, é convertido em fumarato, liberando uma molécula de FADH₂, e esse fumarato é convertido em malato pela fumarato hidratase. Por fim o malato é convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase liberando uma molécula de NADH. Adaptado de (RAIMUNDO; BAYSAL; SHADEL, 2011).38

Figura 7: Gráfico comparativo da interferência da dieta sobre o peso dos animais (A); Comparação da quantidade de alimento ingerido pelos animais após 24h (B); Comparação da quantidade de calorias ingeridas por cada grupo de animal após 24h (C). A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa (p<0,05); médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.54

Figura 8: Teste de Tolerância a Glicose. (A) Valores de glicemia ao longo do tempo, aferindo em 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem com 5 mg de glicose/kg de peso corporal; (B) Área sob as curvas. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa (p<0,05) entre os valores ponto a ponto do controle (Chow) e os demais grupos. Médias comparadas por teste t de Student ou ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey, quando oportuno.55

Figura 9: Análise do perfil proteico referente a cascata de sinalização da insulina após um dia de dieta na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta das proteínas da via de sinalização da insulina por immunoblotting; (B) Quantificação do perfil de fosforilação de AKT (T308); (C) Quantificação do perfil de fosforilação de mTOR (S2448); (D) Quantificação do perfil de fosforilação de RICTOR (T1135); (E) Quantificação do perfil de fosforilação de AKT (S473). A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).59

Figura 10: Análise do transportador de citrato na membrana plasmática após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta do transportador de citrato da membrana plasmática SLC13A5 por *immunoblotting*; (B) Quantificação do *Immunoblotting* apresentado no painel A; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene *MINDY* por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.....60

Figura 11: Análise do nível de expressão de fatores ligados a via da gliconeogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima PEPCK por *immunoblotting*; (B) Quantificação do *Immunoblotting* apresentado no painel A; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da PEPCK por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.....62

Figura 12: Análise da interferência da dieta e do citrato na quantidade de triglicerídeos hepáticos. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores ponto a ponto do controle (Chow) e os demais grupos; médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.63

Figura 13: Análise do nível de expressão de enzimas chaves na via da lipogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima ACLY por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta das enzimas ACLY no *immunoblotting*; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da ACLY, ACC 1, ACC 2 e CPT1 α por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.....65

Figura 14: Análise do nível de expressão de enzimas chaves na via da lipogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da FASN, Elovl1 e SCD1 por qRT-PCR. (B) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima SCD 1 por *immunoblotting*; (C) Quantificação do perfil de resposta da enzima SCD1; A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra

verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.67

Figura 15: Análise do perfil inflamatório na presença do citrato após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta do marcador inflamatório TNF α por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta do marcador inflamatório TNF α ; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da IL-6, EMR1, MARCO e MRC1 por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.69

Figura 16: Análise por q-RT PCR de marcadores de polarização de macrófagos em cultura de célula J774. As barras azuis representam o grupo controle de células 24h com o meio em adição de nenhum composto enquanto que as barras vermelhas representam as células que foram submetidas ao tratamento de 24h de 2mM de citrato de sódio. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores. Médias comparadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey.70

Figura 17: Análise da resposta de reguladores metabólicos na presença do citrato em ambas as dietas após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta de ERK 1/2 (T202/Y204) por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta de ERK 1/2 (T202/Y204) no *immunoblotting*. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).71

Figura 18: Análise da resposta de reguladores metabólicos na presença do citrato em ambas as dietas após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta de AMPK (T172) por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta de AMPK (T172) no *immunoblotting*. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).72

Figura 19: Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da SIRT1 por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.73

Figura 20: Análise da resposta de reguladores metabólicos após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas de PGC1 α por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta do regulador metabólico PGC 1 α no *immunoblotting*; (C) Quantificação do nível de

expressão de mRNA do gene da PGC1 α por qRT-PCR; (D) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da PPAR α por qRT-PCR; (E) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da SREBP1c por qRT-PCR; (F) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da LXR por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey.75

Figura 21: Representação esquemática de vias metabólicas afetadas por moléculas de citrato intracelular. Adaptado de (WILLMES; BIRKENFELD, 2013)80

Figura 22: Via da síntese *de novo* de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e regulação de genes lipogênicos por fatores de transcrição (LXR, SREBP-1c e ChREBP). Siglas: ACLY, ATP-citrato liase; ACC, acetil-CoA carboxilase; FASN, ácido graxo sintase; ELOVL6, membro da família de alongamento de AG de cadeia longa 6 (elongase 6); SCD, esteroil-CoA dessaturase; LXR, receptor de fígado X; SREBP-1c, proteína de ligação ao elemento regulador do esterol 1c; ChREBP, proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos. Adaptado de (STRABLE; NTAMBI, 2010)83

Figura 23: Representação esquemática da ação de SIRT 1 sobre o metabolismo de lipídeos. Adaptado de (DING; BAO; DENG, 2017)88

Figura 24: Representação esquemática do efeito do citrato no metabolismo do fígado dos camundongos após 1 dia de dieta.90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de primers dos genes de interesse, para a sonda Sybr® Green, utilizados no ensaio de q-RT PCR.....	49
Tabela 2: Lista de primers dos genes de interesse, para a sonda TaqMan®, utilizados no ensaio de q-RT PCR	49
Tabela 3: Lista de anticorpos primários utilizados no trabalho.	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBESIDADE	23
1.2	ALTERAÇÕES METABÓLICAS ASSOCIADAS À OBESIDADE	25
1.3	RESISTÊNCIA À INSULINA E DIABETES MELLITUS TIPO 2	27
1.4	CITRATO E METABOLISMO ENERGÉTICO DA CÉLULA	30
1.4.1	TRANSPORTADORES DE CITRATO	32
1.4.2	CITRATO E GLICÓLISE	37
1.4.3	CITRATO E METABOLISMO DE LIPÍDEOS	39
1.4.4	CITRATO E INFLAMAÇÃO	40
1.5	JUSTIFICATIVA	42
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVOS GERAIS	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	METODOLOGIA	44
3.1	ANIMAIS E DIETA	44
3.2	AMOSTRAS DE SANGUE	46
3.3	TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE	46
3.4	AMOSTRAS DE TECIDO	46
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICOS	46
3.6	PCR	47
3.6.1	EXTRAÇÃO DE RNA	47
3.6.2	SÍNTESE DE cDNA	47
3.6.3	qRT-PCR	47

3.7	<i>IMMUNOBLOTTING</i>	49
3.7.1	WESTERN BLOT	50
3.8	CULTURA DE CÉLULAS	51
3.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	52
4	RESULTADOS	53
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÃO	91
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9	ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

Nos últimos 40 anos, o número de pessoas com sobrepeso e obesidade cresceu na população mundial, sendo que no Brasil passou de 30% para 56% da população (WHO, 2018) (**Figura 1**). Ainda, de forma importante, esse crescimento tem sido independente do gênero (POPKIN, 2013) e da posição sócio-econômica da população (MENDEZ; MONTEIRO; POPKIN, 2009). O excesso de peso e a obesidade têm sido apontados como uma pandemia moderna e com forte impacto sobre a saúde humana e a economia dos governos (WHO, 2018).

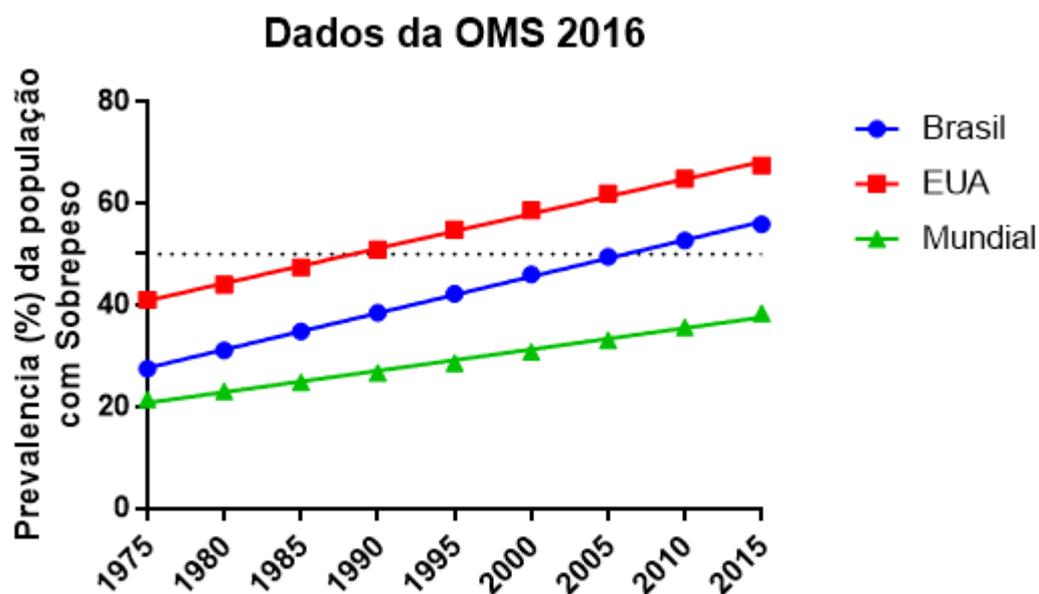


Figura 1: Gráfico representativo do aumento da prevalência da população com sobrepeso no mundo, nos EUA e no Brasil nos últimos 40 anos.

A obesidade é o resultado de um desequilíbrio por um longo período de tempo entre uma elevada ingestão e um reduzido gasto energético, onde o excedente de energia fornecido ao corpo será estocado principalmente como gordura no tecido adiposo. O acúmulo de gordura pode levar a mudanças metabólicas no indivíduo que facilitam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hepáticas, dislipidêmicas, do sistema reprodutor, relacionadas ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, ligadas à resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (KERSHAW; FLIER, 2004;

ABRAHAMIAN; KAUTZKY-WILLER, 2016; GONZÁLEZ, 2017; LENGYEL et al., 2018; REPOUSI et al., 2018).

O aumento no número de pessoas obesas está ligado à transição nutricional que a humanidade vem sofrendo, passando de uma alimentação baseada em caça, alimentos vegetais coletáveis e uma dieta variada para uma dieta rica em gordura, açúcar, alimentos altamente processados, refinados, sal e conservantes, além de um baixo consumo de fibras (POPKIN; ADAIR; NG, 2013; NEYRINCK et al., 2018). Estudos mostram que a dieta hiperlipídica leva a várias alterações em metabólitos importantes envolvidos no metabolismo de energia, carboidratos, nucleotídeos, lipídios e aminoácidos em adipócitos (CUMMINS et al., 2014) e em outros tipos celulares. Dessa forma, as alterações metabólicas provenientes da alta ingestão de sal, açúcar e gordura já são bem conhecidas e elucidadas na literatura. Porém, sobre o efeito dos aditivos e conservantes utilizados pela a indústria alimentícia, ainda há poucos estudos (CORDAIN et al., 2005; LIPSKI, 2010).

Dentre esses, um dos aditivos mais utilizados é o citrato, um íon quimicamente estável de boa absorção e metabolização que tem como função ajustar o pH, ser agente quelante e aromatizador (PAULA NETO et al., 2017). Além disso é considerado um produto natural por ser um metabólito comum ao metabolismo oxidativo e de elevada síntese endógena dentre os eucariotos (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018). Tanto o citrato endógeno quanto o exógeno podem ser completamente metabolizados e servem como fonte de energia. Sabe-se que 65-90% desse citrato é filtrado e reabsorvido pelos glomérulos renais e somente 10% desse citrato é excretado na urina (FIUME et al, 2014).

A quantidade de citrato adicionado aos alimentos pela indústria alimentícia é de cerca de 500 mg/ pessoa por dia. Esta quantidade existe naturalmente em 60 mL de suco de laranja e não constitui um acréscimo significativo à carga corporal total. Embora os dados sobre os efeitos agudos e crônicos do citrato de sódio, citrato de cálcio e citrato de potássio administrados por via oral sejam limitados, nenhum efeito biológico dessas substâncias causa preocupação com a segurança já que as agências reguladoras as consideram moléculas GRAS (Geralmente Reconhecidas

como Seguras), usadas em quantidades razoáveis e de acordo com tolerâncias e limitações prescritas (PAULA NETO et al., 2017; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018). Contudo, dados do nosso grupo de pesquisa indicam que o consumo de citrato pode ser um agente causal de complicações associadas à obesidade (LEANDRO et al., 2016).

1.2 ALTERAÇÕES METABÓLICAS ASSOCIADAS À OBESIDADE

A visão tradicional do tecido adiposo como reservatório passivo para armazenamento de energia mudou a partir da identificação deste como um importante local para o metabolismo de esteroides sexuais (SIITERI, 1987) e produção de adiposina - fator endócrino - regulado negativamente na obesidade em roedores (FLIER et al., 1987). A subsequente identificação e caracterização da leptina, confirmou a atuação do tecido adiposo como órgão endócrino (ZHANG et al., 1994). Sabe-se agora que o tecido adiposo expressa e secreta uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, que atuam tanto no nível local (autócrino/parácrino) como sistêmico (KERSHAW; FLIER, 2004), enfatizando a importância das consequências metabólicas provenientes ao seu excesso.

A hiperplasia dos adipócitos, muito além da sua capacidade de depositar e mobilizar triglicérides, retinóides e colesterol, levará ao aumento da síntese e liberação de uma variedade de peptídeos e não-peptídeos incluindo adiponectina, resistina, leptina, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e proteína ativadora do plasminogênio (PAI) (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2007; WOZNIAK et al., 2009) .

O aumento da produção de leptina e outras proteínas reguladoras do metabolismo glicolítico, por exemplo, somado à ação da insulina na obesidade, pode, dentre outros, promover uma resistência celular às ações desses hormônios nos tecidos. A inflamação direta e indiretamente influenciada pelos adipócitos, consequência do aumento de fatores como TNF α e IL-6, poderão modular negativamente a sinalização de leptina e insulina, além de estimular o fígado a produzir proteínas inflamatórias de fase aguda (LAZAR, 2005; NELSON & COX, 2008).

Além do tecido adiposo, o fígado também possui o seu metabolismo alterado numa situação de excesso energético, pois é um órgão metabólico chave na homeostase energética do corpo (RUI, 2014). A nível do metabolismo de macromoléculas, ele atua como um coletor/distribuidor conectado metabolicamente a vários tecidos, incluindo trato gastrointestinal, músculo esquelético e tecido adiposo, de elevada capacidade lipolítica/lipogênica, glicolítica/gliconeogênica e glicogenogênica/glicogenolítica.

A digestão das macromoléculas do alimento no trato gastrointestinal gera glicose, ácidos graxos (AG) e aminoácidos. Os AGs incorporados ao sistema linfático atingem o fígado via circulação sistêmica, já a glicose e os aminoácidos são absorvidos pela circulação mesentérica e transportados para o fígado através do sistema porta-hepático. No estado pós-prandial, a glicose é inicialmente armazenada em glicogênio e o excedente é convertido em AG ou aminoácidos. Nos hepatócitos, os AG livres são esterificados com glicerol-3-fosfato (G3P) para gerar triglicerídeos (TAG). O TAG é armazenado em gotículas lipídicas ou secretado na circulação como partículas de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Os aminoácidos são usados para sintetizar proteínas, glicose e/ou outras moléculas bioativas, ou metabolizados para fornecer energia. Durante o jejum e o exercício, o fígado fornece a glicose e os corpos cetônicos resultantes da β -oxidação como metabólitos essenciais para a sobrevivência dos tecidos extra-hepáticos (RUI, 2014).

O metabolismo energético do fígado é rigidamente controlado pois deste depende a homeostase das moléculas energéticas circulantes, tanto o armazenamento (quando há excedente) como a mobilização (quando há carência). Múltiplos sinais neuronais, hormonais e nutricionais já foram identificados na regulação do metabolismo de glicose, lipídios e aminoácidos no fígado. Dessa forma, a disfunção da sinalização e do metabolismo hepático decorrente da elevada ingestão energética pode predispor ou causar, por exemplo, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e/ou DM2 (RUI, 2014).

A obesidade está altamente associada à resistência à insulina já que, em indivíduos obesos, a perturbação do metabolismo de glicose e lipídios no fígado é um componente crítico para essa patogenia (CUMMINS et al., 2014; ENGIN, 2017;

GEISLER; RENQUIST, 2017; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017; MARTINEZ; LEONE; CHANG, 2017; MOYER et al., 2017; POLOZ; STAMBOLIC, 2015; POPKIN; ADAIR; NG, 2013; REDDY; RAO, 2006). Nesse trabalho, avaliou-se os mecanismos moleculares iniciais para o desenvolvimento de resistência à insulina relacionados à alta ingestão de alimentos com alta carga calórica, focando principalmente nos marcadores ligados à DM2.

1.3 RESISTÊNCIA À INSULINA E DIABETES MELLITUS TIPO 2

Na evolução do DM2, cada um dos mecanismos básicos decorrentes apresenta um padrão específico, possivelmente tendo início até dez anos antes do diagnóstico. Envolve um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que se caracterizam por alterações do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, associadas a elevada concentração de glicose plasmática. É uma condição que se instala na decorrência de desajustes que envolvem processos de resistência insulínica, defeitos na secreção e ação da insulina e falta de inibição da produção hepática de glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Tanto a resistência à insulina quanto a deficiência insulínica apresentam uma curva ascendente nas fases iniciais do processo que evoluem em compasso com o progressivo aumento da resistência à insulina. As células β pancreáticas tentam compensar com um aumento inicial na secreção de insulina (SAAD, MACIEL E MENDONÇA, 2007), mantendo assim os níveis plasmáticos de glicose. Com o progresso da doença ocorrem alterações funcionais acentuadas e os pacientes apresentam diminuição na secreção de insulina e eventualmente apresentam perda da massa total de células β pancreáticas (TAKIISHI et al., 2012). Os mecanismos envolvidos na patogenia do DM2 podem ser precipitados pela presença de certos fatores como a predisposição genética, a obesidade, o sedentarismo, a elevação de AG livres e citocinas pró-inflamatórias. (TAKIISHI et al., 2012).

A resistência à insulina caracteriza-se por uma série de alterações em vários estágios da via de transmissão do sinal insulínico. A via de sinalização da insulina é realizada através do eixo da Fosfatidilinositol-3-cinase/ Proteína cinase B/ proteína de mamíferos alvo da rapamicina (PI3K/AKT/mTOR) (**Figura 2**), que desempenha

um papel importante na regulação do metabolismo, regulando glicose-6-fosfatase (G6Pase), fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), frutose-2,6-bifosfatase (F2,6BPase), coativador 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) e a proteína de ligação de elemento regulador de estero 1 (SREBP-1) (ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2015).

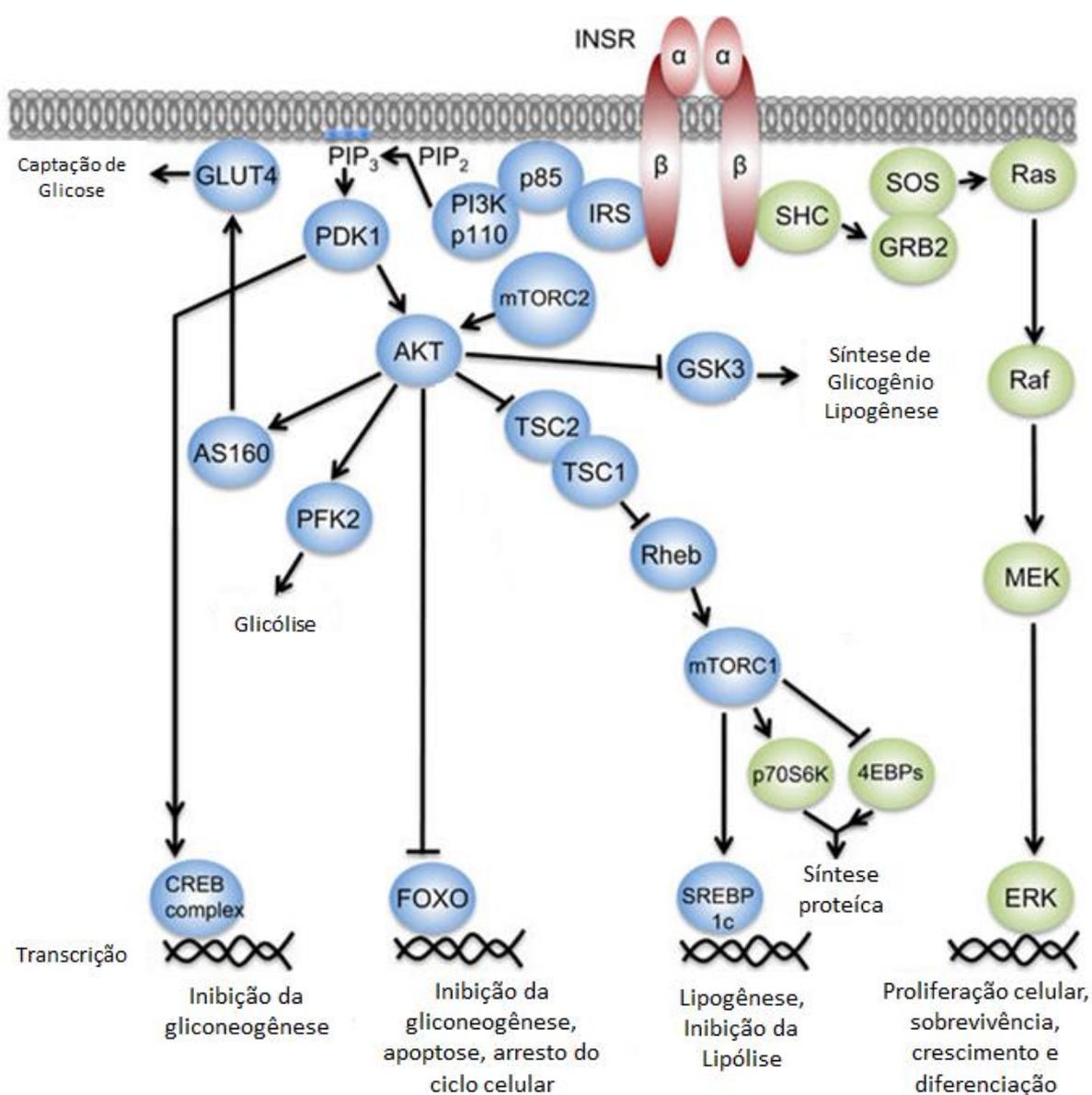


Figura 2: Sinalização do receptor de insulina. Na sinalização do receptor de insulina há interação com o seu substrato que promoverá a ativação da via metabólica da PI3K e da MAPK. Adaptado de (POLOZ; STAMBOLIC, 2015).

Quando os receptores de insulina são ativados, eles fosforilam o substrato do receptor de insulina (IRS), que então se liga à proteína PI3K, ativando moléculas como proteína cinase C (PKC), AKT e o substrato de AKT de 160kDa (AS160). Isso leva à translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) nos tecidos muscular e adiposo, aumentando a captação de glicose, e regulando o metabolismo da glicose (ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2015).

A AKT desempenha um papel essencial em muitos processos fisiológicos básicos, como crescimento celular, metabolismo e sobrevivência; sua desregulação contribui criticamente para várias anormalidades patológicas, incluindo câncer e DM2 (MANNING; TOKER, 2017). Uma vez ativada, a AKT exerce seu efeito por meio da fosforilação de várias proteínas citoplasmáticas, sendo uma das principais a serina/treonina cinase mTOR. Esta detecta níveis de nutrientes, presença de fatores de crescimento e estado de energia celular, e modula vários processos anabólicos e catabólicos para manter o metabolismo e o crescimento celular (HATANO et al., 2015). A proteína mTOR interage com uma série de proteínas formando dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 está ligado a ativação da proteína ribossomal S6 cinase (S6K), indução da biogênese lipídica ativando os fatores de transcrição como SREBP-1 e pelo receptor alfa do proliferador ativado de peroxissomo (PPAR), inibição da autofagia pela cinase ativadora de autofagia semelhante à Unc-51 (ULK1) e transcrição. O complexo mTORC2 está mais ligado a ativação dos receptores de insulina (IR) e à fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF1) além da manutenção do citoesqueleto de actina (ARDESTANI et al., 2017). Nesse segundo complexo proteico, uma de suas sub-unidades componentes se chama RICTOR, que está diretamente ligado a fosforilação de AKT no resíduo de serina 473 (YUAN et al., 2018).

Estudos *in vivo* em modelos de doenças como obesidade e diabetes sugerem que a via mTORC2 é crítica para a homeostase adequada da glicose e regulação metabólica no organismo (CYBULSKI et al., 2009; HAGIWARA et al., 2012; KLEINERT et al., 2016; KUMAR et al., 2010; LEE; JUNG; GUERTIN, 2017; TANG et al., 2016; YUAN et al., 2012). Em camundongos RICTOR *knockouts*, a perda de mTORC2 funcional no tecido adiposo, fígado e músculo altera profundamente o metabolismo autônomo e sistêmico da célula, bem como as comunicações cruzadas

de órgãos (CYBULSKI et al., 2009; HAGIWARA et al., 2012; KLEINERT et al., 2016; KUMAR et al., 2010; LEE; JUNG; GUERTIN, 2017; SATO et al., 2014; TANG et al., 2016; YUAN et al., 2012). Esses estudos mostraram a importância de mTORC2 na homeostase da glicose, ativando a captação de glicose, regulando positivamente a glicólise e suprimindo a gliconeogênese hepática e, assim, tornando o mTORC2 um alvo terapêutico para a obesidade e a DM2 (LAMMING et al., 2012; LEE; JUNG; GUERTIN, 2017; SATO et al., 2014).

Entre as alterações relacionadas à resistência à insulina destaca-se a redução da atividade cinásica do IR e a redução da fosforilação dos seus substratos, tanto do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) quanto do substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2). Por consequência, a atividade da PI3K também será afetada. Há redução também da transdução de sinal que resulta na translocação dos transportadores de glicose denominados de GLUTs (particularmente GLUT4), assim como da atividade de diversas vias e enzimas intracelulares. Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado que a ativação da via da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) pela insulina não está reduzida na resistência à insulina, podendo, até mesmo, estar aumentada (SAAD, MACIEL E MENDONÇA, 2007). Ou seja, a resistência à insulina não é um quadro uniforme, mas sim um mosaico de diferentes alterações metabólicas celulares que atinge todo o organismo. A resistência à insulina em órgãos alvo clássicos, como fígado, músculo e tecido adiposo, se somaria a resistência à insulina encontrada em outros tecidos como, por exemplo, na própria célula β pancreática e no sistema nervoso central.

1.4 CITRATO E METABOLISMO ENERGÉTICO DA CÉLULA

Como já foi falado anteriormente, o citrato é o principal aditivo utilizado pela indústria alimentícia por sua versatilidade e por ser uma molécula já presente no metabolismo do organismo. Apesar disso, não há muitos estudos que mostrem o impacto de sua ingestão sobre a saúde. Por muitos anos, o citrato foi associado a um papel essencialmente bioenergético no metabolismo celular por ser um substrato importante utilizado pelas mitocôndrias e, ao ser externalizado no citoplasma, por ser um dos principais substratos para a síntese de AG. O nível de citrato dentro das células exerce função correguladora chave das vias envolvidas na produção de

energia, porque inibe ou ativa importantes enzimas estratégicas da glicólise, do ciclo do Ácido Cítrico, da gliconeogênese e da lipogênese (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014) (Figura 3).

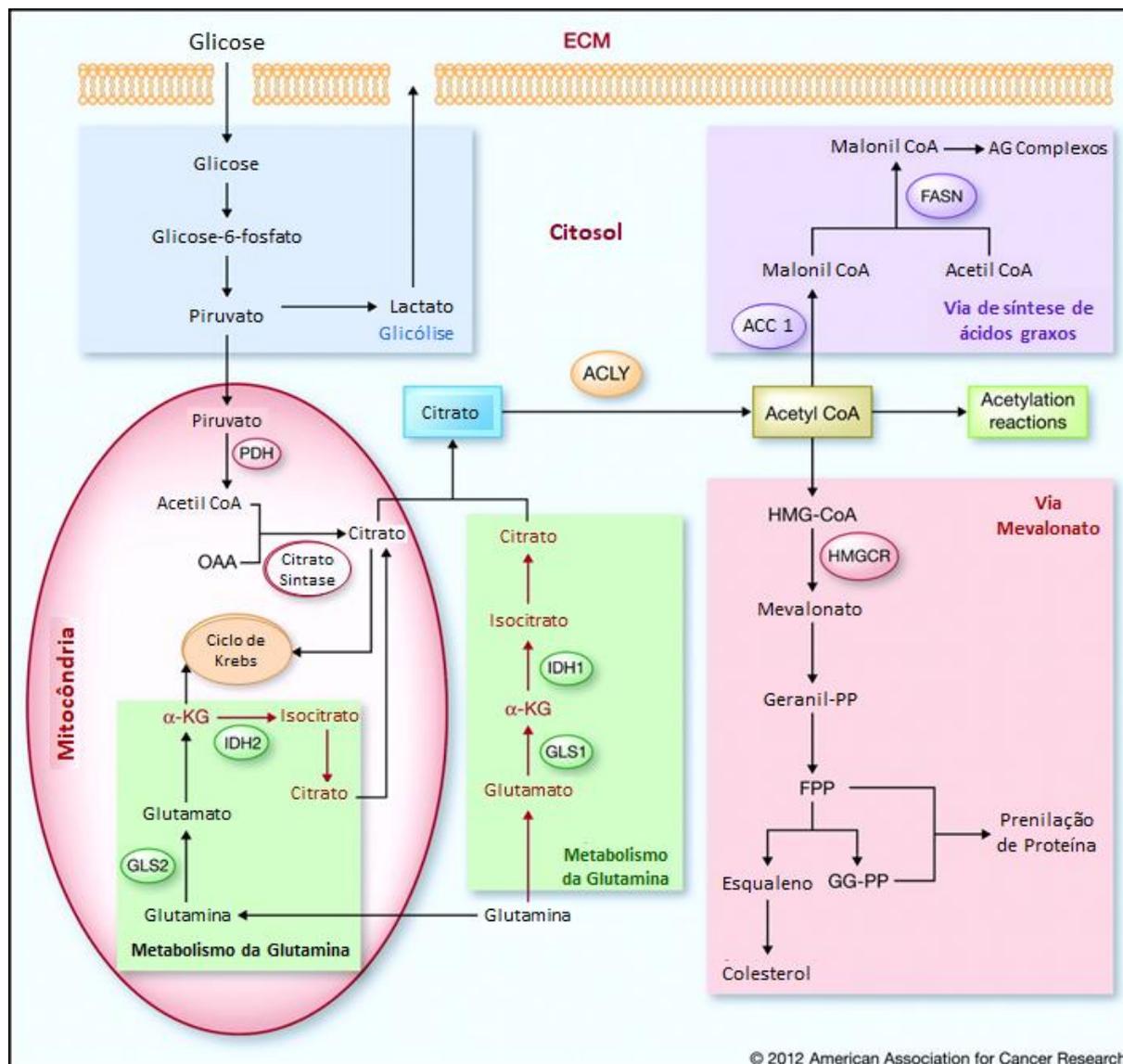


Figura 3: Esquema metabólico das possíveis origens e destinos do citrato na célula. O citrato mitocondrial pode ser gerado pelo metabolismo da glicose- via glicólise e conversão do piruvato formado em Acetil-CoA pelo complexo PDH, um dos substratos da citrato sintase (CS), ou pelo metabolismo da glutamina mitocondrial, que após ser desaminada à α -cetogluturato será convertido em isocitrato pela ação da isocitrato desidrogenase (IDH) e posteriormente em citrato. O citrato citosólico pode ter como origem o citrato mitocondrial ou o metabolismo da glutamina citoplasmática. Esse citrato citosólico será convertido à Acetil-CoA pela ATP: citrato liase (ACLY) que é destinado para a via da síntese de ácido graxos, para a via do mevalonato ou para reações de acetilação. Siglas: ACLY – ATP: citrato liase; ACC 1 – Acetil-CoA carboxilase; AG – Ácidos graxos; α -KG – α -cetogluturato; ECM - Matriz extracelular; FASN – Ácidos graxos sintase; FPP, Farnesil-pirofosfato; GG-PP - Geranyl-pirofosfato; GLS1, glutaminase citosólica; GLS2, glutaminase mitocondrial; HMGCR - HMG-CoA Redutase; IDH 1 – Isocitrato desidrogenase citosólica; IDH 2 – isocitrato desidrogenase mitocondrial; PDH – complexo piruvato desidrogenase. Adaptado de (ZAIDI; SWINNEN; SMANS, 2012).

Porém o citrato também está envolvido em processos inflamatórios, câncer, homeostase óssea, secreção de insulina, distúrbios neurológicos, doença gordurosa hepática não-alcóolica (DGHNA), além de ser doador essencial de grupos Acetil-CoA para a acetilação de proteínas e ácidos nucleicos (FLAMEZ et al., 2002; IACOBAZZI; INFANTINO, 2014; LEANDRO et al., 2016; MYCIELSKA et al., 2018; PIETROCOLA et al., 2015; SALMINEN et al., 2015).

1.4.1 TRANSPORTE DE CITRATO

A concentração do citrato plasmático é mantida constante nos animais, correspondendo em humanos, a valores entre 100-150 μM . A exposição a condições que tendem a aumentar ou diminuir o citrato plasmático, além dessa faixa normal, desencadeará respostas fisiológicas, endócrinas e metabólicas que restauram e mantêm a concentração normal de citrato plasmático. Se a concentração de citrato no plasma é sustentada numa concentração diminuída ou aumentada para além do intervalo normal, existe hipocitricemia ou hipercitricemia que é indicativa de um estado fisiopatológico (COSTELLO; FRANKLIN, 2016).

É evidente que existe um equilíbrio entre o citrato que entra e o citrato que é removido da circulação, o que resulta na manutenção da concentração de citrato no plasma. As visões predominantes ao longo do tempo incluíram o citrato dietético como fonte exógena, o osso como reservatório de citrato e o metabolismo celular/tecidual como fonte endógena *de novo* de citrato plasmático. Considera-se que a remoção de citrato da circulação resulta da sua excreção urinária, da sua deposição no osso e da sua captação e metabolismo por várias células/tecidos (COSTELLO; FRANKLIN, 2016) (**Figura 4**).

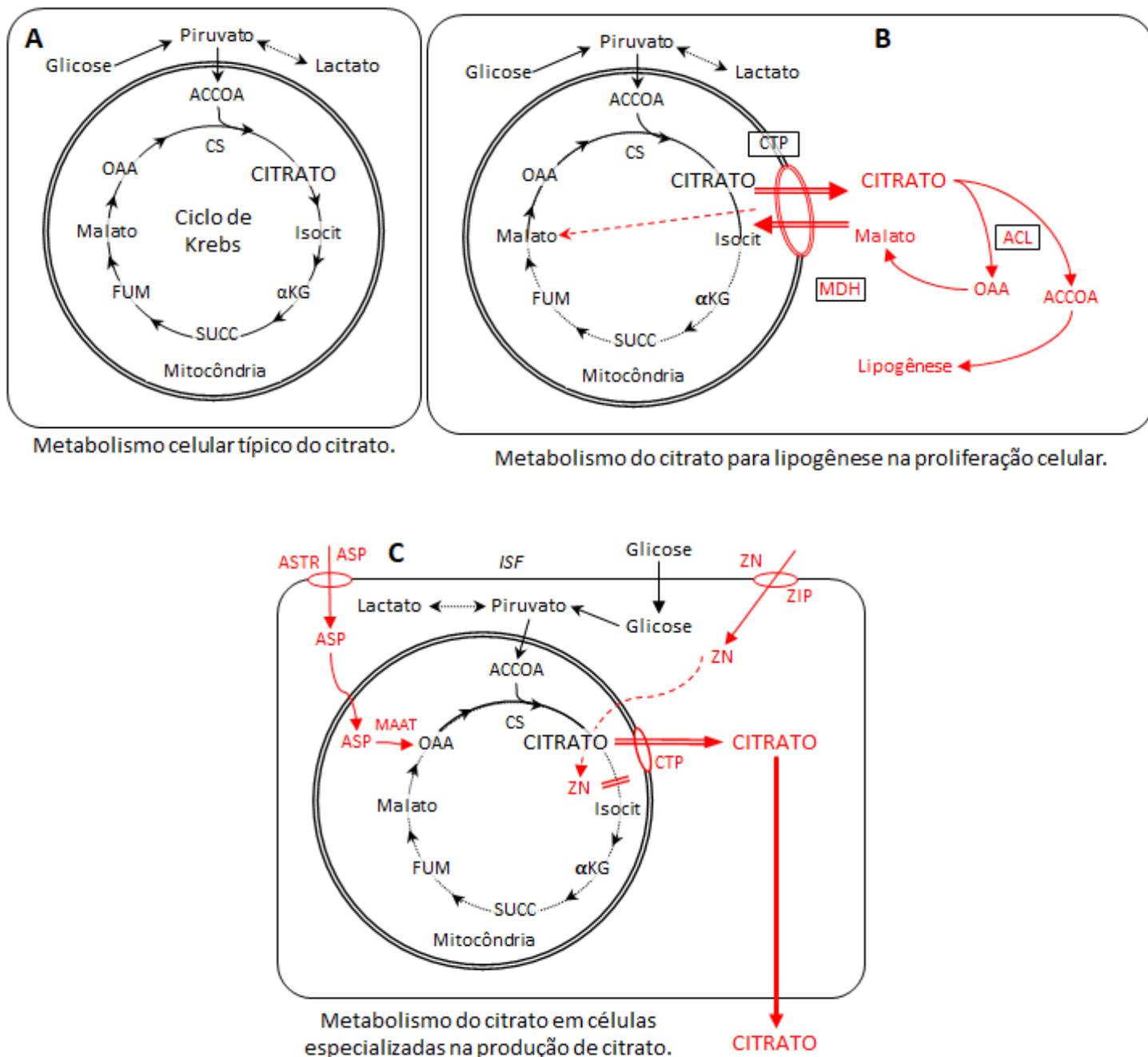


Figura 4: Esquema das diferentes formas de utilização do citrato em diferentes células. A - Metabolismo celular típico do citrato através do ciclo do Ácido Cítrico; B - Metabolismo do citrato para a lipogênese e proliferação celular, onde o citrato proveniente do ciclo do ácido cítrico é externalizado pela proteína transportadora de citrato mitocondrial (CTP) para o citoplasma celular onde poderá ser convertido de AcCoA e OAA pela ACLY, precursores para a síntese de ácidos graxos; C- Metabolismo do citrato em células especializadas na produção de citrato, como por exemplo células do tecido ósseo, onde o aumento dos níveis intracelulares de aspartato, através do ASTR, podem levar ao aumento das concentrações de OAA mitocondrial, pelo reação catalisada pela MAAT, convertendo aspartato em OAA. O aumento das concentrações de OAA acionará o ciclo do Ácido Cítrico, aumentando assim as concentrações de citrato através da ação da CS. O ciclo pode ser interrompido pela presença de Zn na mitocôndria, tendo sua concentração aumentada por seu transportador ZIP, que impede a ação da aconitase. O aumento da concentração mitocondrial de citrato levará a sua externalização pelo CTP para o citosol que será utilizado

para manter a homeostase de citrato no plasma. Siglas: AcCOA – Acetil-CoA; ACLY – ATP: citrato liase; ASP – Aspartato; ASTR – Transportador de aspartato; α KG – α Cetogluturato; CS – Citrato sintase; CTP – Transportador de citrato; Fum – Fumarato; Isocit – Isocitrato; MAAT – Aspartato aminotransferase mitocondrial; MDH – Malato desidrogenase; OAA – Oxalacetato; Succ – Succinato; Zn – Zinco; ZIP – Transportador de Zinco. Adaptado de (COSTELLO; FRANKLIN, 2016).

O citrato ingerido é absorvido do trato digestivo para a circulação porta-hepática e, finalmente, para a circulação sistêmica. Quando disponível, é uma importante fonte de citrato no plasma, no entanto, o citrato dietético não é necessário para a manutenção da concentração normal de citrato plasmático (COSTELLO; FRANKLIN, 2016).

Desde a primeira identificação em 1941 (DICKENS; DICKENS, 1941), foi estabelecido que os ossos em vertebrados fixam 90% do citrato total no corpo, constituindo assim um importante reservatório de citrato. O citrato liberado pelos ossos no plasma durante a reabsorção óssea é a principal fonte de citrato para manter a concentração plasmática normal (COSTELLO et al., 2014). Como a membrana plasmática das células é altamente impermeável ao citrato, é necessário transportadores específicos para a captação celular e para sua homeostase.

A família de carreadores Slc13 compreende cinco membros, sendo que três destes [Slc13a2 (NaDC1), Slc13a3 (NaDC3) e Slc13a5 (NaCT)] cotransportam di- e tricarboxilatos com múltiplos íons de sódio nas células. Os transportadores de sulfato acoplados a sódio 1 e 2 (NaS1 e NaS2), respectivamente codificados por SLC13A1 e SLC13A4, não são considerados transportadores principais de dicarboxilatos e tricarboxilatos. O transportador de citrato acoplado a sódio (NaCT) e transportadores de dicarboxilato acoplados a sódio 1 e 3 (NaDC1 e NaDC3) são responsáveis pelo transporte de intermediários aniônicos celulares, como citrato e succinato, do sangue para as células, onde esses intermediários podem servir como fontes de energia ou moléculas de sinalização intracelular (PAJOR, 2007, 2014).

Em humanos, a expressão de Slc13a5 é principalmente restrita ao fígado, cérebro e glândulas salivares, e o NaCT transporta principalmente citrato para esses tecidos. Os Slc13a2 e Slc13a3 são expressos no rim e intestino para regular excreção e absorção de citrato, respectivamente, mas a expressão desses dois transportadores também é detectável em outros tecidos. Ao contrário do NaCT, o NaDC1 e o NaDC3 têm uma maior afinidade pelo succinato em relação ao citrato de

trianiônico. O Slc13a5 é o transportador de citrato predominantemente expresso no fígado humano (MEDSKER et al., 2016).

O camundongo *knockout* para corpo inteiro de Slc13a5 demonstrou promover um fenótipo metabólico positivo aumentando a responsividade hepática à insulina e reduzindo a carga lipídica hepática por meio do aumento da β -oxidação celular e da redução da lipogênese *de novo* (DNL) em hepatócitos isolados (POOLSRI et al., 2018). Dessa forma, a inibição da captação de citrato hepático pela inibição de Slc13a5 poderia beneficiar pacientes com doenças metabólicas, reduzindo o fluxo de citrato para o fígado e, presumivelmente, exercendo os benefícios metabólicos através da modificação de metabólitos intracelulares (ROGERS; ROGINA, 2015; ROGINA, 2017; WILLMES et al., 2017; WILLMES; BIRKENFELD, 2013; WILLMES; HELFAND; BIRKENFELD, 2016).

A inibição da recaptação de citrato renal através do bloqueio de NaDC1 e NaDC3 aumentaria a excreção renal de citrato com o potencial de prevenir cálculos renais, uma vez que esses são frequentemente associados a reduções na produção de citrato urinário. A terapia atual para reincidência de cálculos renais é a administração oral de citrato (HUARD et al., 2015, 2016).

Além dos transportadores de membrana plasmática, há proteínas transportadoras presentes na membrana interna da mitocôndria, o sistema de CIC, que desempenha um papel importante na síntese de ácidos graxos, na gliconeogênese e na transferência de equivalentes redutores através da membrana mitocondrial interna (PALMIERI et al., 2015). De acordo com dados publicados anteriormente sobre a proteína isolada do fígado de rato e reconstituídos em lipossomas (BISACCIA et al., 1990; KAPLAN et al., 1990; XU et al., 1995), o CIC catalisa o fluxo de citrato, junto com um próton, da matriz para o citosol em uma troca eletroneutra por outro tricarboxilato- H^+ , malato ou fosfoenolpiruvato (PEP) (BISACCIA et al., 1993). O mecanismo de transporte proposto é sequencial, o que implica na presença obrigatória de um contra-substrato para o fluxo de citrato. O cotransporte de citrato/malato atende a importantes demandas metabólicas (PALMIERI; PIERRI, 2010) (**Figura 5**).

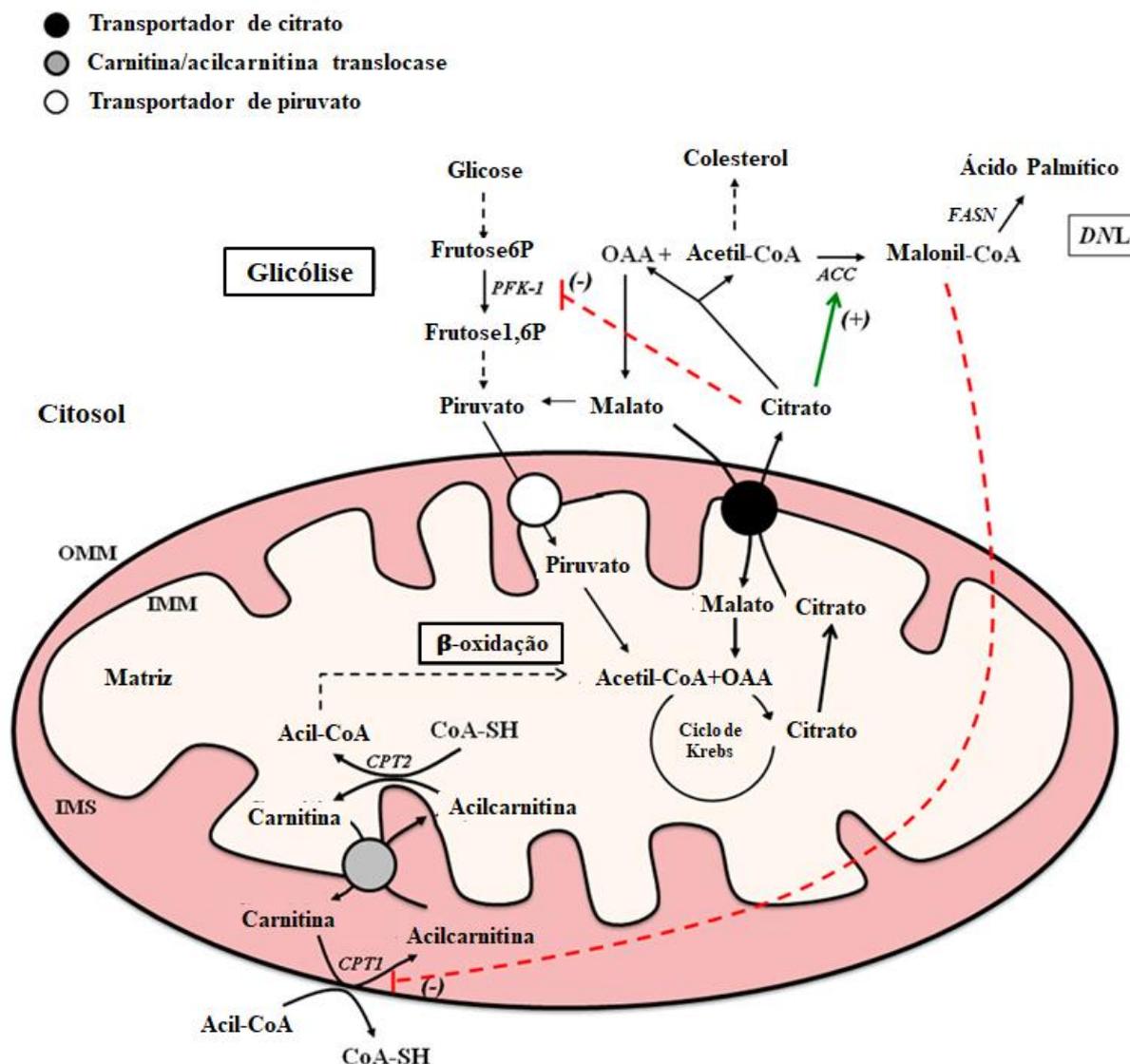


Figura 5: Representação esquemática das vias metabólicas que se relacionam com citrato e seu transportador mitocondrial. Em uma condição energética normal numa célula, a glicose é convertida em piruvato, pelo processo da glicólise no citoplasma celular. Esse piruvato é transportado para dentro da matriz mitocondrial através de seu transportador de membrana, decarboxilado a Acetil-CoA e condensado ao OAA, substrato do ciclo do Ácido Cítrico, e convertidos à citrato. O citrato mitocondrial pode ser externalizado para o citosol através de seu transportador de membrana. O citrato citosólico é um inibidor alostérico da enzima PFK-1, uma das enzimas controladoras da glicólise, e um ativador da ACC, ligada a DNL. O citrato citosólico é dissociado em Acetil-CoA e OAA e o Acetil-CoA poderá ser utilizado para síntese de colesterol e síntese de ácidos graxos, carboxilando-o em Malonil-CoA, pela ação da ACC, que, além de ser um inibidor do transportador de membrana de ácidos graxos (CPT1) e conseqüentemente da β -oxidação, ainda é substrato para a FASN na via de lipogênese *de novo*. Siglas ACC - Acetil-CoA carboxilase; CPT 1 - transportador de carnitina-palmitoil 1; CPT 2 - Transportador de carnitina-palmitoil 2; DNL - Via de lipogênese *de novo*; FASN - ácido graxo sintase; IMS - Membrana interna mitocondrial; OAA - oxalacetato; OMM - Membrana externa mitocondrial; PFK 1 - fosfofrutocinase 1. Adaptado de (GIUDETTI et al., 2016).

Em condições de privação de glicose, as células respondem ao estímulo com citocinas pró-inflamatórias, promovendo um novo mecanismo de controle pós-traducional da atividade da CIC que influencia a taxa do fluxo de citrato. O CIC é

mais acetilado em macrófagos ativados cultivados na ausência de glicose em comparação àqueles cultivados em glicose normal. A acetilação aumenta a taxa de fluxo de citrato das mitocôndrias em troca de malato citosólico garantindo assim a produção de NADPH. De fato, em células ativadas tratadas com o inibidor de CIC, há um forte acúmulo citosólico de malato, indicando que na ausência de glicose, o malato citosólico é rapidamente consumido para produzir NADPH (PALMIERI et al., 2015).

1.4.2 CITRATO E GLICÓLISE

O citrato se encontra numa etapa crítica de uma encruzilhada do metabolismo intermediário de células de mamíferos. Sua síntese é a primeira reação do ciclo do Ácido Cítrico na matriz mitocondrial, que é a principal via de oxidação de compostos de dois carbonos produzidos a partir da degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos. Na presença de oxigênio, o ciclo do Ácido Cítrico, converte os compostos de dois carbonos em CO_2 e H_2O com a produção de FADH_2 e NADH/H^+ , a partir dos quais a fosforilação oxidativa acoplada da membrana interna das mitocôndrias produzem ATP. O citrato é formado pela condensação de acetil-coenzima A (Acetil-CoA) e oxaloacetato (OAA), e a reação é catalisada pela citrato sintase (CS) da matriz mitocondrial (FREZZA, 2017; IACOBAZZI; INFANTINO, 2014).

Na presença de aconitase, o citrato se equilibra com cis-aconitato e isocitrato, uma molécula que é transformada em α -cetoglutarato através da ação da isocitrato desidrogenase. Posteriormente há decarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato à succinil-CoA pela ação da α -cetoglutarato desidrogenase, liberando então CO_2 e NADH/H^+ . Assim como acetil-CoA, o succinil-CoA perderá sua ligação tioéster com a Coenzima A para a formação de uma molécula de GTP, através da enzima succinil-CoA sintetase. O succinato formado a partir do succinil-CoA é oxidado a fumarato pela flavoproteína succinato desidrogenase, liberando uma molécula de FADH_2 . A hidratação reversível do fumarato em L-malato é catalisada pela fumarase (fumarato hidratase). Por fim, a molécula de L-malato será oxidada em OAA pela L-malato desidrogenase, liberando NADH/H^+ (NELSON; COX, 2008) (**Figura 6**).

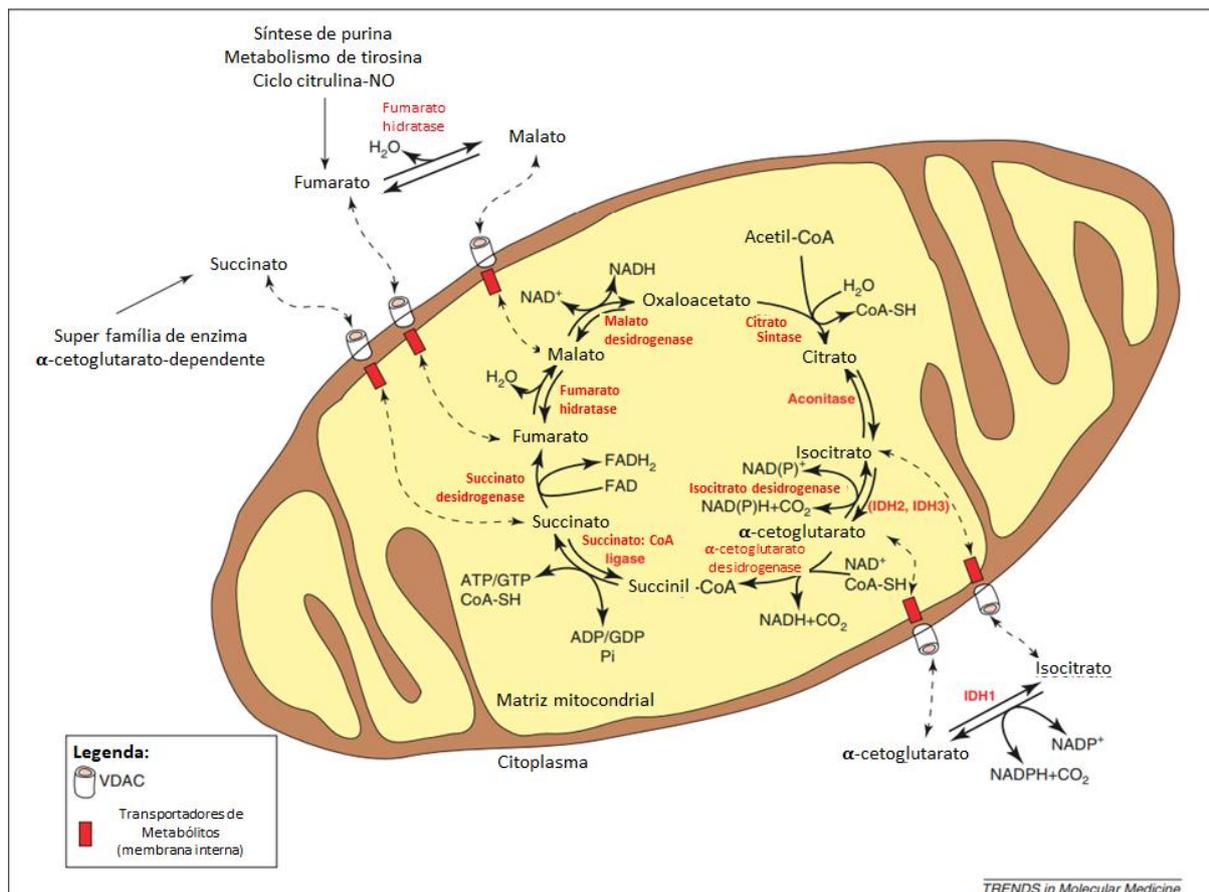


Figura 6: Representação esquemática do ciclo do Ácido Cítrico, que ocorre no interior na membrana interna mitocondrial. O Oxaloacetato e acetil-CoA, pela ação da citrato sintase, são convertidos em citrato. O citrato, pela ação da enzima aconitase, é convertido em isocitrato. O isocitrato, através da isocitrato desidrogenase, é convertido em α -cetoglutarato, liberando uma molécula de NAD^+ . α -cetoglutarato então é convertido em Succinil-CoA pela α -cetoglutarato desidrogenase, liberando uma molécula de NADH e CO_2 . A succinil-CoA é convertida em succinato pela succinato-CoA ligase, liberando uma molécula de trifosfato (ATP/GTP). O succinato, através da succinato desidrogenase, é convertido em fumarato, liberando uma molécula de FADH_2 , e esse fumarato é convertido em malato pela fumarato hidratase. Por fim o malato é convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase liberando uma molécula de NADH . Adaptado de (RAIMUNDO; BAYSAL; SHADEL, 2011).

O citrato citosólico também desempenha um papel fundamental na regulação da glicólise: inibe a reação que transforma a frutose-6-fosfato (F6P) em frutose-1,6-bisfosfato (F1,6BP). Essa reação, catalisada pela fosfofrutocinase 1 (PFK-1), é a segunda reação irreversível da glicólise, denominada etapa limitante para o controle da via (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Esta enzima alostérica e tetramérica é um ponto de verificação do estado energético, o marca-passo da glicólise. É inibida por ATP e citrato (ZANCAN et al., 2008) Um nível elevado de citrato citosólico significa que os precursores biossintéticos são abundantes e, portanto, a glicose adicional não deve ser degradada para este fim. A inibição da PFK-1 pelo citrato permite a regulação precisa da glicólise, levando à produção de ATP. Quando o

citrato inibe a PFK-1, o catabolismo da glicose é interrompido, resultando em uma desaceleração do ciclo do Ácido Cítrico. Por outro lado, a utilização de glicose para o anabolismo do glicogênio é aumentada (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Além de inibir a glicólise pela modulação alostérica negativa da PFK-1, o citrato também modula a atividade da fosfofrutocinase 2 (PFK-2) (CHESNEY, 2006), uma enzima bifuncional que interconverte a F6P em frutose 2,6-bisfosfato (F2,6BP) que, por sua vez, é um poderoso ativador alostérico da PFK-1.

Ao diminuir o nível de F1,6BP, um ativador alostérico da piruvato cinase (PK), o citrato indiretamente também inibe a PK, outra enzima limitante da glicólise (YALCIN et al., 2009). O ciclo do Ácido Cítrico é inibido por citrato ao nível do complexo da piruvato desidrogenase (PDH) (TAYLOR; HALPERIN, 1973) e succinato desidrogenase (SDH) (HILLAR; LOTT; LENNOX, 1975), e assim estimula as vias de consumo de ATP, como a gliconeogênese e a síntese lipídica.

1.4.3 CITRATO E METABOLISMO DE LIPÍDEOS

O citrato transportado para o meio extra-mitocondrial pelo CIC (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014) serve como substrato para a síntese de AG e esterol pela formação de acetil-CoA e OAA catalisado pela ATP:citrato liase (ACLY). Acetil-CoA é um metabólito importante que ocupa uma posição crítica em múltiplos processos, como intermediário metabólito, precursor de reações anabólicas, regulador alostérico de atividades enzimáticas e um determinante chave da acetilação de proteínas (CHOUDHARY et al., 2014; PIETROCOLA et al., 2015). É uma molécula derivada do piruvato glicolítico que entra no ciclo do Ácido Cítrico através da PDH, ou o produto final da β -oxidação ou ainda oriundo da carboxilação redutiva da glutamina, especialmente quando a glicólise é bloqueada em condições de hipóxia (CHRISTIAN et al., 2014; YANG et al., 2015). Ainda, é precursor chave da síntese lipídica e é o único doador de grupos acetil para as reações de acetilação de modo geral (WEINERT et al., 2014).

A etapa de limitação da velocidade da lipogênese é catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC), uma enzima dependente de biotina que irreversivelmente carboxila acetil-CoA à malonil-CoA (BROWNSEY et al., 2006) que, por um lado

induz a biossíntese de AG, através da ACC 1, ACC 2 e ácido graxo sintase (FASN), e por outro, inibe o transporte mitocondrial de AG pela carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT 1) (PAUMEN et al., 1997) e, conseqüentemente, a β -oxidação. A reação reversa (isto é, a decarboxilação de malonil-CoA a acetil-CoA), que é catalisada pela malonil-CoA decarboxilase (MLYCD), não apenas inibe a lipogênese, mas também estimula a captação mitocondrial de AG livres para β -oxidação aliviando a inibição mediada por malonil-CoA sobre a CPT 1 (KOVES et al., 2008). Ambos malonil-CoA e NADPH são usados como precursores para sintetizar o ácido palmítico (um AG de 16 carbonos) pela FASN (RUI, 2014).

O ácido palmítico é alongado pelos membros da família da elongase acil-CoA (Elovl) no retículo endoplasmático para gerar outros ácidos graxos de cadeia longa (LCFA). LCFAs são dessaturados por dessaturases de esteroil-CoA (SCDs), enzimas de membrana de retículo endoplasmático, para formar LCFAs mono e poli-insaturados (RUI, 2014).

A exportação de citrato das mitocôndrias cria a necessidade de reabastecimento anaplerótico de intermediários do ciclo do Ácido Cítrico que regeneram o OAA, significando que a disponibilidade extracelular de glutamina e o fluxo metabólico através da glutaminólise também influenciam a abundância relativa de acetil-CoA mitocondrial e citosólico (GIUDETTI et al., 2016).

O gradiente de concentração de acetil-CoA através da membrana mitocondrial interna é influenciado não apenas pela taxa de síntese e consumo de acetil-CoA no citosol e nas mitocôndrias, mas também pela atividade do CIC. Este pode ser aumentado por fatores de transcrição pró-inflamatórios como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1), além da ACLY, que é regulada por vários transdutores de sinal (LEE; SHAH; WELLEN, 2013) (INFANTINO et al., 2014).

1.4.4 CITRATO E INFLAMAÇÃO

Vários estudos demonstram que as células imunológicas são adaptadas para usar diferentes fontes de nutrientes. A glicose contribui para 60% das necessidades energéticas de uma célula imune, sendo os 40% restantes são atendidos pela

glutamina. Os macrófagos consomem quantidades muito elevadas de glicose, embora apenas 10% sejam oxidados, enquanto a glutamina é oxidada a altas taxas. Ambos os substratos energéticos podem produzir grandes quantidades de NADPH através de diferentes vias geradoras de NADPH. Quando a glutamina é usada para produzir novos aminoácidos em períodos de síntese ativa e secreção, a glicose é desviada para a via das Pentose Fosfato (PPP) para a síntese de NADPH (COSTA ROSA et al., 1995; NEWSHOLME, 2001; O'NEILL; GRAHAME HARDIE, 2013). Por outro lado, uma proporção considerável de NADPH é produzida via metabolismo da glutamina quando a glicose-fosfato desidrogenase é inibida em macrófagos por adrenalina, ou durante períodos de pinocitose e fagocitose ativas, nos quais o carbono da glicose pode ser desviado para a síntese lipídica (COSTA ROSA et al., 1995; NEWSHOLME, 2001).

A resposta inflamatória é desafiada nutricionalmente em condições de baixa disponibilidade de glicose, uma vez que a demanda celular de NADPH não pode ser sustentada pela PPP (COSTA ROSA et al., 1995; NEWSHOLME, 2001; O'NEILL; GRAHAME HARDIE, 2013). Fontes alternativas de NADPH requerem altos níveis citosólicos de citrato. De fato, esse intermediário do ciclo do Ácido Cítrico pode ser convertido em malato, que é substrato da enzima málica para produzir NADPH, ou pode ser substrato direto da isocitrato desidrogenase 1 (IDH 1) dependente de NADP^+ , embora sua expressão seja suprimida sob desafio pró-inflamatório (HASEEB; MAKKI; HAQQI, 2014). Em ambos os casos, a produção de NADPH torna-se mais dependente do fluxo de citrato das mitocôndrias.

Além disso, o citrato, também modula a função dos macrófagos, pois, quando é exportado pelo CIC da mitocôndria para o citosol, é clivado pela ACLY em acetil-CoA e OAA. O acetil-CoA fornece carbonos para a síntese de AG para atender a demanda por lipídios no estado pró-inflamatório (KAPLAN et al., 1990). O segundo produto do metabolismo do citrato, OAA, é reduzido pelo NADH para formar malato, e o malato é decarboxilado e oxidado para formar piruvato pela enzima málica. Isso produz o NADPH, que é usado para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase (BISACCIA et al., 1990; PALMIERI, 2004).

O estudo de LEANDRO et al., (2016) sugeriu que o citrato exógeno, proveniente da alimentação, pode tornar o tecido adiposo mais propenso a desenvolver inflamação. Além disso, já foi demonstrado que o metabolismo do citrato contribui para a atividade pró-inflamatória dos macrófagos em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) através do seu papel nas concentrações de acetil-CoA citosólico (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014; INFANTINO et al., 2013). Além disso, a acetilação e inibição do transportador de citrato mitocondrial diminui fortemente a resposta inflamatória induzida por LPS (PALMIERI et al., 2015). O citrato exógeno também leva a um aumento da resposta inflamatória de monócitos ativada por LPS (ASHBROOK et al., 2015).

1.5 JUSTIFICATIVA

Como comentado ao longo do texto, as alterações do padrão alimentar saudável para um padrão alimentar industrializado que oferece alimentos hipercalóricos e ricos em aditivos, pode promover obesidade e resistência à insulina. No entanto, são alterações metabólicas de início tênue e que levam muito tempo para se estabelecer, para somente então serem diagnosticadas. Porém, é fato que por terem início e desenvolvimento lentos, algumas dessas alterações, se forem previamente identificadas, podem antecipar o diagnóstico e facilitar o tratamento. Visando isso e sabendo que o citrato citosólico é uma interseção das vias metabólicas de glicose e de lipídeos, estabelecemos nossa pergunta principal: Estaria o citrato dietético modulando o metabolismo hepático e contribuindo com a instalação do processo de resistência à insulina em modelos experimentais de camundongos C57BL/6 submetidos a um dia de dieta hipercalórica?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do citrato na sinalização e regulação de vias metabólicas no fígado de camundongos alimentados com dieta padrão ou hipercalórica suplementada ou não com citrato e o seu efeito sobre a biologia celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do citrato sobre sinalização insulínica em fígados de camundongos;
- Estudar o efeito do citrato sobre à inflamação e metabolismo de lipídeos no fígado;
- Avaliar os possíveis fatores de transcrição e reguladores do metabolismo celular modulados por citrato;
- Avaliar o efeito do citrato na polarização de macrófagos em cultura de células.

3 METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS E DIETA

Foram utilizados 44 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem CL57BL/6 com 21- 28 dias de idade, pesando aproximadamente 20g, procedentes da Colônia de Fundação de Camundongos e Ratos, do CEMIB, da Unicamp. Após um período de adaptação de sete dias, onde os animais foram separados em gaiolas individuais e alimentados a base de ração comum e água filtrada, os animais foram submetidos à uma dieta pelo período de 24h divididos em 4 grupos em diferentes condições, onde: o Grupo Controle (Chow) recebeu 5 gramas de ração padrão com 3,1 kcal por grama de ração; o Grupo Hipercalórica recebeu 3 gramas de ração *High Fat High Sucrose Low Fiber* (HFHSLF) com 5,5 kcal por grama de ração; o Grupo Citrato Controle, recebeu 5 gramas de ração padrão com 3,1 kcal por grama de ração com um adicional de 40mg de citrato de sódio por grama de ração; e o Grupo Citrato Hipercalórica, recebeu 3 gramas de ração *High Fat High Sucrose Low Fiber* (HFHSLF) com 5,5 kcal por grama de ração com um adicional 67mg de citrato de sódio por grama de ração. A quantidade de citrato utilizada em cada grupo foi calculada a partir da média do consumo de cada grupo (Chow e HFHSLF) para que, ao final do experimento, ambos os grupos tivessem o mesmo consumo de citrato. A ração padrão utilizada foi AIN 93M da Pragsoluções Biociência (Jaú, São Paulo) que contém em 1Kg de ração: 140g de caseína, 465,7g de amido de milho, 155g de amido dextrinizado, 100g sacarose, 40g óleo de soja, 50g de fibras (celulose microcristalina), 35g Mix Mineral (357g/Kg mx carbonato de cálcio anidro, 250g/Kg mx fosfato de potássio monobásico, 74g/Kg mx cloreto de sódio, 46,6g/Kg mx sulfato de potássio, 28g/Kg mx citrato de potássio, tri-potássio, monohidratado, 24g/Kg mx óxido de magnésio, 6,06g/Kg mx citrato de ferro, 1,65g/Kg mx carbonato de zinco, 630mg/Kg mx carbonato de manganês, 300mg/Kg mx carbonato de cobre, 10mg/Kg mx iodato de potássio, 103mg/Kg mx selenato de sódio anidro, 8mg/Kg mx paramolibinato de amônia 4 hidratado, 1,45g/Kg mx metassilicato de sódio 9 hidratado, 275mg/Kg mx sulfato de cromo e potássio 12 hidratado, 81,5mg/Kg mx ácido bórico, 63,5mg/Kg mx fluoreto de sódio, 31,8mg/Kg mx carbonato de níquel, 17,4mg/Kg mx cloreto de lítio, 6,6mg/Kg mx de vanadato de amônia e 209,81g/Kg mx de sacarose), 10g Mix Vitamínico (3g/Kg mx ácido nicotínico, 1,6g/Kg mx de

pantotenato Ca, 700mg/Kg mx piridoxina, 600mg/Kg mx de tiamina, 600mg/Kg mx de riboflavina, 200mg/Kg mx de ácido fólico, 20mg/Kg mx de d-biotina, 2,5g/Kg mx de vitamina B12, 15g/Kg mx de Vitamina E (500IU/g), 800mg/Kg mx de Vitamina A (500.000IU/g), 250mg/Kg mx de Vitamina D₃ (400.000 IU/g), 750mg/Kg mx de Vitamina K e 974,7g/Kg mix de sacarose), 1,8g L-cistina, 2,5g bitartarato de colina e 8mg de tertil-butil-hidroquinona; A ração hiperlipídica utilizada foi formulada com base em LAVIGNE et al., 2001 e confeccionada pela Pragsoluções Biociência (Jaú, São Paulo) que contém em 1Kg de ração: 200g de caseína, 268,9g sacarose, 198g óleo de milho, 50g celulose, 198g de gordura, 67g Mix Mineral (500g/Kg mx carbonato de cálcio anidro, 74g/Kg mx cloreto de sódio, 52g/Kg mx sulfato de potássio, 220g/Kg mx citrato de potássio, tri-potássio, monohidratado, 24g/Kg mx óxido de magnésio, 6g/Kg mx citrato de ferro, 1,6g/Kg mx carbonato de zinco, 350mg/Kg mx carbonato de manganês, 300mg/Kg mx carbonato de cobre, 10mg/Kg mx iodato de potássio, 100mg/Kg mx selenato de sódio anidro, 550mg/Kg mx sulfato de cromo e potássio 12 hidratado e 118g/Kg mx de sacarose), 14g Mix Vitamínico (3g/Kg mx ácido nicotínico, 1,6g/Kg mx de pantotenato Ca, 700mg/Kg mx piridoxina, 600mg/Kg mx de tiamina, 600mg/Kg mx de riboflavina, 200mg/Kg mx de ácido fólico, 20mg/Kg mx de d-biotina, 1mg/Kg mx de vitamina B12, 20g/Kg mx de Vitamina E (250IU/mg), 1,6g/Kg mx de Vitamina A (250.000IU/mg), 250mg/Kg mx de Vitamina D₃ (400.000 IU/g), 5mg/Kg mx de Vitamina K e 972,9g/Kg mix de sacarose), 1,8g L-cistina, 2g bitartarato de colina e 8mg de tertil-butil-hidroquinona. Todos os camundongos foram ambientados em gaiolas, comportando apenas um indivíduo, com temperatura controlada (20-24 °C) e umidade relativa do ar de 55% ± 15%, ciclo claro/escuro (12/12h) e acesso *ad libitum* a bebida e ração. Após o período de tratamento foram quantificados a ingestão de ração e o peso corporal dos camundongos, na sequência esses animais foram submetidos em jejum por 6h para posterior teste de tolerância oral à glicose e eutanásia. Alguns animais (n=6 por grupo) receberam uma injeção com 2 U/kg de insulina 30min antes da eutanásia. A eutanásia ocorreu por sobredose anestésica (Isoflurano inalável). Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram os preceitos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo número 090/16.

3.2 AMOSTRAS DE SANGUE

Após as 24h de dieta, os animais foram colocados um jejum de 6 horas onde ração foi removida e a maravalha foi trocada. Para as aferições de glicemia foi realizada a coleta de sangue por secção da extremidade distal caudal e aferição em um glicosímetro *One Touch Ultra Mini*® (Roche). Para as demais aferições, as amostras de sangue foram coletadas após anestesia e através de punção cardíaca com seringas de 1mL com agulhas de 1,20mm por 40mm. Após a coleta, os eppendorfs foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos para a obtenção do plasma ou soro.

3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

Após o período de jejum, a glicemia foi aferida e, logo em seguida, os animais receberam, via oral (gavagem), uma solução de 2 gramas de glicose por quilograma de peso. A glicemia foi então monitorada nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação da solução.

3.4 AMOSTRAS DE TECIDO

Após a eutanásia, as amostras de fígado, tecido adiposo branco epididimal, tecido adiposo branco inguinal, tecido adiposo marrom, coração, intestino grosso e delgado e músculo foram coletadas. O fígado desses animais foi macerado manualmente em nitrogênio líquido, armazenado em criotubos em freezer a -80°C para a posterior análise de triglicerídeos hepáticos, PCR e *Immunoblotting*.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICOS

A quantificação de triglicerídeos hepáticos foi realizada com o sobrenadante obtido a partir de 50 miligramas do tecido pulverizado solubilizado em álcool isopropílico, centrifugado à 2.000G por 10min. A dosagem foi aferida usando o kit Triglicérides Monoreagente (Bioclin, Ref K117).

3.6 PCR

As reações de PCR em tempo real foram feitas no 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*TM). Foram realizadas reações de etapa única pelos sistemas de SYBR® Green e TaqMan®.

3.6.1 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA total das amostras foi realizada com o reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (*TRizol®Reagent - Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante com poucas modificações (200 mg tecido/500µL de Trizol); ao final da extração as amostras foram ressuspensas em 50 µl de água para biologia molecular. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Picodrop (PICOPET01, *Picodrop Technologies*), a partir da absorbância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente.

3.6.2 SÍNTESE DE cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Molecular Biology/ThermoFisher Scientific*, Ref #K1622), a partir de 140 ng de RNA total, acrescido de dNTP Mix (100 mM); Random Primers (10x RT), *Transcriptase Reversa MultiScribe* (50U/µL). As amostras foram incubadas por 90 min a 37°C para síntese do cDNA, armazenadas em freezer à -20°C para a posterior análise por PCR Real time quantitativo (q-RT PCR).

3.6.3 q-RT PCR

Para as reações em etapa única utilizando o sistema TaqMan® foi utilizado o kit TaqMan® Universal Master Mix II, da *Applied Biosystems*TM. Para as reações em etapa única utilizando o sistema SYBR® GreenER foi utilizado o kit GoTaq® qPCR Master Mix, da *Promega*.

Foram desenhados os primers para SYBR® GreenER para *Mus musculus*, sintetizados pela empresa *Exxtend*. Os seguintes genes foram selecionados: Acetil-CoA carboxilase 1 (ACC 1), Acetil-CoA carboxilase 2 (ACC 2), ATP:Citrato

Liase (ACLY), Arginase 1 (Arg 1), Transportador carnitina palmitoil 1 alfa (CPT 1 α), Proteína de resposta precoce ao crescimento 2 (EGR2), Elongase acil-CoA (Elovl), Módulo semelhante a EGF contendo um hormônio parecido à mucina 1 (EMR 1-F4/80), Ácido graxo sintase (FASN), Receptor 2 do peptídeo N-formil (FPR2), Família transportadora de soluto 13 membro 5 (Transportador de citrato dependente de sódio) (Slc13a5/*mINDY*), Receptor X do fígado (LXR), Fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama 1-alpha (PGC-1 α), Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α), Esteroil-CoA desaturase 1 (SCD 1), Sirtuína 1 (SIRT 1) e Proteína de ligação a elemento regulatório de esteroil 1c (SREBP-1c) (**Tabela 1**). Os primers utilizados para TaqMan® foram Interleucina 6 (IL-6), receptor de macrófagos com estrutura colagenosa (MARCO) e receptor de manose do tipo C-1 (MRC 1) (**Tabela 2**). O gene para Ciclofilina A (CFA) foi utilizado para a normalização na sonda SYBR® GreenER enquanto o gene HPRT foi utilizado para a normalização para a sonda TaqMan®, necessária para utilização do método de expressão relativa por $\Delta\Delta CT$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Tabela 1: Lista de primers dos genes de interesse, para a sonda Sybr® Green, utilizados no ensaio de q-RT PCR.

Proteína	Sequência		Tamanho do Amplicon (bp)
	Forward	Reverse	
ACC 1	CCGAGAAAGCAGGGGATCTG	TACCCGACGCATGGTTTTCA	91
ACC 2	CACCCAACCTCTGAAGGGGAC	CCAGGGTGCCATGATTTCCCT	75
ACLY	TGGATGCCACAGCTGACTAC	GGTTCAGCAAGGTCAGCTTC	150
ARG 1	CCTCGAGGAGGGGTAGAGAAA	GGTCTCTCACGTCATACTCTGTTT	91
Ciclo Filina A	CAGACGCCACTGTTCGCTTT	TGTCTTTGGAACCTTTGTCTGCAA	133
CPT 1a	TGGACCCAAATTGCAGTGGT	CTCCCACCAGTCACTCACATAA	73
EGR2	GTGGCGGGAGATGGCATGAT	TCGGATACGGGAGATCCAGG	70
Elov 1	CCATGTCTTCCACCACTCGG	GGAGCCCATTCTCCTGG	76
EMR 1 (F4/80)	CCGTCAGGTACGGGATGAAT	AGAAGTCTGGGAATGGGAGC	73
FASN	CCATGGCAGCTGTTGGTTTG	GTGTCCTCAGAGTTGTGGCA	88
FPR2	CCAGTGATTCAAGCACCAGTT	TCACAGACTTCATGGGGCCTT	71
mINDY (SLC13a5)	TCTTTTCTCCCTCCAGTCAGTC	GCACACCTGGCAAACCTTGT	151
LXR	ACTTTGCCAAACAGCTCCCT	AGCATGACCTCGATTGCAGA	88
PEPCK	GGGTGGAAGGTCGAATGTGT	AGCCCTTAAGTTGCCTTGGG	72
PGC-1a	CTCTGGAACCTGCAGGCCTAA	CAAGAGGGCTTCAGCTTTGG	96
PPAR a	GCAACAACCCGCCTTTTGTGTC	TTGGCCACAAGCGTCTTCTC	70
SCD 1	CACCTGCCTCTTCGGGATTTT	GGCCCATTTCGTACACGTCA	166
SIRT 1	GCGGCTTGAGGGTAATCAAT	GACAAGACGTCATCTTCAGAGTC	96
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT	70

Tabela 2: Lista de primers dos genes de interesse, para a sonda TaqMan®, utilizados no ensaio de q-RT PCR

Gene	ID	Tamanho do Amplicon (bp)
HPRT	Mm03024075_m1	131
IL 6	Mm00446190_m1	78
Marco	Mm00440265_m1	75
MRC 1	Mm01329362_m1	147

3.7 IMMUNOBLOTTING

As amostras de fígado dos camundongos foram lisadas em tampão RIPA (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, Glicerol 10%, 5 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, triton1%, SDS 0,1%, 80 mM β- glicerofosfato, 5 mM NaPPi, 1 mM PMSF) na presença de inibidores de proteases com um tempo de uma hora de incubação. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8.000 x g, por 15 minutos, à 4°C e o sobrenadante foi coletado e o *pellet* contendo os restos celulares foi descartado.

A concentração de proteína das amostras foi avaliada pelo método do ácido bicinchonínico conforme a descrição do fabricante (*Pierce BCA Protein Assay Kit – ThermoScientific*, EUA). A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 562nm. Todas as amostras foram testadas e comparadas com curva padrão de BSA.

Separação das proteínas por SDS-PAGE: As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos em tampão de amostra TEX (Tris-HCl 0,5 M, glicerol, SDS e azul de bromofenol 0,05%) e β -mercaptoetanol 15%. Após esse procedimento, o equivalente a 20 μ g de proteínas foi aplicado no gel de poliacrilamida (3,6% para retenção e 7,5 - 9% para separação das proteínas) e as proteínas foram separadas por eletroforese por cerca de 2h a 120 V.

3.7.1 WESTERN BLOT

As proteínas separadas por eletroforese foram eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon-P TransferMembrane EMD*, Millipore, EUA). A voltagem foi regulada para 30V overnight. Ao final da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S e, em seguida, bloqueadas com leite desnatado 5% p/v em TBS-T (TBS: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; Tween: 0,1% v/v) por 1 hora sob agitação lenta. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (**Tabela 3**), conforme orientações dos fabricantes, diluídos em TBS-T suplementados com albumina sérica bovina (0,5% p/v e azida 0,002%) e mantidos sob agitação a 4°C overnight. As membranas foram, em seguida, incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários diluídos em 5% leite desnatado em TBS-T por 1 hora sob agitação lenta. Após este período, o sistema foi revelado com o kit *Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore, EUA).

Tabela 3: Lista de anticorpos primários utilizados no trabalho.

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição
Anti-ACLY	Abcam	ab40793	1:1000
Anti-pACLY	Abcam	ab46796	1:1000
Anti-B-Actina	Cell Signaling	#4967	1:1000
Anti-AKT	Cell Signaling	#9272	1:1000
Anti-pAKT (Ser 473)	Cell Signaling	#9271	1:1000
Anti-pAKT (Thr308)	Cell Signaling	#9275	1:1000
Anti-AMPK	Cell Signaling	#2532	1:1000
Anti-pAMPK	Cell Signaling	#2535	1:1000
Anti-ERK 1/2	Cell Signaling	#4695	1:1000
Anti-pERK 1/2	Cell Signaling	#9106	1:1000
Anti-mTOR	Cell Signaling	#2972	1:1000
Anti-pmTOR	Cell Signaling	#2971	1:1000
Anti-PEPCK	SCBT	sc-32879	1:1000
Anti-PGC1α	SCBT	sc-5816	1:1000
Anti-SCD 1	Cell Signaling	#2794S	1:1000
Anti-SLC13A5/mINDY	Thermo	PA5-42526	1:1000
Anti-TNF-α	Abcam	ab1793	1:1000
Anti-Mouse	Jackson Laboratories	155-035-146	1:10000
Anti-Rabbit	Jackson Laboratories	111-035-144	1:20000

3.8. CULTURA DE CÉLULAS

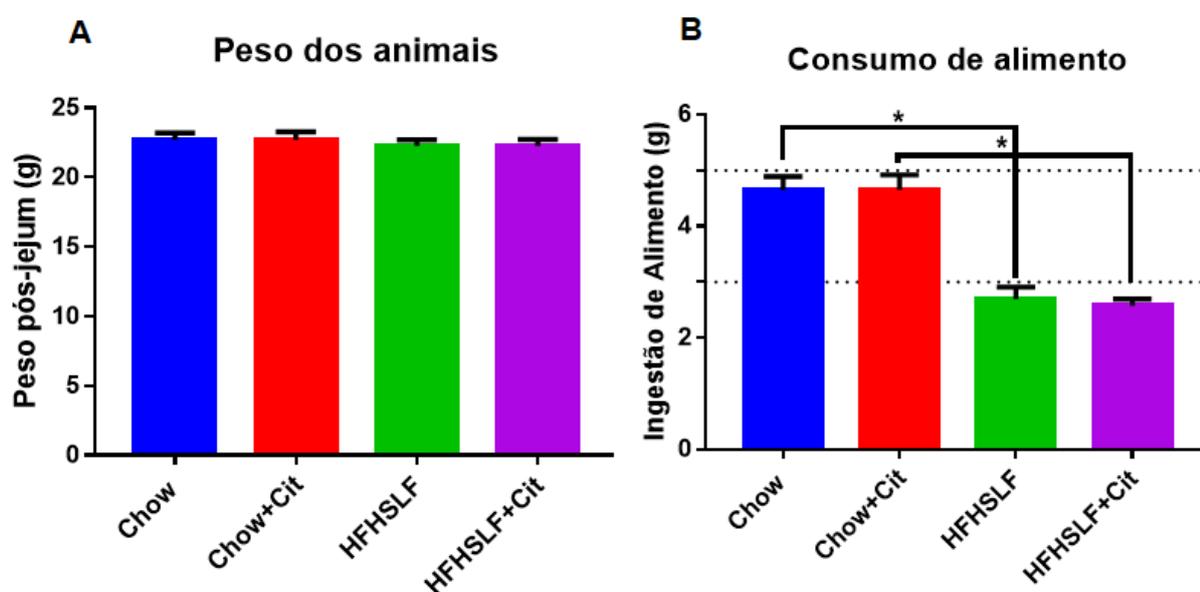
A linhagem celular J774, macrófagos de murino, foi gentilmente cedida pelo Prof Leonardo Nimrichter (IMPG- UFRJ) e foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e bicarbonato de sódio (3,7 g/L), pH 7,4 e acondicionadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido. Para os ensaios, as células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços, numa concentração de 1 x 10⁵ células por poço, até atingirem cerca de 85% de confluência. Posteriormente, as células foram tratadas com citrato de sódio, em uma concentração de 2mM, por 24h, e foram mantidas na estufa nas mesmas condições de incubação. O mRNA dessas células foi extraído, o cDNA foi sintetizado e as análises por qPCR foram realizadas seguindo o protocolo acima descrito.

3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão. A análise dos dados foi realizada usando o software Prism (v. 7.0, *GraphPad Software Inc.* CA, USA). Os valores para cada grupo foram comparados por testes t-Student pareados ou não pareados, ou por análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Camundongos C57BL/6 (44 animais; n = 10-12 animais/grupo) foram submetidos à dieta padrão (Chow) ou HFHSLF suplementada ou não com citrato (Chow+Cit e HFHSLF+Cit) durante 24h. Após o tratamento, os animais foram pesados assim como a quantidade de ração ingerida antes de realizar o oGTT. Não foi observada variação no peso dos animais em nenhum dos grupos (**Figura 7A**). A ingestão de alimento dos grupos que receberam a dieta HFHSLF foi menor que a do grupo controle (**Figura 7B**), porém ao se converter para a quantidade de calorias de cada dieta, observou-se que a ingestão calórica foi equivalente (**Figura 7C**).



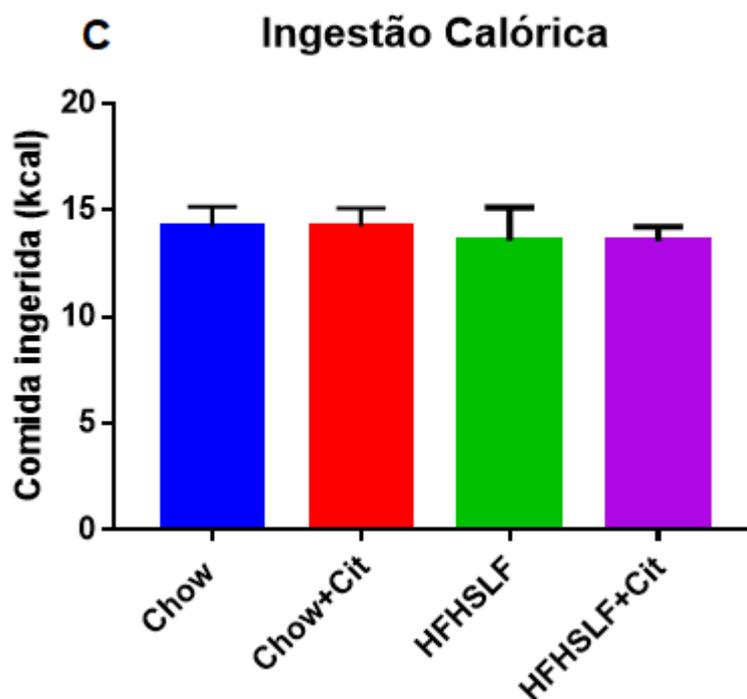


Figura 7: Gráfico comparativo da interferência da dieta sobre o peso dos animais (A); Comparação da quantidade de alimento ingerido pelos animais após 24h (B); Comparação da quantidade de calorias ingeridas por cada grupo de animal após 24h (C). A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$); médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.

Seguindo o protocolo descrito em Metodologia, após 6h de jejum, os animais foram submetidos ao oGTT, fazendo uma aferição da glicemia de jejum desses animais, submetendo-os a uma dose de 5 mg de glicose por quilo de animal e aferindo sua glicemia em tempos subsequentes. Observou-se que, comparados ao grupo Chow, a dieta HFHSLF promoveu um aumento da área sobre a curva glicêmica dos animais, assim como a presença do citrato (**Figura 8A**). Ao avaliar a área sobre a curva de cada grupo, observou-se um aumento significativo comparando o grupo controle com o grupo HFHSLF e esse aumento foi exacerbado com a presença do citrato (**Figura 8B**).

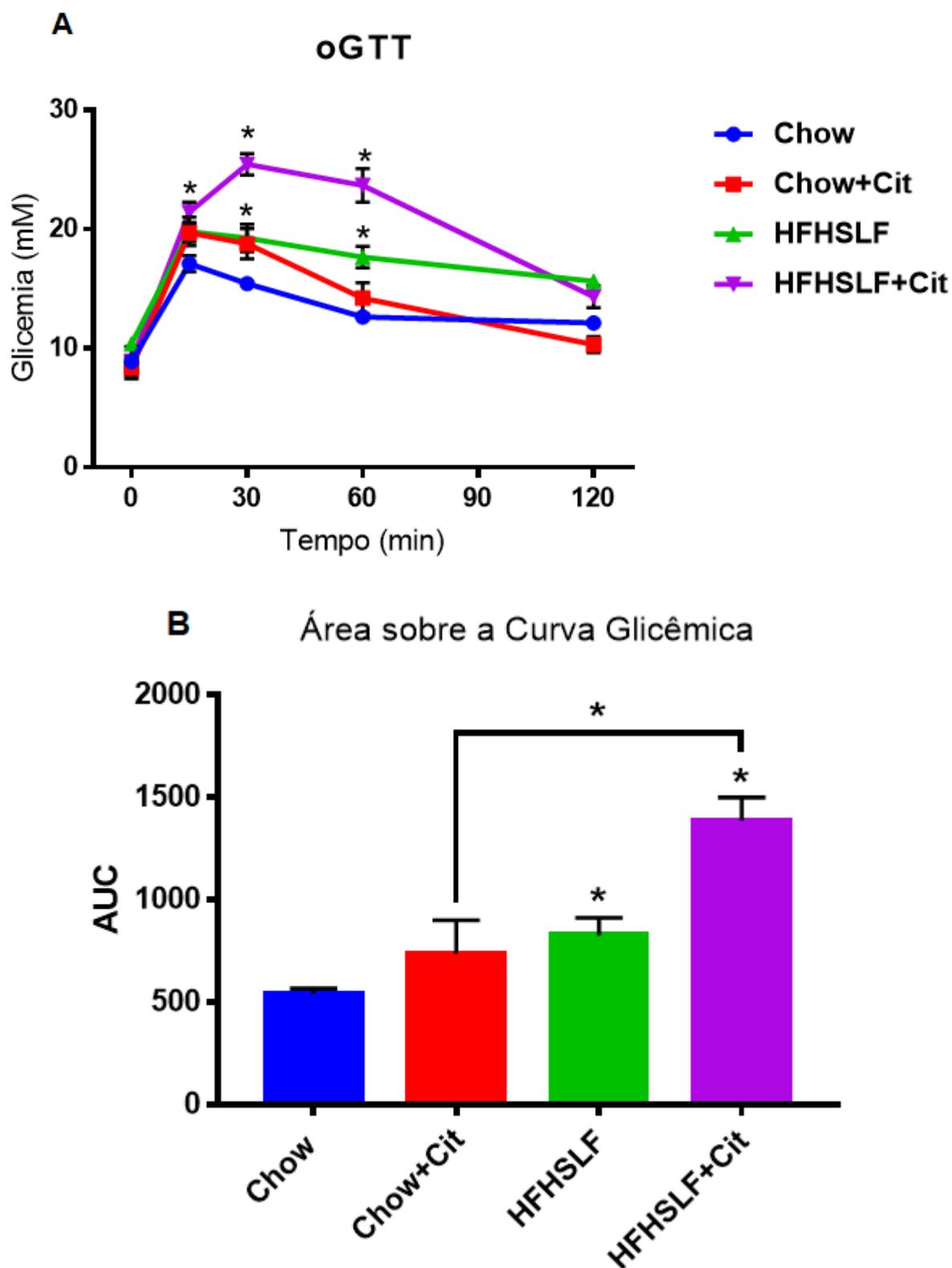


Figura 8: Teste de Tolerância a Glicose. (A) Valores de glicemia ao longo do tempo, aferindo em 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem com 5 mg de glicose/kg de peso corporal; (B) Área sob as curvas. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta

HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores ponto a ponto do controle (Chow) e os demais grupos. Médias comparadas por teste t de Student ou ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey, quando oportuno.

Com os dados obtidos no oGTT, decidimos analisar o perfil de resposta da via de sinalização da insulina através da técnica de *Immunoblotting* (**Figura 9A**). Para isso, foram utilizadas alíquotas de tecido hepático desses animais que receberam ou não uma injeção intraperitoneal de insulina 30 min antes da eutanásia. Então, foi iniciada a análise através da proteína AKT, que desempenha um papel essencial em muitos processos fisiológicos básicos e sua desregulação contribui criticamente para várias anormalidades patológicas, uma das quais a DM2 (MANNING; TOKER, 2017). A via canônica que leva à ativação da AKT é iniciada pela estimulação dos receptores tirosina-quinases (RTK), ou receptores acoplados à proteína G (GPCR), levando ao recrutamento, na membrana plasmática, e ativação de uma ou mais isoformas de proteínas da família PI3K. A ativação de PI3K resulta na fosforilação de dois resíduos-chave em AKT. Primeiro, no resíduo T308 em sua ativação no núcleo catalítico dessa proteína quinase, e, segundo, no resíduo S473, em um motivo hidrofóbico C-terminal (MANNING; TOKER, 2017). A fosforilação do resíduo T308 de AKT é um marcador da ativação da cascata de sinalização da insulina.

Observou-se que, os dois grupos de animais que receberam a dieta com citrato obtiveram uma diminuição de mais de vinte vezes, quando comparados ao controle, na fosforilação da AKT no resíduo T308 (**Figura 9A e 9B**). Contudo, é perceptível que, sem o estímulo da insulina, o grupo Chow+Cit teve um pequeno aumento da fosforilação de AKT em T308 (**Figura 9A e 9B**). Por outro lado, a fosforilação desse resíduo estimulada por insulina foi menos intensa, quando comparada ao grupo Chow (**Figura 9A e 9B**). Para o grupo HFHSLF, observamos uma pequena diminuição da fosforilação estimulada por insulina de T308 da AKT, quando também comparado ao Chow (**Figura 9A e 9B**). A combinação HFHSLF+Cit intensificou a diminuição da fosforilação de T308, comparada ao grupo HFHSLF (**Figura 9A e 9B**). Porém, não foi observado o aumento da fosforilação independente de insulina deste resíduo, como descrito acima para o grupo Chow+Cit. De toda forma, esses resultados indicam que a presença de citrato na dieta *per se* afeta a fosforilação de T308 da AKT estimulada por insulina. Esse efeito é similar ao efeito promovido pela dieta HFHSLF, porém mais intenso. Assim, esse

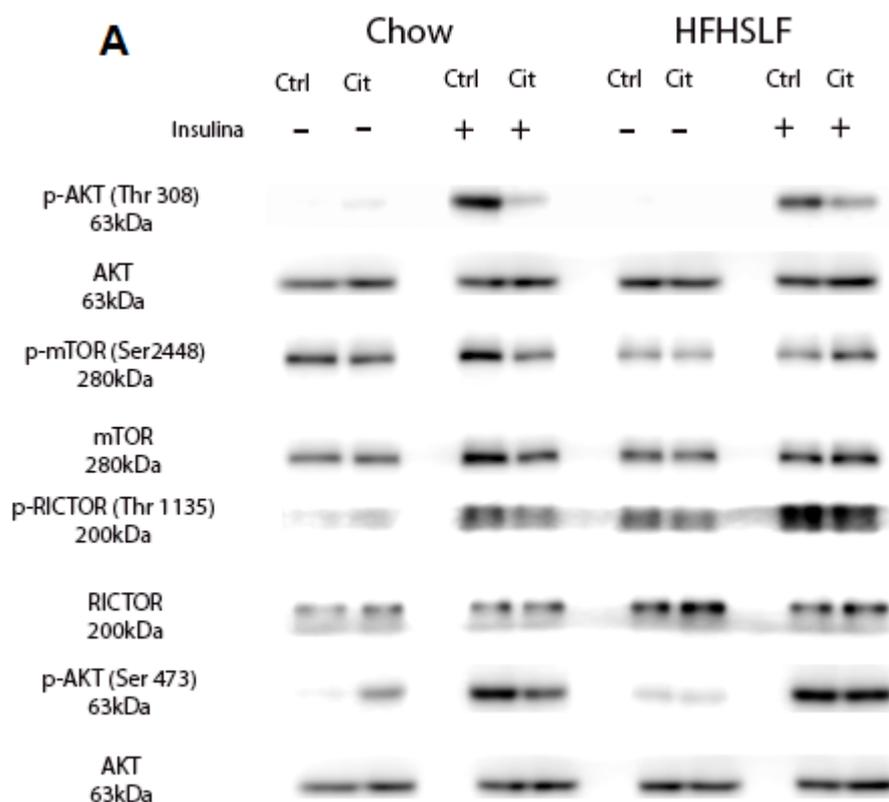
primeiro resultado sugere que a presença de citrato na dieta desencadeia uma intolerância à glicose envolvendo uma ineficiência na sinalização insulínica.

Uma das proteínas sequenciais na cascata de sinalização da insulina é a mTOR. Essa proteína é considerada um sensor nutricional, respondendo à presença de fatores de crescimento e ao estado energético celular, modulando vários processos anabólicos e catabólicos para manter a homeostase metabólica e o crescimento celular (HATANO et al., 2015). mTOR interage com uma série de proteínas formando dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2. O primeiro complexo é fosforilado e ativado por AKT, normalmente após a fosforilação desta última em T308. Uma vez ativado, mTORC1 apresenta um papel importante no *feedback* negativo da via de sinalização de insulina. Em nossos resultados, observamos que a presença de citrato na dieta Chow levou a uma diminuição da fosforilação estimulada por insulina de mTOR no resíduo S2448 (**Figura 9A e 9C**). Adicionalmente, a dieta HFHSLF promoveu o mesmo efeito, diminuindo a fosforilação de mTOR no estado não estimulado por insulina (comparar Chow e HFHSLF sem insulina) e impedindo que esse hormônio promova a fosforilação de S2448 de mTOR quando os animais foram alimentados com dieta HFHSLF (**Figura 9A e 9C**). Para o grupo alimentado com dieta HFHSLF, o citrato não alterou o padrão de resposta de fosforilação de mTOR, como observado no grupo Chow (**Figura 9A e 9C**). Esses resultados sugerem que citrato e HFHSLF são capazes de interferir com a fosforilação (e ativação) de mTOR, sem que um interfira com o efeito do outro.

A fosforilação de mTOR em S2448 ocorre em ambos os complexos, mTORC1 e mTORC2, não diferenciando o efeito observado. Dessa forma, decidimos avaliar a fosforilação de RICTOR no resíduo T1135. RICTOR é um componente regulatório de mTORC2, sendo sua fosforilação mediada por mTORC1. Mais uma vez, nossos dados mostram que a presença de citrato na dieta Chow diminui a fosforilação de RICTOR promovida por insulina (**Figura 9A e 9D**). Curiosamente, observamos um aumento dessa fosforilação no grupo HFHSLF, quando comparado ao Chow (**Figura 9A e 9D**). Ainda, a dieta HFHSLF não afetou a fosforilação de RICTOR mediada por insulina (**Figura 9A e 9D**). Porém, o citrato foi capaz de diminuir a

fosforilação de RICTOR mediada por insulina também no grupo HFHSLF (**Figura 9A e 9D**).

A fosforilação de AKT em S473 aumenta a ativação desta enzima. Dentre os mediadores desta fosforilação, está o mTORC2. Nossos resultados mostram que o citrato foi capaz de afetar a fosforilação de AKT em S473 de forma similar ao que foi observado em T308 (**Figura 9A e 9E**), reforçando a sugestão de que o citrato interfere com diversos aspectos da sinalização insulínica. Esses resultados também sugerem um mecanismo para os efeitos do citrato sobre a tolerância à glicose mostrada na **Figura 8**.



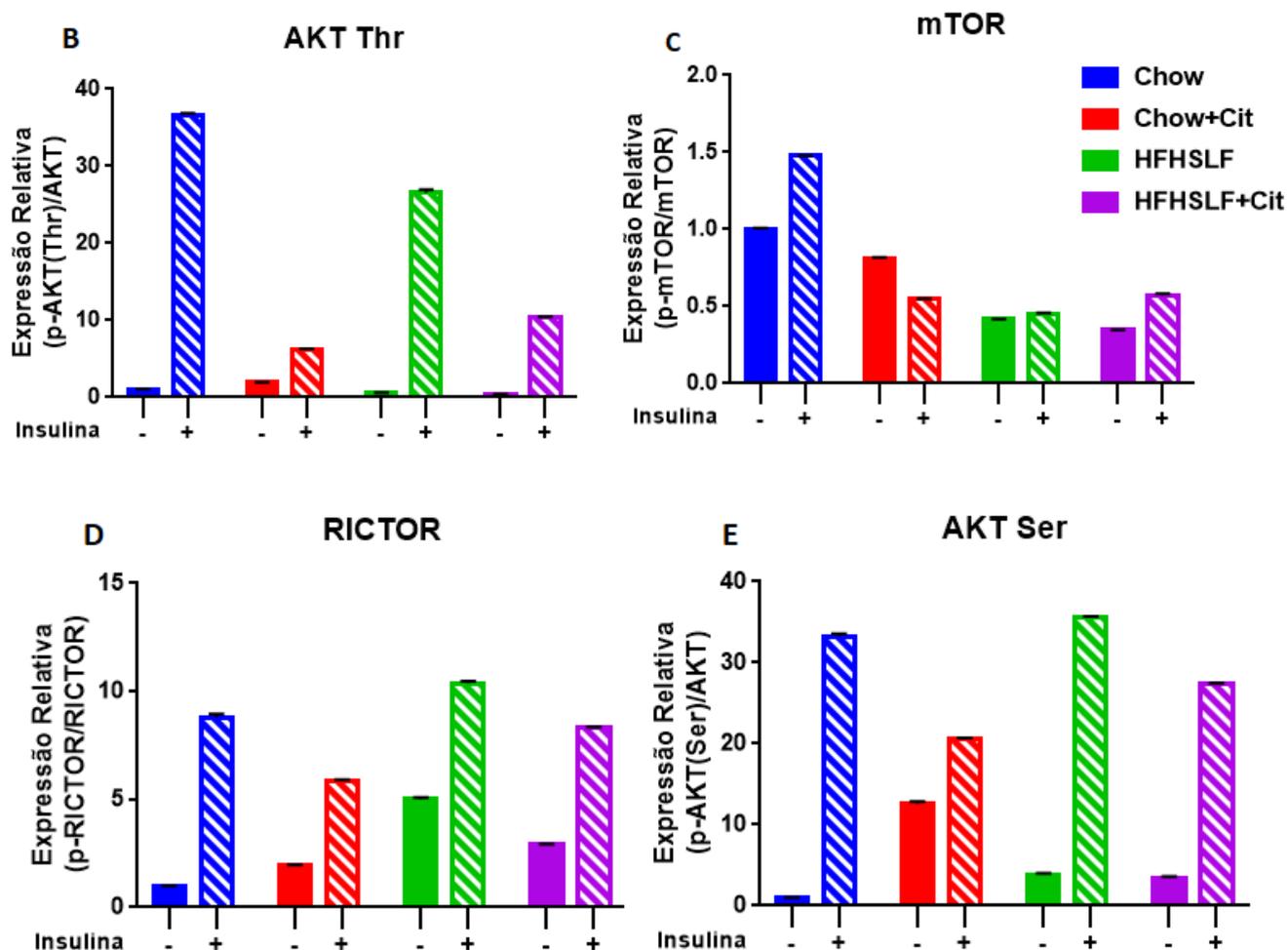


Figura 9: Análise do perfil proteico referente a cascata de sinalização da insulina após um dia de dieta na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta das proteínas da via de sinalização da insulina por imunoblotting; (B) Quantificação do perfil de fosforilação de AKT (T308); (C) Quantificação do perfil de fosforilação de mTOR (S2448); (D) Quantificação do perfil de fosforilação de RICTOR (T1135); (E) Quantificação do perfil de fosforilação de AKT (S473). A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).

Uma vez que a captação de citrato pela célula depende da expressão de seu transportador na membrana plasmática, avaliamos se a ingestão de citrato alteraria a expressão de SLC13A5/*MINDY*. Os resultados obtidos por *Immunoblotting* e por qRT-PCR são conflitantes. A expressão da proteína SLC13A5 não é afetada pela presença de citrato na dieta Chow (**Figuras 10A e 10B**). No entanto, a dieta HFHSLF diminui levemente os níveis de proteína, quando comparados ao controle Chow (**Figuras 10A e 10B**). Entretanto, a presença de citrato na dieta HFHSLF leva

a um aumento dos níveis dessa proteína (**Figuras 10A e 10B**). Por outro lado, os níveis de mRNA de *mINDY* aumentam significativamente nos grupos Chow+Cit e HFHSLF, quando comparados a Chow (**Figura 10C**). Enquanto que a expressão do mRNA de *mINDY* no grupo HFHSLF+Cit diminui, quando comparado ao grupo HFHSLF, não sendo diferentes dos níveis de Chow (**Figura 10C**). Assim, aparentemente, podemos inferir que a presença de citrato na dieta HFHSLF previne os efeitos dessa dieta sobre a expressão de mRNA de *mINDY*. Essa discrepância de resultados comparando a expressão da proteína e de seu mRNA sugerem que exista uma regulação da degradação do transportador de citrato pela presença deste aditivo na dieta.

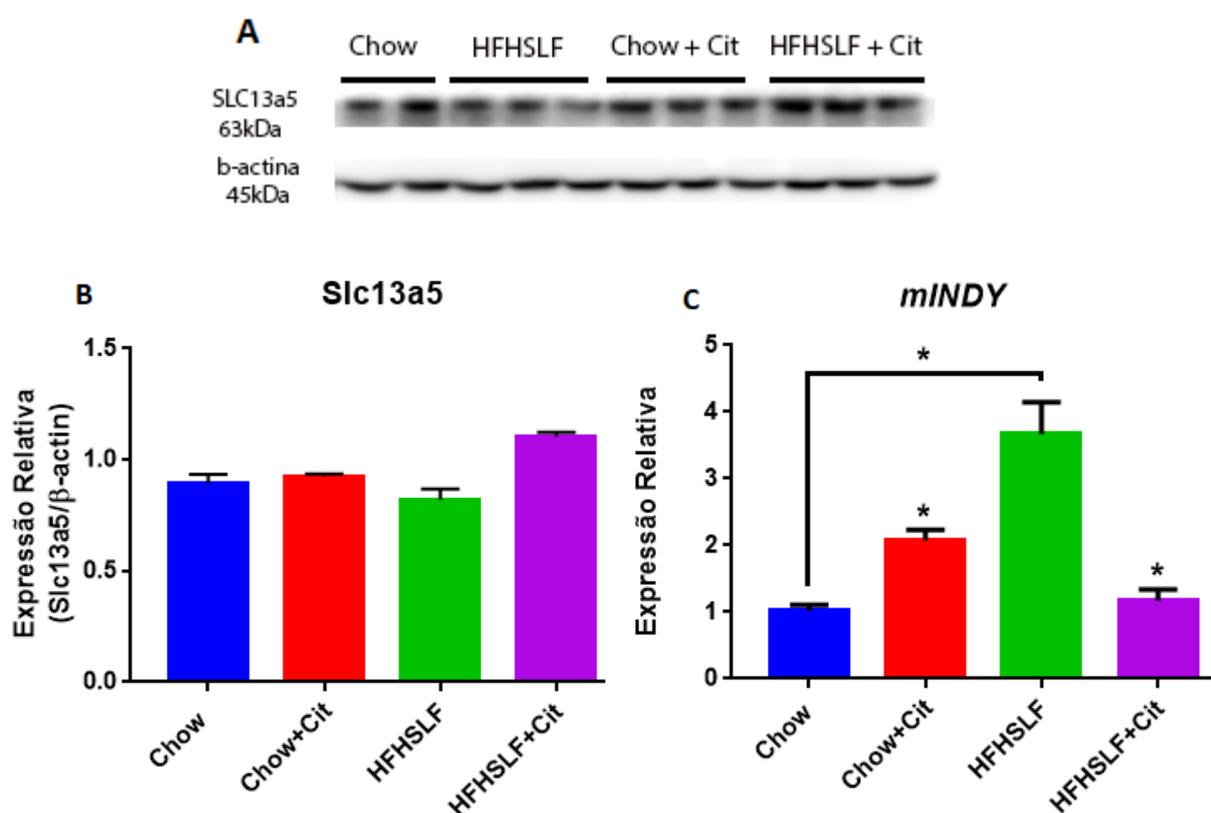
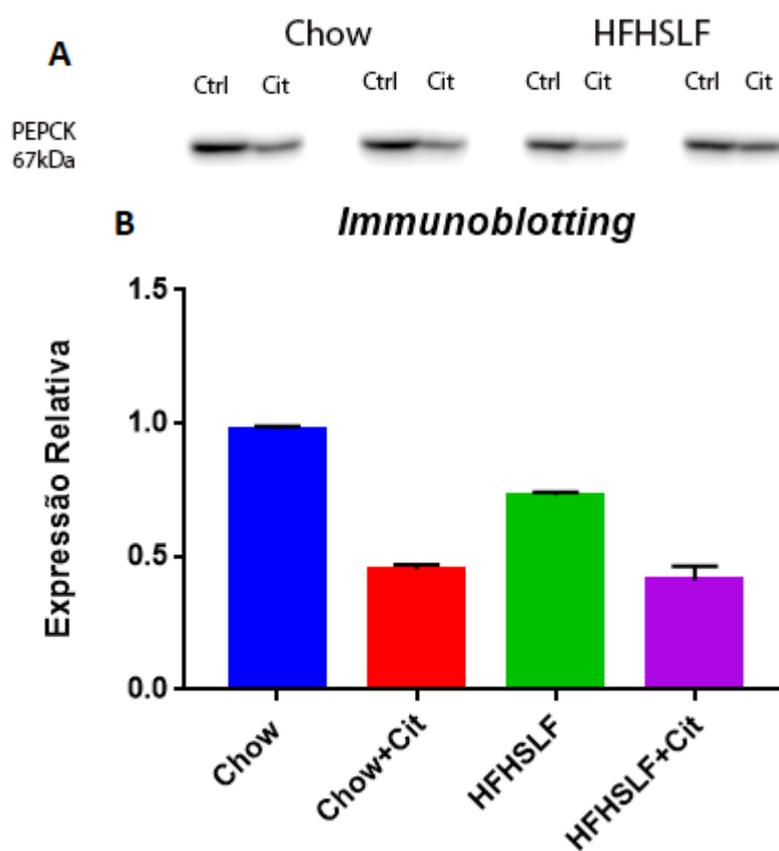


Figura 10: Análise do transportador de citrato na membrana plasmática após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta do transportador de citrato da membrana plasmática SLC13A5 por *immunoblotting*; (B) Quantificação do *Immunoblotting* apresentado no painel A; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene *mINDY* por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.

Como o citrato citoplasmático pode se tornar substrato tanto para a via de síntese lipídica quanto para a via gliconeogênica, analisou-se a expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK). Observou-se que na presença do citrato o nível de expressão dessa enzima diminui pela metade, tanto no *immunoblotting* (**Figura 11A e 11B**) quanto por qRT-PCR (**Figura 11C**) indicando que, apesar do citrato ser um dos precursores para a via gliconeogênica, aparentemente ele não está sendo direcionado para essa via, podendo assim estar direcionado para a via lipogênica.



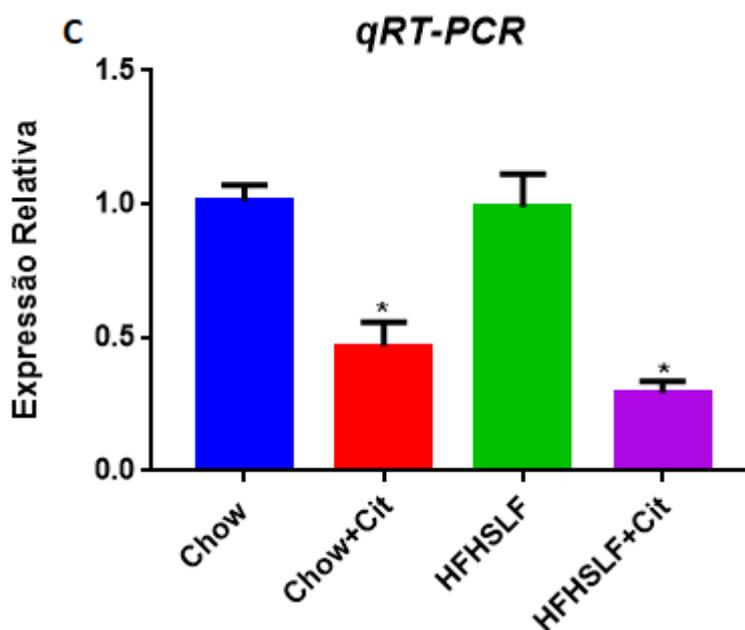


Figura 11: Análise do nível de expressão de fatores ligados a via da gliconeogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima PEPCK por immunoblotting; (B) Quantificação do *Immunoblotting* apresentado no painel A; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da PEPCK por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.

Como um dos fatores que podem corroborar para a resistência à insulina é o acúmulo de gordura hepática, foi analisado se 24 h seria tempo suficiente para ter um acúmulo de gordura no fígado e como o metabolismo lipídico estaria sendo modulado pelo citrato. Observou-se um aumento do acúmulo de TAG nos animais que foram submetidos à dieta HFHSLF independente da presença ou ausência do citrato, mostrando que, a princípio, o mesmo não estaria aumentando o acúmulo de gordura no fígado após um dia de dieta (**Figura 12**).

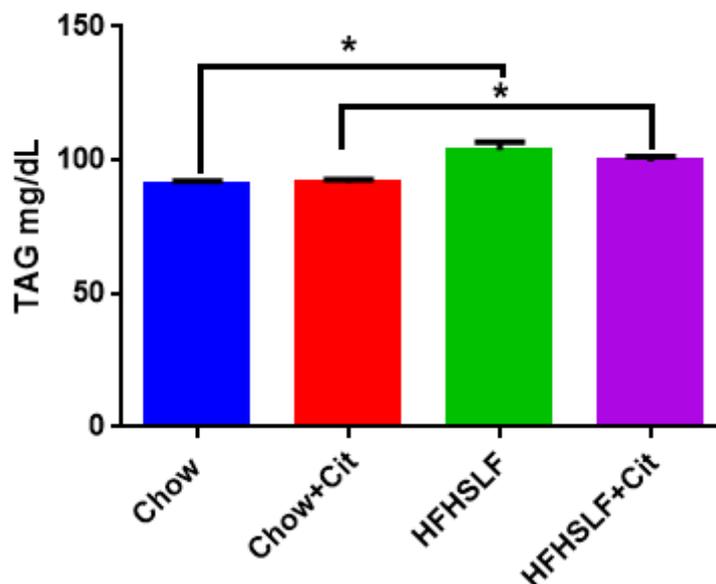
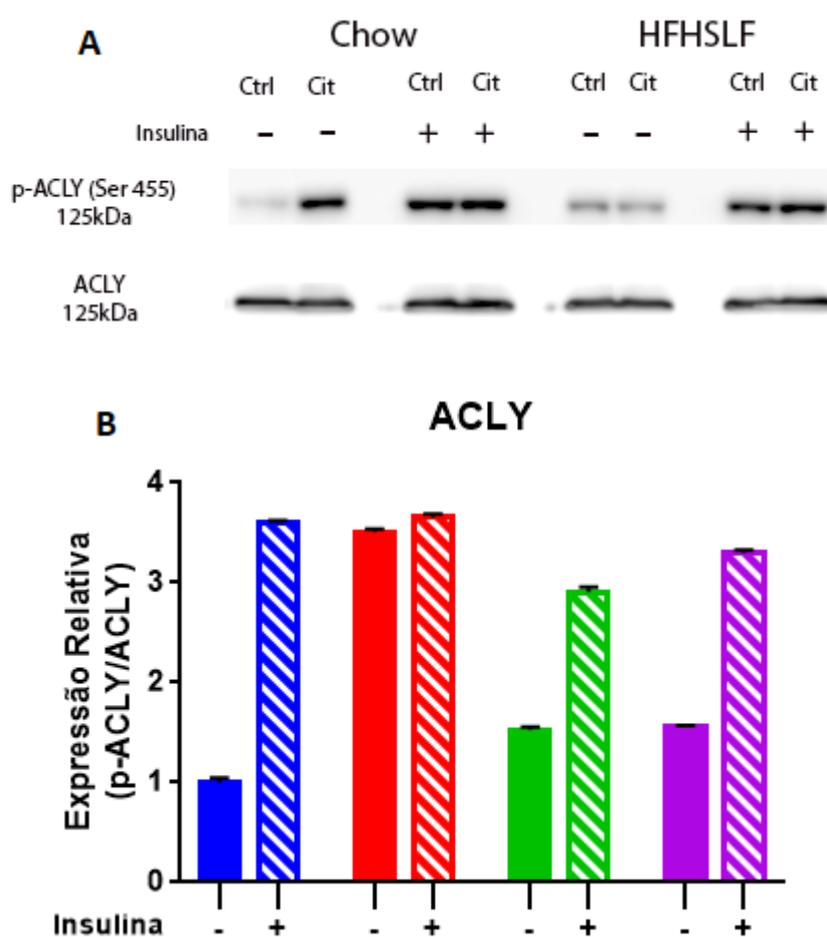


Figura 12: Análise da interferência da dieta e do citrato na quantidade de triglicerídeos hepáticos. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores ponto a ponto do controle (Chow) e os demais grupos; médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.

Apesar do citrato ingerido não interferir com o acúmulo de lipídeos no fígado dos animais utilizados nesta Dissertação, decidimos avaliar algumas enzimas ligadas ao metabolismo lipídico uma vez que essa via é afetada em situações de resistência à insulina. No citosol, o citrato é substrato da enzima ACLY, que o converte em Acetil-CoA e OAA. Essa enzima é regulada positivamente após fosforilação no resíduo S455. Nossos resultados mostram que a presença de citrato *per se* na dieta Chow leva a um aumento da fosforilação de ACLY em S455 de forma independente de insulina, um estímulo normalmente relacionado à fosforilação de ACLY (**Figura 13A e 13B**). Esse efeito do citrato não é aditivo ao efeito da insulina, já que os níveis de fosforilação de ACLY em S455 estimulada pelo hormônio não é afetada pela presença de citrato na dieta Chow (**Figura 13A e 13B**). Curiosamente, esse efeito do citrato sobre a fosforilação de ACLY em S455 não ocorre quando os animais recebem dieta HFHSLF (**Figura 13A e 13B**). A dieta HFHSLF *per se* leva a um pequeno aumento da fosforilação não estimulada por insulina de ACLY em S455 (**Figura 13A e 13B**). Entretanto, a fosforilação desta enzima estimulada por insulina não é afetada pela dieta HFHSLF ou pela presença de citrato nessa dieta (**Figura 13A e 13B**). Apesar de não observarmos qualquer

alteração nos níveis de ACLY total em qualquer dos grupos testados (**Figura 13A**), avaliando a expressão de mRNA para ACLY observamos uma diminuição de 50% no grupo HFHSLF+Cit, quando comparado a HFHSLF (**Figura 13C**). Não houve alteração da expressão de mRNA de ACLY nos outros grupos (**Figura 13C**). Ainda utilizando a técnica de qRT-PCR, avaliamos os níveis de mRNA de ACC1, ACC2 e CPT1 α , enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico. Observamos que a presença de citrato na dieta Chow aumenta a expressão das duas isoformas de ACC, ACC1 e ACC2 (**Figura 13C**). O mesmo acontece quando os animais são alimentados com a dieta HFHSLF, comparando ao Chow (**Figura 13C**). Entretanto, o grupo HFHSLF+Cit apresentou níveis de mRNA para ACC1 e ACC2 mais baixos que o grupo HFHSLF e similares ao grupo Chow (**Figura 13C**). Esse efeito é similar ao que foi observado para os níveis de mRNA de *mINDY*, apresentados da **Figura 10C**. Já a expressão de CPT1 α não é afetada por citrato em qualquer das condições testadas, sendo afetada apenas pela dieta HFHSLF, comparada ao grupo Chow (**Figura 13C**).



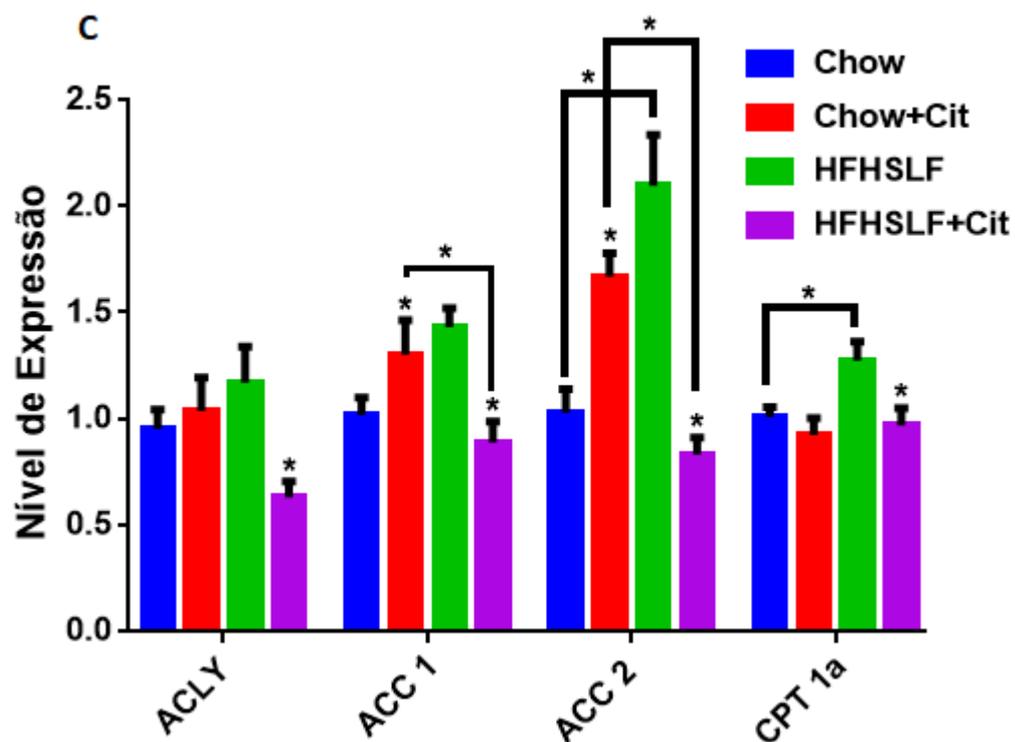
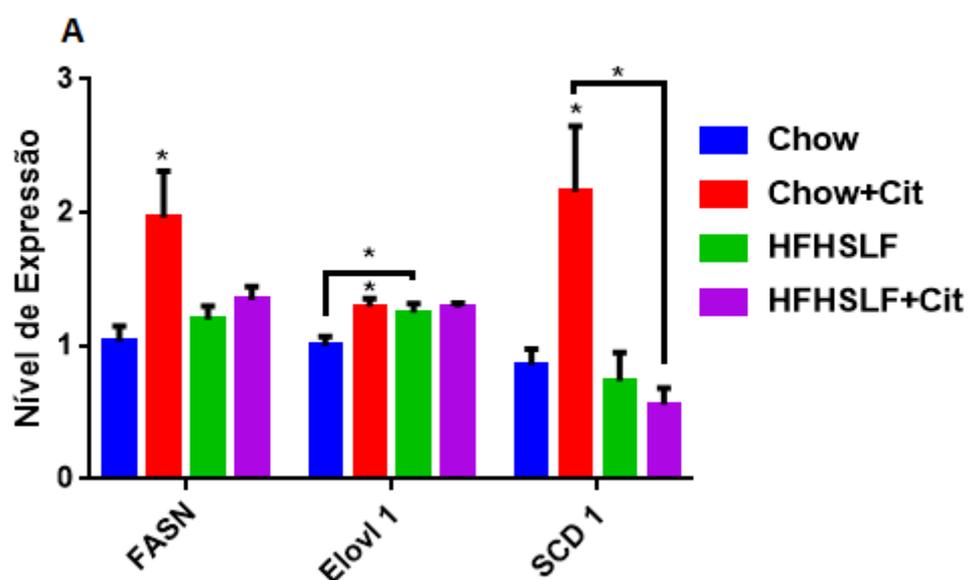


Figura 13: Análise do nível de expressão de enzimas chaves na via da lipogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima ACLY por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta das enzimas ACLY no *immunoblotting*; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da ACLY, ACC 1, ACC 2 e CPT1 α por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

Além dessas enzimas, verificou-se por qRT-PCR o nível de expressão das enzimas ácido graxo sintase (FASN), elongase (Elovl1) e esteroil-CoA desaturase (SCD1). A presença de citrato na dieta Chow eleva os níveis de mRNA para as três enzimas (**Figura 14A**). Além disso, a dieta HFHSLF *per se* eleva os níveis de mRNA para Elovl1, quando comparado a Chow (**Figura 14A**). Fora esses efeitos, nenhuma outra alteração é observada nos níveis de mRNA para estas três enzimas. Adicionalmente, o efeito do citrato sobre a expressão de SCD1 foi confirmado por *immunoblotting*, reforçando o efeito do citrato sobre a expressão desta enzima (**Figura 14B e 14C**).



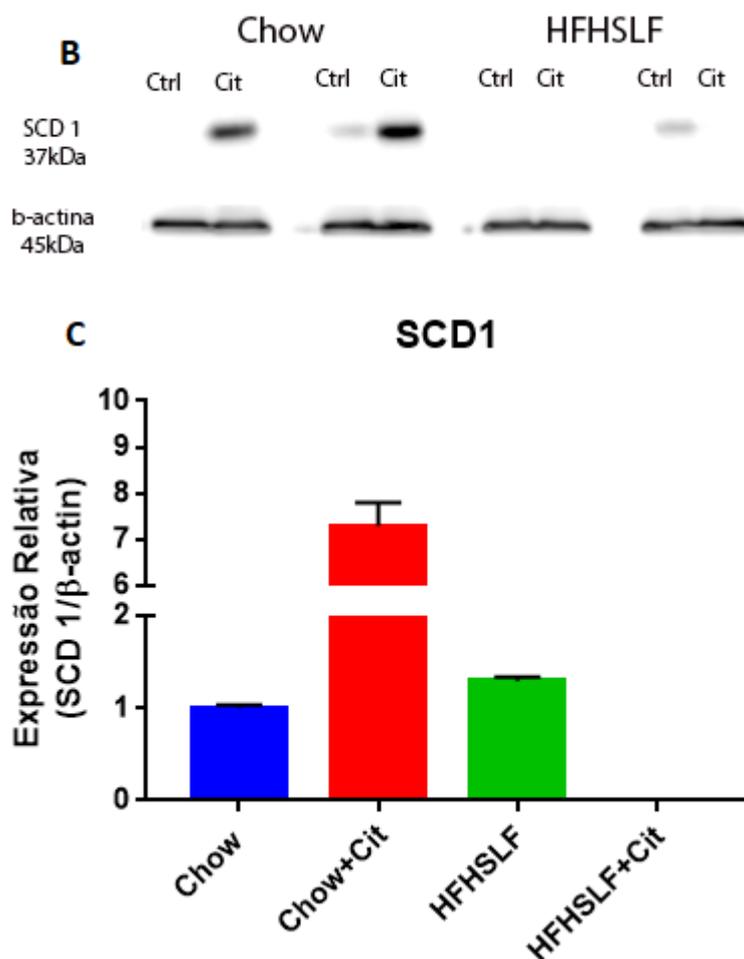
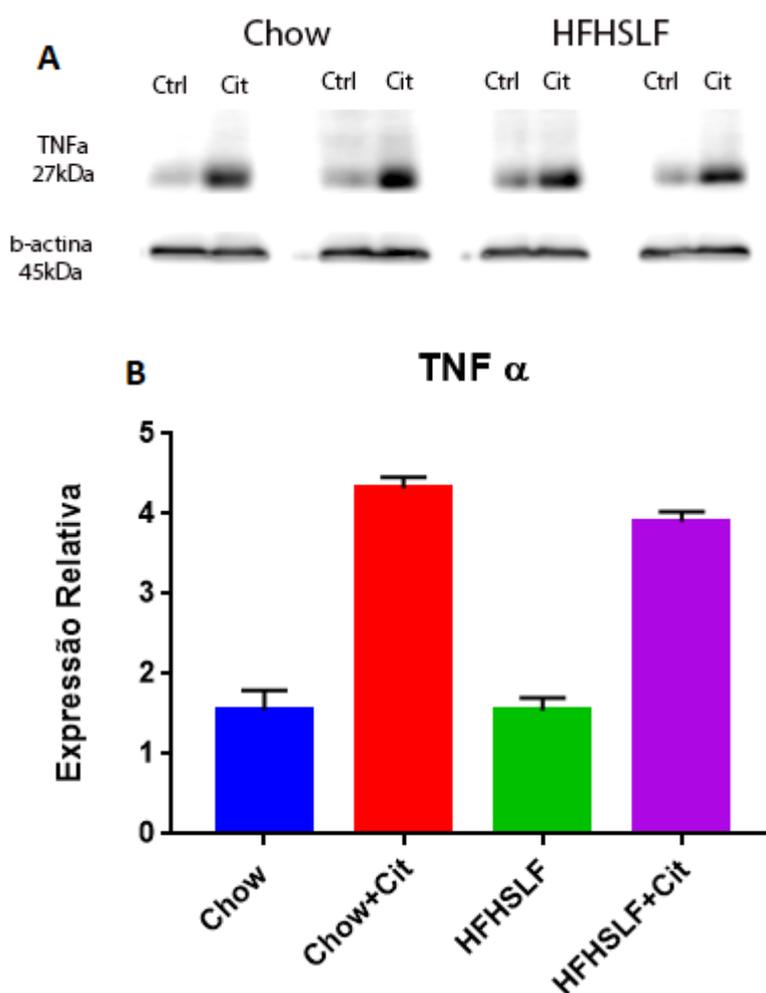


Figura 14: Análise do nível de expressão de enzimas chaves na via da lipogênese após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da FASN, Elovl1 e SCD1 por qRT-PCR. (B) Imagens representativas do perfil de resposta da enzima SCD 1 por immunoblotting; (C) Quantificação do perfil de resposta da enzima SCD1; A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

Como o aumento da síntese de lipídeos está relacionada ao acúmulo de gordura e esse acúmulo pode gerar uma inflamação tecidual, verificou-se o perfil inflamatório do fígado desses camundongos. A análise por *immunoblotting* mostrou que a presença de citrato aumenta o nível de expressão do marcador inflamatório TNF α tanto na dieta Chow quanto na dieta HFHSLF (**Figura 15A e 15B**). Além disso por qRT-PCR, observou-se que o citrato também promove a elevação dos níveis de IL-6 no grupo Chow (**Figura 15C**). A dieta HFHSLF também foi capaz de promover a elevação dos níveis de IL-6 quando comparados a Chow, e nesse caso, a adição de citrato a essa dieta não adicionou efeito (**Figura 15C**). Aparentemente, não houve

alteração no número de células de Kupfer em qualquer dos tratamentos, como pode ser observado pela expressão de mRNA para o marcador de macrófagos EMR1 (**Figura 15C**). Porém, ao analisar a polarização dessas células, observou-se que o citrato aumenta, independentemente da dieta, a expressão de MARCO, um marcador de macrófagos tipo M1, ao mesmo tempo que diminui a expressão de MRC1, marcador de macrófagos tipo M2. A dieta HFHSLF também promoveu a diminuição da expressão de MRC1, porém, sem afetar a expressão de MARCO (**Figura 15C**).



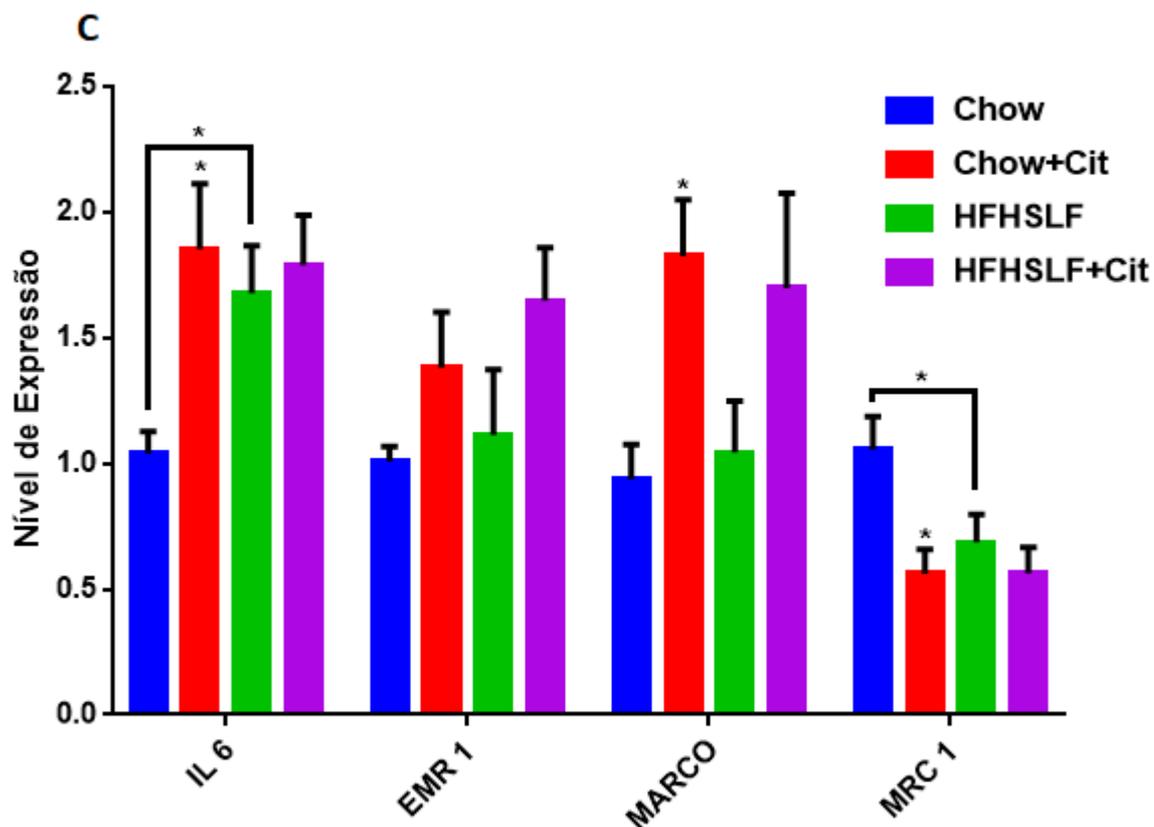


Figura 15: Análise do perfil inflamatório na presença do citrato após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas do perfil de resposta do marcador inflamatório TNF α por *immunoblotting*; (B) Quantificação do perfil de resposta do marcador inflamatório TNF α ; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA dos genes da IL-6, EMR1, MARCO e MRC1 por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

As análises acima mostradas foram realizadas com um homogeneizado total dos fígados dos animais, o qual inclui hepatócitos, células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) e células endoteliais. Visando avaliar o efeito do citrato somente sobre os macrófagos, realizou-se o ensaio com macrófagos imortalizados de camundongo (linhagem J774). Não observamos diferença significativa no nível de expressão de nenhum dos marcadores de polarização de macrófagos na presença de citrato (**Figura 16**) quando as células J774 foram incubadas durante 24 h na presença de 2 mM de citrato.

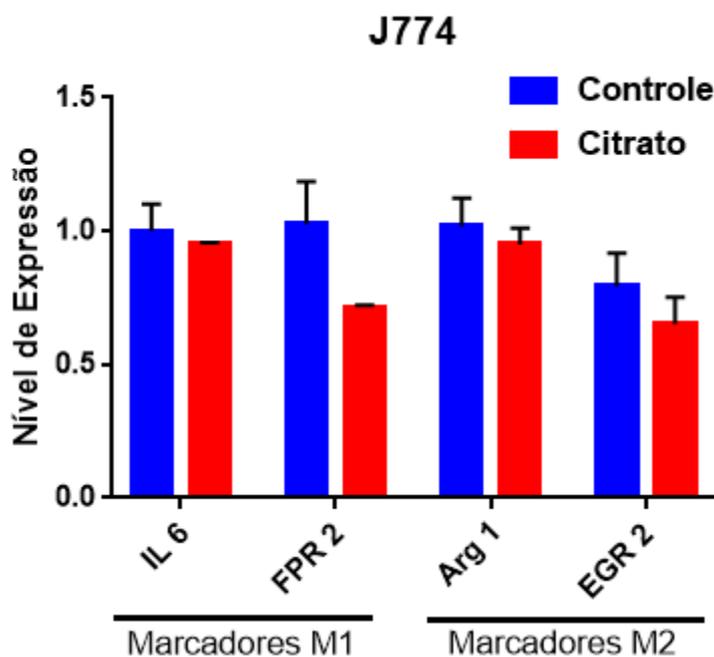
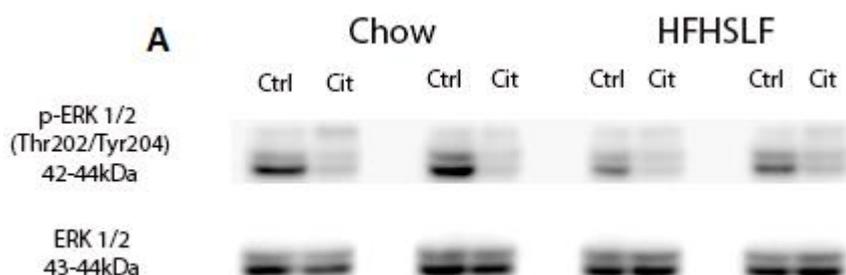


Figura 16: Análise por q-RT PCR de marcadores de polarização de macrófagos em cultura de célula J774. As barras azuis representam o grupo controle de células 24h com o meio em adição de nenhum composto enquanto que as barras vermelhas representam as células que foram submetidas ao tratamento de 24h de 2mM de citrato de sódio. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores. Médias comparadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey.

Além da via da AKT/mTOR, outra via que pode ser influenciada pela sinalização da insulina é a via das cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK/MAPK). Como foi visto que o citrato aumenta a curva glicêmica nos grupos tratados com citrato, analisou-se o efeito do citrato sobre a via de ERK, através da fosforilação de ERK1/2 em T202 e Y204. Observou-se que a presença de citrato diminui a fosforilação de ERK1/2 em T202/Y204 tanto no grupo Chow quanto no grupo HFHSLF (**Figura 17A e 17B**). Vale notar que a dieta HFHSLF *per se* levou a uma menor fosforilação de ERK1/2 em T202/Y204, mas não afetou o efeito do citrato sobre essa fosforilação (**Figura 17A e 17B**).



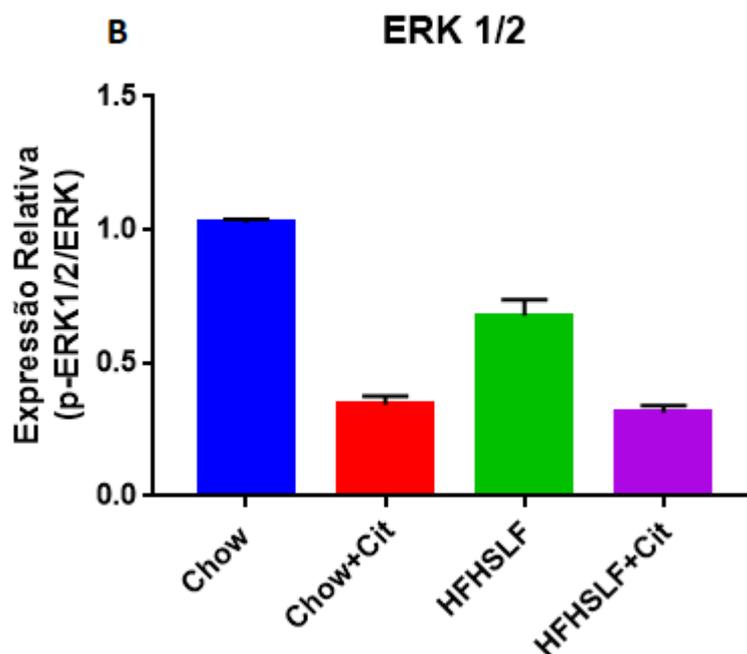
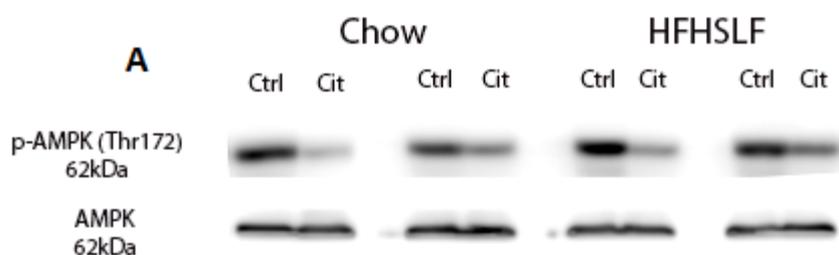


Figura 17: Análise da resposta de reguladores metabólicos na presença do citrato em ambas as dietas após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta de ERK 1/2 (T202/Y204) por immunoblotting; (B) Quantificação do perfil de resposta de ERK 1/2 (T202/Y204) no immunoblotting. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).

Na sequência, avaliamos a fosforilação da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), um importante sensor energético celular. Observou-se que, assim como os efeitos observados para ERK1/2, o citrato diminuiu a fosforilação de AMPK em T172 em relação ao grupo controle em ambas as dietas em cerca de 60% (**Figura 18A e 18B**).



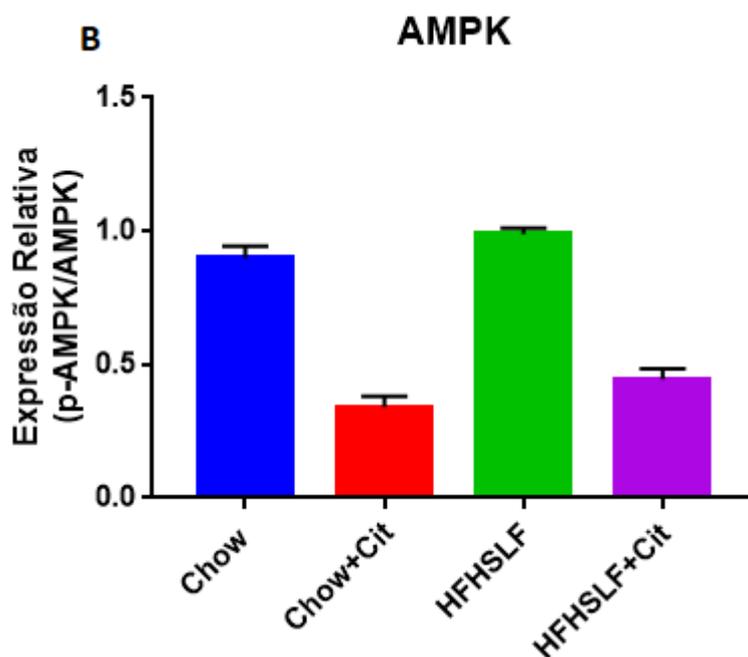


Figura 18: Análise da resposta de reguladores metabólicos na presença do citrato em ambas as dietas após um dia de dieta. (A) Imagens representativas do perfil de resposta de AMPK (T172) por imunoblotting; (B) Quantificação do perfil de resposta de AMPK (T172) no imunoblotting. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12).

Outro regulador metabólico, que se relaciona com AMPK, é a sirtuína 1 (SIRT1), que também é estimulada por um desbalanço energético. Pode-se observar que o citrato diminui a expressão de mRNA de SIRT1 em ambas as dietas (Figura 19).

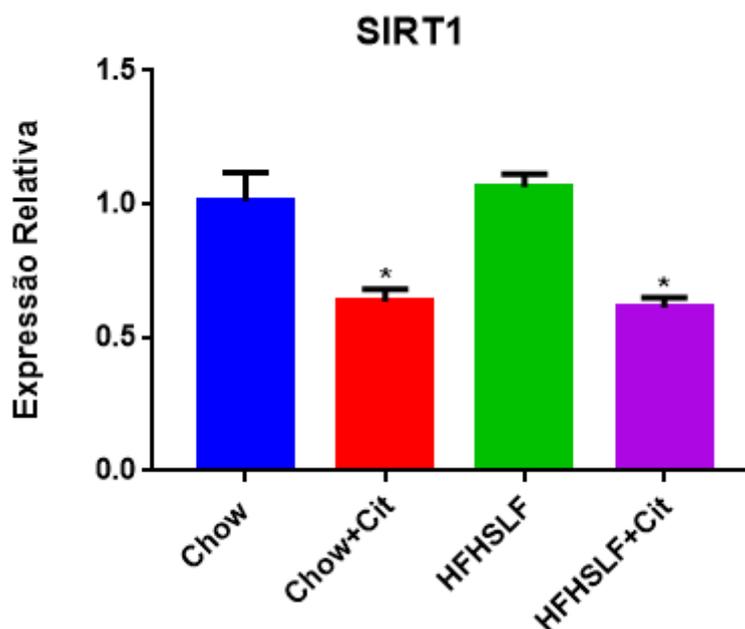
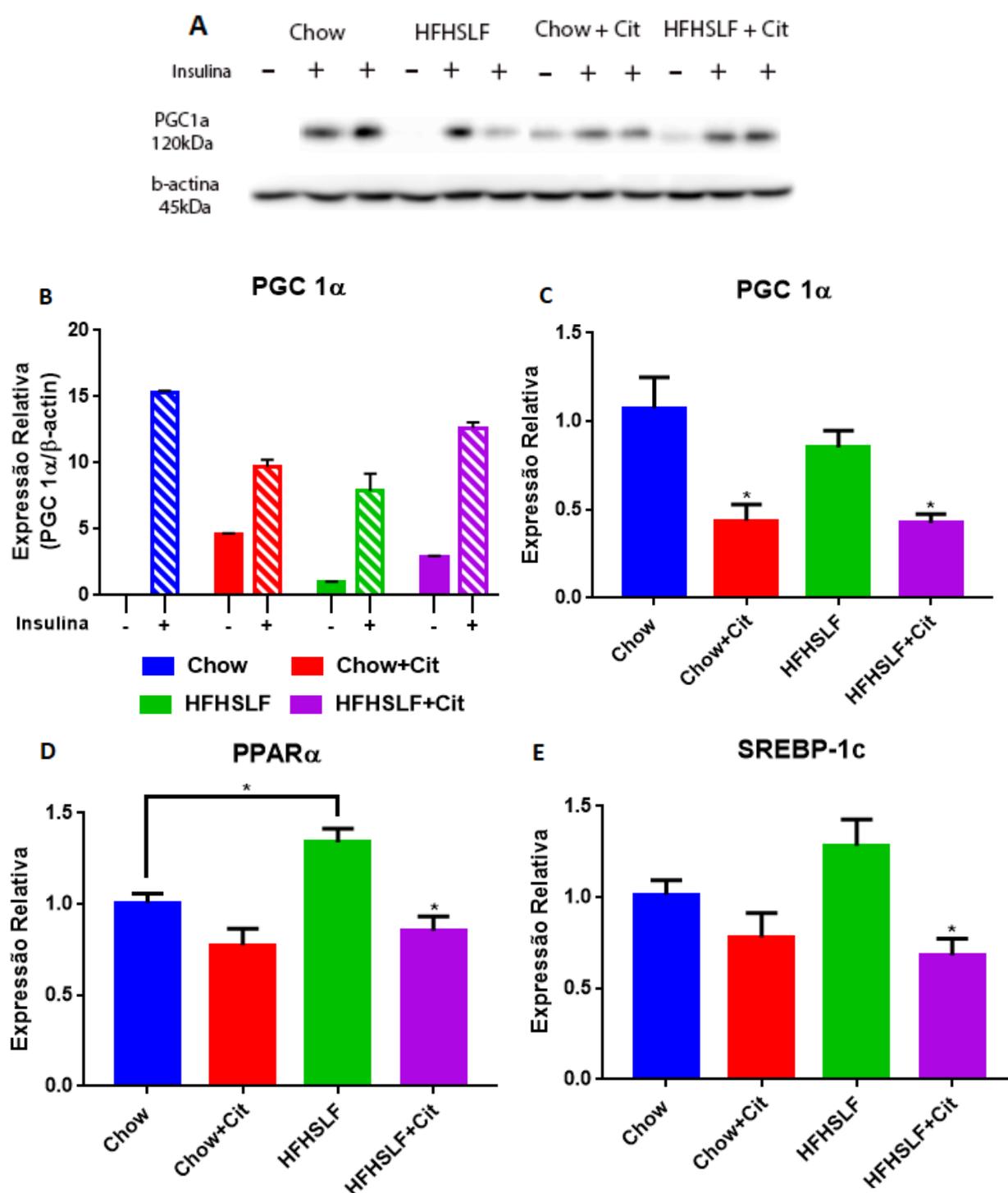


Figura 19: Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da SIRT1 por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. Valores representam média \pm erro padrão (n=10-12). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de uma via seguido de Pós-teste de Turkey.

Outros fatores que são modulados pela SIRT1 são PGC1 α e PPAR α , ligados a biogênese mitocondrial, e SREBP1c, ligada ao metabolismo de lipídeos. A expressão de mRNA para PGC1 α segue um padrão muito parecido com SIRT1, sendo diminuído pela presença de citrato em ambas as dietas (**Figura 20C**). Entretanto, PGC1 α sofre forte modulação de sua expressão por insulina. Por esse motivo, avaliamos os níveis desta proteína através de *immunoblotting* comparando os animais que receberam ou não insulina previamente à eutanásia. Podemos observar que a insulina aumenta a expressão desta proteína, sendo esse efeito diminuído quando o citrato encontra-se presente em ambas as dietas (**Figura 20A e 20B**). Vale notar que a dieta HFHSLF *per se* leva a uma diminuição da expressão de PGC1 α estimulada por insulina (**Figura 20A e 20B**), um indicativo de resistência ao hormônio. A expressão de PPAR α também é parecida com a expressão de SIRT1, porém com algumas peculiaridades. No caso do PPAR α , a dieta HFHSLF *per se* leva a um aumento da expressão desta proteína, o que é revertido pela presença de citrato nesta dieta (**Figura 20D**). O mesmo ocorre com o SREBP1c, que tem sua

expressão diminuída por citrato em ambas as dietas e aumentada pelo dia HFHSLF *per se* (**Figura 20E**). Ao analisarmos o fator receptor X hepático (LXR), que regula a expressão de SREBP-1c, não observamos alteração em sua expressão nos grupos tratados com citrato, apenas no grupo HFHSLF (**Figura 20F**), o que mostra que a expressão de SREBP-1c está sendo modulada por outro fator.



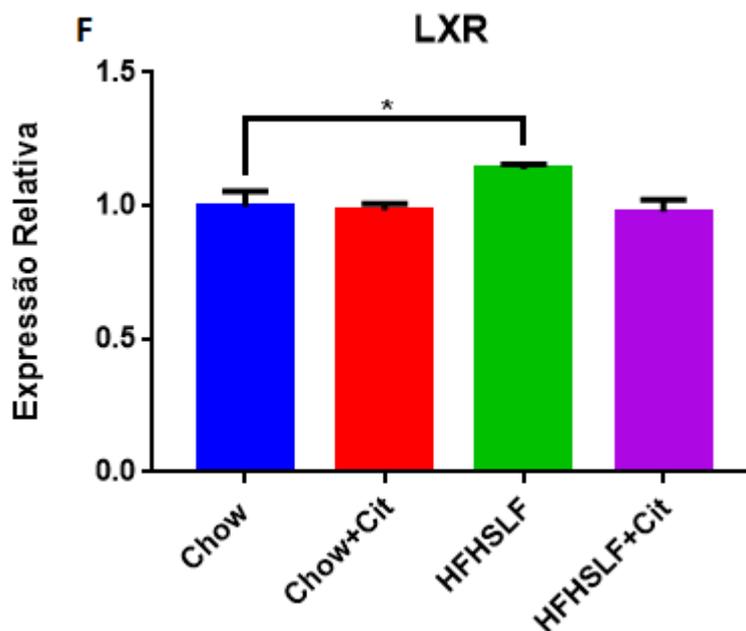


Figura 20: Análise da resposta de reguladores metabólicos após um dia de dieta, na presença ou ausência de citrato. (A) Imagens representativas de PGC1 α por immunoblotting; (B) Quantificação do perfil de resposta do regulador metabólico PGC 1 α no immunoblotting; (C) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da PGC1 α por qRT-PCR; (D) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da PPAR α por qRT-PCR; (E) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da SREBP1c por qRT-PCR; (F) Quantificação do nível de expressão de mRNA do gene da LXR por qRT-PCR. A identificação dos grupos se dá de forma que a barra azul representa os animais que receberam a dieta Chow, a barra vermelha representa os animais que receberam a dieta Chow+Citrato, a barra verde representa os animais que receberam a dieta HFHSLF e a barra roxa representa os animais que receberam a dieta HFHSLF+Citrato. As barras tracejadas representam os grupos de suas respectivas dietas que receberam insulina 30min antes da eutanásia enquanto que as barras preenchidas representam os animais que receberam uma solução salina antes da eutanásia. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores demarcados e quando sem marcação, referente ao controle de seu respectivo grupo (com ou sem citrato). Médias comparadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A humanidade tem enfrentado uma transição nutricional caracterizada pelo aumento dos quadros de sobrepeso e obesidade. Nas últimas décadas, o número de obesos adultos praticamente dobrou e, no último censo da OMS, cerca de um terço da população adulta mundial foi considerada composta por indivíduos com sobrepeso e 11% foram considerados indivíduos com obesidade (POPKIN; ADAIR; NG, 2013; WHO, 2018). Um dos agravantes para a ascensão da obesidade é a chamada “dieta ocidental”, que é caracterizada por ser uma dieta rica em gordura, açúcares, alimentos altamente processados, refinados, alto teor de sal, baixo consumo de fibras e contendo aditivos alimentares (POPKIN; ADAIR; NG, 2013; NEYRINCK et al., 2018). Dentre os aditivos, o citrato é o mais utilizado. Ele é um bom conservante alimentar e foi o primeiro a ser produzido biotecnologicamente em larga escala (EVANS; DE CHALLEMAISON; COX, 2010; PAULA NETO et al., 2017; YOSHIKAWA; SAITO; SAKURAGAWA, 2011).

Apesar do citrato ser considerado um aditivo inerte, ele também é um importante metabólito de processos bioenergéticos. O citrato está presente no Ciclo do Ácido Cítrico onde, em situações de baixa energética, é isomerado em isocitrato para dar fluxo ao ciclo e gerar potencial redutor para a produção de ATP (RAIMUNDO; BAYSAL; SHADEL, 2011). Em estado de excesso de energia, como após a alimentação, o excesso de citrato na mitocôndria é externalizado para o citoplasma através do transportador CIC (PALMIERI et al., 2015). O citrato citosólico será metabolizado em acetil-CoA pela ACLY e segue para a síntese de ácidos graxos e a de colesterol através da via do mevalonato. O citrato citosólico é, portanto, um substrato fundamental para a síntese endógena de AG e colesterol (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014).

Estudos recentes sugerem que o metabolismo do citrato está envolvido em diversos outros processos além do metabolismo energético, tais como: inflamação, câncer, DGHNA, secreção de insulina, resistência à insulina e acetilação de histonas (FLAMEZ et al., 2002; IACOBAZZI; INFANTINO, 2014; LEANDRO et al., 2016; MYCIELSKA et al., 2018; PIETROCOLA et al., 2015; SALMINEN et al., 2015). No

entanto, ainda não está muito claro como o citrato exógeno é metabolizado e se ele pode contribuir diretamente para esses processos.

Durante a execução dessa dissertação, procurou-se testar a hipótese de que o citrato exógeno poderia contribuir para o estabelecimento das alterações metabólicas associadas a DM2, como os mecanismos moleculares iniciais para o desenvolvimento de resistência à insulina e/ou a um acúmulo de gordura no fígado.

Camundongos CL57BL/6 receberam suas respectivas dietas contendo ou não citrato por 24 h. Estes animais não apresentaram ganho de peso, o que já era esperado, considerando o tempo de tratamento e que o acúmulo de gordura proveniente da dieta é um processo que leva tempo para ser percebido. Porém, nossos resultados já demonstraram um aumento nos níveis de glicose plasmática no grupo HFHSLF, com tratamento de citrato e o co-tratamento acentua esse aumento (**Figura 8**). O oGTT aponta para alguma resistência insulinêmica, indicando que o citrato pode estar interferindo nessa resposta.

Com base na resposta do oGTT, analisamos se o citrato poderia interferir na resposta insulínica desses animais. Para isso, verificou-se o padrão de resposta das principais proteínas reguladoras dessa via, como AKT, mTOR e RICTOR. Como já foi dito anteriormente, a fosforilação do resíduo T308 de AKT é um marcador da ativação da cascata de sinalização da insulina e o aumento na fosforilação em seu estado basal, com o tratamento com citrato, nos indica que o citrato está modulando essa via. Contudo, ao avaliar a fosforilação desta proteína estimulada por insulina, observamos claramente uma redução na fosforilação do resíduo T308 quando os animais foram alimentados com citrato. Este resultado nos indica que a cascata de sinalização insulínica está comprometida pelo citrato.

Em sequência, avaliamos o efeito do citrato sobre a proteína mTOR. Observamos que este diminuiu a fosforilação de mTOR em S2448 estimulada ou não por insulina no grupo Chow, contudo aumentou sua fosforilação no grupo HFHSLF+Cit quando estimulado com insulina. Uma possível explicação para este resultado dá-se ao fato de mTOR não ser modulado somente pelo eixo PI3K/AKT; outros estímulos celulares podem fosforilar e ativar essa proteína, como por exemplo

um processo inflamatório ou um desequilíbrio energético celular (TUO; XIANG, 2018).

A fosforilação basal em T1135 de RICTOR apresenta um aumento quando comparamos os resultados dos animais alimentados com dieta Chow e HFHSLF. Observamos que o citrato promove um aumento na fosforilação de RICTOR em T1135 sem o estímulo insulínico em ambas as dietas, contudo a fosforilação estimulada pela a insulina no grupo Chow+Cit é menor do que comparada ao grupo Chow. Estudos com câncer sugerem que tanto a glicose quanto o acetato podem ativar mTORC2, complexo que possui como uma de suas subunidades RICTOR, através da produção de Acetil-CoA (MASUI et al., 2015). Tanto a dieta HFHSLF quanto o citrato promovem um aumento das concentrações intracelulares de Acetil-CoA, podendo assim justificar o aumento da fosforilação basal de RICTOR. A diminuição da fosforilação de RICTOR nos grupos Chow+Cit e HFHSLF+Cit estimulados com insulina nos sugere que a sinalização insulínica está comprometida na presença de citrato.

Adicionalmente, avaliamos o efeito do citrato sobre a fosforilação de outro resíduo da proteína AKT. Nossos resultados mostram que o citrato estimulou a fosforilação de AKT em S473 no grupo Chow+Cit sem estímulo de insulina; porém, ao ser estimulado com insulina, sua resposta foi menor (Chow x Chow+Cit). Nos animais alimentados com a dieta HFHSLF, este efeito do citrato foi abolido (**Figura 9A**). Sob condições hiperinsulinêmicas, a inibição por *feedback* de IRS1 (através da fosforilação de resíduos de serina neste substrato) resulta na dessensibilização crônica da transdução de sinal da insulina e contribui para o estado de resistência à insulina. ERK1/2, PDK1 através da ativação de isoformas específicas de PKC (ex.: PKC ζ), mTORC1 e p70S6K, ativados por AKT, dentre outros, promovem fosforilações em diferentes resíduos de serina do IRS1 amplificando assim o *loop* de *feedback* negativo da cascata de sinalização da insulina (RHODES et al., 2013). Nossos dados mostram que o citrato promove um aumento na fosforilação de AKT em ambos os resíduos (T308 e S473) nos animais alimentados com a dieta Chow. Esse efeito é perdido na dieta HFHSLF. Contudo, quando avaliamos os feitos do citrato no fígado destes animais após o estímulo com insulina, observamos que o citrato bloqueia o efeito da insulina sobre a fosforilação

destas proteínas. De maneira geral, estes resultados são desfeitos na dieta HFHSLF na presença ou não de citrato. Assim, podemos concluir que o citrato está promovendo um quadro de resistência à insulina.

Não se tem descrito na literatura se o citrato exógeno promoveria o aumento na expressão de seu transportador específico de membrana plasmática. Sobre esse ponto de vista, não foi observado uma ligação entre concentração do substrato com a expressão de seu transportador. Observamos que existe um aumento de expressão do transportador específico de citrato SLC13A5 no HFHSLF+Cit, contudo o citrato e a dieta individualmente não possuem efeito na expressão dessa proteína. Enquanto que o citrato e a dieta HFHS aumentam o nível de expressão de mRNA desse transportador, a dieta HFHSLF+Cit não altera seu nível de expressão quando comparado ao grupo Chow. A diferença nos resultados encontrados na expressão da proteína e de seu mRNA nos sugere que exista uma regulação da degradação do transportador de citrato pela presença deste aditivo na dieta.

Quando há um aumento do aporte de citrato para o meio intracelular, vias como a gliconeogênese, lipogênese e síntese de colesterol serão estimuladas, pelo aumento das concentrações citoplasmáticas de acetil-CoA e OAA, além de levar à inibição da glicólise (**Figura 21**). Sabe-se que, numa condição de resistência à insulina fatores como: o aumento do suprimento de precursores glicogênicos para o fígado (glicerol, aminoácidos, AG livres), o aumento do conteúdo lipídico hepático, citocinas e adipocinas e a diminuição da sinalização do receptor de insulina nos hepatócitos contribuem para a aumento da gliconeogênese (LIN; ACCILI, 2011). Assim, analisamos se o citrato exógeno aumentaria a expressão de PEPCK, enzima importante ligada à via gliconeogênica. Surpreendentemente, tanto na dieta Chow quanto na dieta HFHSLF, a presença de citrato diminuiu a expressão tanto da proteína quanto no mRNA de PEPCK. Apesar do citrato ser um dos precursores para a via gliconeogênica, aparentemente ele não está sendo direcionado para essa via, podendo assim estar direcionado para a via lipogênica.

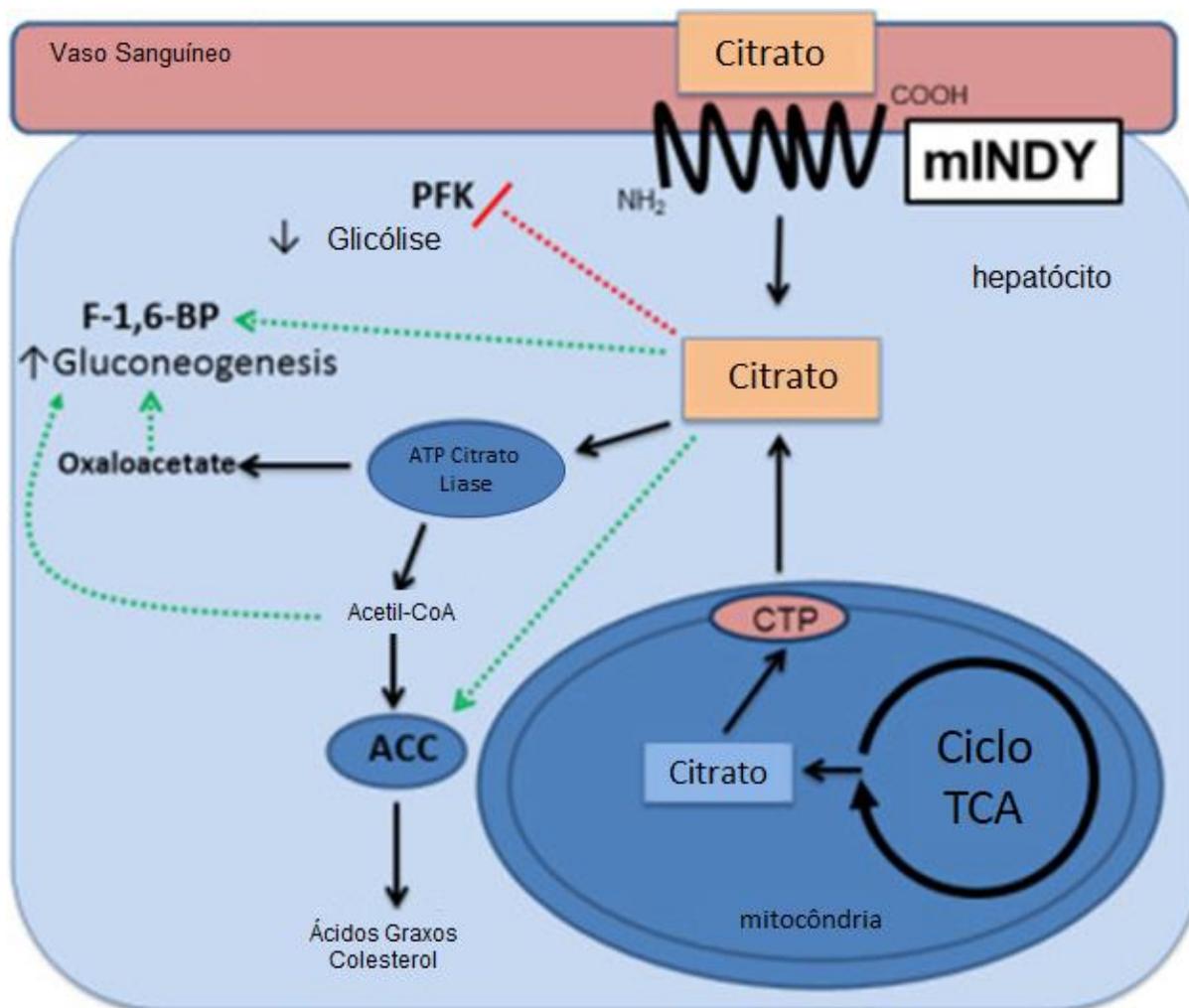


Figura 21: Representação esquemática de vias metabólicas afetadas por moléculas de citrato intracelular. Adaptado de (WILLMES; BIRKENFELD, 2013)

Quando os carboidratos são abundantes, o fígado não utiliza apenas a glicose como combustível metabólico, mas também converte a glicose em AG. Os hepatócitos também podem obter esses AG da corrente sanguínea, que são liberados pelo tecido adiposo, ou absorvidos pela digestão dos alimentos no trato gastrointestinal (RUI, 2014). Como um dos fatores que podem corroborar para a resistência à insulina é o acúmulo de gordura hepática, foi analisado se 24 h seria tempo suficiente para se observar um acúmulo de gordura no fígado. Nossos dados mostram que somente houve aumento significativo no acúmulo de TAG nos animais submetidos à dieta HFHSLF independente da presença ou ausência do citrato, mostrando que, um dia de dieta suplementada com citrato não é o suficiente para promover o acúmulo de gordura no fígado dos animais (**Figura 12**). Contudo, acreditamos que o citrato possa auxiliar no processo de ganho de peso e acúmulo

de gorduras no fígado de indivíduos que se alimentam majoritariamente com uma dieta “ocidental”. Assim, analisamos as principais enzimas do metabolismo de lipídios. Observamos que a fosforilação basal de ACLY em S455 foi aumentada pelo citrato nos animais alimentados com a dieta padrão (Chow x Chow+Cit). Por outro lado, observamos o citrato não promove mudanças na fosforilação desta enzima nos animais alimentados com HFHSLF e também não é capaz de interferir na fosforilação da ACLY S455 induzida por insulina (**Figura 13A**). Por PCR, observamos uma redução na expressão da enzima na condição HFHSLF+Cit, se comparada as outras condições, o que não se traduz no perfil de expressão da proteína observado no *immunoblotting*. Assim, nossos resultados indicam que, em 24 h, o efeito principal do citrato é alterar o padrão de fosforilação, e acreditamos de atividade, da ACLY.

A etapa limitante da lipogênese é catalisada pela ACC que carboxila Acetil-CoA à Malonil-CoA (BROWNSEY et al., 2006). Por outro lado, Malonil-CoA inibe o transporte mitocondrial de AG pela CPT1. Nossos resultados indicam que o citrato é modulador positivo da expressão de ACC2, mas não altera a expressão de ACC1 e de CPT1 α . A dieta HFHSLF, por sua vez, promove aumento na expressão de ACC1, ACC2 e CPT1 α , enquanto o citrato promove uma reversão deste estímulo (HFHSLF x HFHSLF + Cit) (**Figura 13D**). É descrito que a forma ativa de ACC é sua forma defosforilada e que o citrato é um ativador dessa enzima (BROWNSEY et al., 2006). As carnitina aciltransferases catalisam a transferência de CoA entre o grupamento acil e a carnitina e são cruciais no catabolismo de AG, pois as moléculas de acil-CoA são incapazes de atravessar a membrana mitocondrial interna e têm que ser convertidos no respectivo éster de carnitina por CPT1, localizado dentro da membrana mitocondrial externa (VIOLANTE et al., 2013). Apesar do citrato estar aumentando a síntese de AG, ele não interfere na expressão de CPT1 α , nos indicando que, a princípio, ele não está modulando a β -oxidação.

A enzima FASN sintetiza moléculas de AG de cadeia curta (SCFA) (STRABLE; NTAMBI, 2010) que são alongadas por membros da família da elongase acil-CoA (Elovl) no retículo endoplasmático para gerar LCFAs. Sua deleção protege contra esteatose hepática e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em gordura aterogênica (AHFD) e a superexpressão hepática de Elovl

aumenta a fibrose hepática induzida por AHFD (MATSUZAKA et al., 2012). O aumento de expressão de mRNA de FASN no grupo Chow+Cit, nos indica que o citrato estimula a síntese de ácidos graxos, contudo não foi visto alteração de sua expressão nos grupos HFHSLF e HFHSLF+Cit. Com uma maior síntese de AG, a análise seguinte foi em relação ao aumento da cadeia de AG e foi observado que a dieta HFHSLF aumenta a expressão de Elovl1 assim como o citrato (**Figura 14**).

As LCFAs podem ser dessaturadas pelas esteroil-CoA dessaturases (SCD), enzimas de membrana do retículo endoplasmático, para formar AG monoinsaturados (MUFA) e AG poliinsaturados (PUFA). Os produtos da SCD1 são importantes reguladores do metabolismo da glicose e lipídios no fígado (MIYAZAKI et al., 2007) e o *knockout* global de SCD1 protege contra a obesidade (AGIUS, 2008; BEDNARSKI et al., 2016; COHEN et al., 2002). No grupo Chow+Cit, o marcador SCD1 está muito expresso, o que nos indica que estes animais possuem a via da lipogênese *de novo* aumentado. Estudos sugerem que a SCD1 desempenha um papel crucial na regulação da homeostase metabólica e lipídica e demonstraram que a mutação do gene SCD1 e/ou sua deficiência prejudica a produção de TAG constitutiva induzida por dieta, aumenta a sensibilidade à insulina, reduz a adiposidade visceral e aumenta a resistência à obesidade induzida por dieta (ALJOHANI; SYED; NTAMBI, 2017; BEDNARSKI et al., 2016; CHEN et al., 2008, 2004, 2005; DRAGOS et al., 2017; GREEN et al., 2005; XU; SEYFERT; SHEN, 2017). A alimentação de dietas ricas em carboidratos está associada à regulação positiva da expressão de mRNA da SCD1 hepática. Além disso, níveis elevados de TAG em jejum e pós-prandial, em modelos de roedores, podem levar ao aumento significativo na via da lipogênese *de novo*, a qual converte o excesso de carboidratos em lipídios para armazenamento como AG e TAG (**Figura 22**) (CHEN et al., 2004, 2005; COHEN et al., 2002).

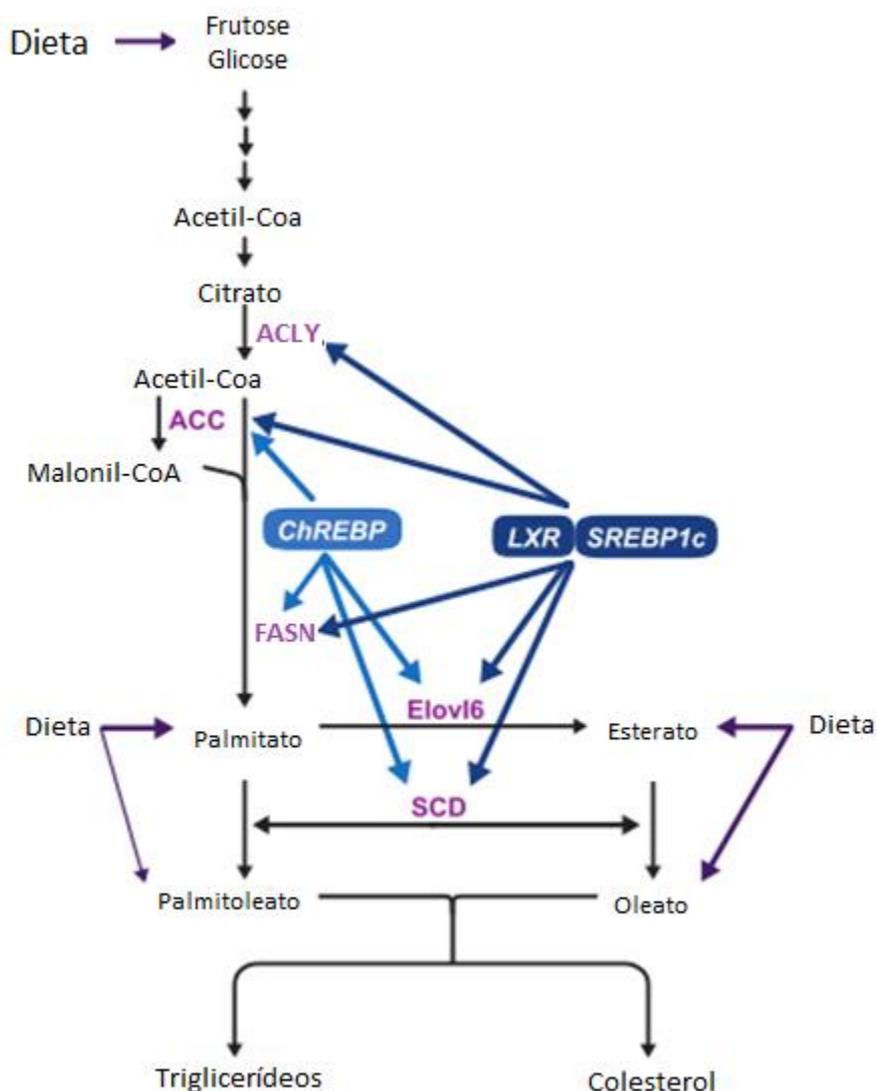


Figura 22: Via da síntese *de novo* de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e regulação de genes lipogênicos por fatores de transcrição (LXR, SREBP-1c e ChREBP). Siglas: ACLY, ATP-citrato liase; ACC, acetil-CoA carboxilase; FASN, ácido graxo sintase; ELOVL6, membro da família de alongamento de AG de cadeia longa 6 (elongase 6); SCD, estearoil-CoA dessaturase; LXR, receptor de fígado X; SREBP-1c, proteína de ligação ao elemento regulador do esterol 1c; ChREBP, proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos. Adaptado de (STRABLE; NTAMBI, 2010)

O aumento da síntese de AG hepática pode atuar como um indutor de sistemas de oxidação de AG que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo (FAN et al., 1996; REDDY; RAO, 2006). O estresse oxidativo causa a liberação de várias citocinas, incluindo TNF- α , e interleucinas pelas células de Kupffer (CHUNYUE YIN, KIMBERLEY J. EVASON, 2010). Essa liberação de citocinas e interleucinas pode levar polarização dos macrófagos associados a produção de citocinas pró-inflamatórias, chamados M1, que está relacionado ao aumento de ROS e ao estabelecimento de resistência à insulina. A

possível resistência insulínica está associada com concentrações maiores de TNF α no tecido hepático, podendo assim contribuir para a instalação de um ambiente inflamatório (LABONTE; TOSELLO-TRAMPONT; HAHN, 2014). Este cenário sugere que há um desequilíbrio na polarização de macrófagos, levando a uma polarização maior de M1 do que M2. Além disso, a sinalização da insulina no hipotálamo estimula a produção de IL-6 no fígado, e esta, por sua vez, suprime a gliconeogênese por ativar moléculas que se ligam ao promotor de enzimas dessa via (INOUE et al., 2006; RAMADOSS et al., 2009).

Nossos resultados confirmam os dados acima descritos e incluem o citrato como um modulador do processo inflamatório. A presença do citrato em ambas as dietas aumentou a expressão de TNF α e IL-6. O aumento desses marcadores é um indicativo de uma resposta inflamatória, portanto realizamos o ensaio utilizando o marcador EMR1, que é um marcador de macrófagos. Não se observou aumento no número desses macrófagos, porém sua polarização foi alterada pela presença do citrato, aumentando a polarização para M1 e diminuindo a polarização para M2. Dada a incerteza se era o citrato que estava modulando a polarização desses macrófagos, realizou-se um teste com a linhagem celular J774. Nossos ensaios *in vitro* não mostraram nenhum tipo de polarização desses macrófagos induzida por citrato na concentração (2 mM) e tempo (24 h) testados. Não podemos concluir de maneira decisiva se o citrato não é, diretamente, um indutor da polarização de macrófagos. Serão necessários experimentos adicionais variando a dose e o tempo de incubação e, até mesmo, a linhagem celular utilizada para concluirmos algo sobre este aspecto. Adicionalmente, o estudo de LEANDRO et al., (2016) sugere que o citrato exógeno pode tornar o tecido adiposo mais propenso a desenvolver inflamação e já foi demonstrado que o metabolismo do citrato pode contribuir para a atividade pró-inflamatória dos macrófagos em resposta ao LPS através do seu papel nas concentrações de acetil-CoA citosólico (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014; INFANTINO et al., 2013). Porém as análises desses estudos mostram que o citrato, no metabolismo hepático a curto prazo, não modula a polarização dos macrófagos e que essa resposta inflamatória encontrada pode ser de tecidos extra-hepáticos.

Pontos de regulação cruzada entre as vias metabólicas são comuns e esses pontos de integração atuam tanto para regular diretamente os componentes da via quanto para convergir na regulação de alvos controlados por outras vias. Embora seja plausível que a sinalização PI3K-AKT cruze com todas as principais vias de transdução de sinal nas células em um ou mais pontos, a diversidade e a complexidade dos mecanismos de *cross-talk* são exemplificadas por aqueles com as vias RAS-ERK e AMPK (MANNING; TOKER, 2017). De fato, existe uma relação particularmente íntima entre as vias PI3K-AKT e RAS-ERK, onde os inibidores de uma via geralmente ativam a outra. Um dos primeiros substratos da AKT identificados foi a proteína cinase RAF que é ativada pelo RAS e inicia uma cascata de cinases que culmina com a ativação de ERK.

Como foi observado anteriormente, o citrato diminui a ativação de proteínas como AKT, mTOR e RICTOR estimulada por insulina, que fazem parte de uma via metabólica que interage e possui o mesmo sinal de origem da via de ERK. Nosso estudo mostra que o citrato também diminui a ativação de ERK1/2 em ambas as dietas e que a dieta HFHSLF *per se* também diminui sua fosforilação, porém sem afetar o efeito proveniente do citrato, mais um indicativo que a sinalização insulínica está comprometida.

Com a observação que a sinalização da insulina está comprometida nessas células, é possível que haja um desbalanço energético e a principal proteína relacionada a esse desequilíbrio é a AMPK. Essa enzima é sensível ao balanço energético celular e é ativada pelo aumento na razão AMP/ATP-ADP/ATP de uma célula. Quando ativada, inicia eventos metabólicos e genéticos que restauram os níveis de ATP, estimulando processos que geram ATP (por exemplo, oxidação de AG) e inibindo outros que consomem ATP, mas não são necessários para a sobrevivência (por exemplo, síntese de TAG e proteínas e a proliferação celular). Além disso, AMPK ativada promove mudanças na biogênese e função mitocondrial que poderiam aumentar mais cronicamente a capacidade de uma célula de gerar ATP e diminuir o estresse oxidativo (HARDIE, 2011, 2018; HARDIE; ASHFORD, 2014).

O citrato diminuiu a ativação de AMPK por diminuir sua fosforilação (Figura 17A). Isso pode ser explicado por AMPK ser um sensor energético celular. Com o aumento das concentrações de citrato no meio intracelular, as vias anabólicas estarão estimuladas para armazenar essa energia potencial proveniente do citrato. Altas concentrações de ATP no meio inibem alostericamente a ativação de AMPK e auxiliam a atividade das fosfatases que desfosforilam a AMPK ativada (HARDIE, 2014).

Avaliamos nesta Dissertação alguns possíveis transdutores de sinais e fatores de transcrição que poderiam estar envolvidos na regulação das vias metabólicas moduladas por citrato. Neste contexto, sabe-se que a insulina estimula indiretamente a expressão de SREBP-1, por ativar mTORC1, e LXR, aumentando a fosforilação de fator estimulador 1 prévio (USF-1 - *Upstream stimulatory factor 1*), e estimula a expressão de FASN e G3P aciltransferase mitocondrial (mGPAT) (LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010; WONG et al., 2009). LXR são receptores nucleares e são ativados por metabólitos do colesterol regulando a expressão de genes envolvidos no metabolismo de AG e colesterol (GREEN et al., 2005). O LXR se liga diretamente ao promotor e aumenta a expressão do SREBP-1c (REPA et al., 2000; SCHULTZ et al., 2000), um fator de transcrição relacionado a síntese de lipídeos e de PFK-2, que estimula a glicólise (ZHAO et al., 2012). Por sua vez, SREBPs são fatores de transcrição que estão criticamente envolvidos na regulação da síntese de lipídios e, entre os membros dessa família, o SREBP-1c é o que é mais expresso no fígado e é responsável pela regulação da síntese hepática de TAG. Após ativada, o SREBP-1c se liga e ativa genes lipogênicos, como FASN, ACC1 e SCD1, para estimular a lipogênese hepática (WALKER; NÄÄR, 2012). Além disso, SREBPs são proteínas integrais da membrana do retículo endoplasmático que são translocados para o complexo de Golgi e clivados sequencialmente por proteases para liberar SREBPs transcricionalmente ativos (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002). A ativação do SREBP está sujeita a modificações pós-traducionais, como por exemplo, acetilação e fosforilação. AMPK fosforila SREBP-1c em S372 e inibe as clivagens proteolíticas e a translocação nuclear de SREBP-1c, suprimindo assim a lipogênese hepática (LI et al., 2011). Adicionalmente, a SIRT1 desacetila e inibe a SREBP-1c, suprimindo a lipogênese no fígado (DING; BAO; DENG, 2017; KEMPER; CHOI; KIM, 2013; PONUGOTI et al., 2010). A desacetilação de SREBP-1c pela SIRT1 promove a

ubiquitinação, a degradação proteosomal e diminui sua estabilidade e ocupação nos genes lipogênicos (PONUGOTI et al., 2010; WALKER; NÄÄR, 2012).

Neste trabalho, de maneira geral, observamos uma redução na expressão destes fatores de transcrição modulada por citrato. SREBP1c e SIRT1 estão significativamente menos expressas nos grupos Chow+Cit e HFHSLF+Cit. Esta modulação negativa exercida pelo citrato pode indicar que, após o tempo de tratamento (24 h) e as 6 h de jejum, o citrato de alguma forma está diminuindo a lipogênese ou perdendo sua capacidade de regulação destes genes. Quando avaliamos o fator LXR, não foi observado alteração em sua expressão nos grupos tratados com citrato, apenas no grupo HFHSLF, se comparado ao grupo Chow, observamos um ligeiro aumento na sua expressão (**Figura 20**). É preciso lembrar que foi feito um tratamento agudo de citrato e que as condições analisadas são respostas pontuais e não crônicas e, para que seja possível observar se a administração de citrato contínuo modula o metabolismo de forma crônica, são necessários tratamentos de médio e longo prazo.

As sirtuínas são um grupo de desacetilases dependentes de NAD⁺ altamente conservadas que desempenham funções importantes em numerosos processos biológicos. Entre as sete sirtuínas de mamíferos, a sirtuína 1 (SIRT1) é a mais extensamente estudada e está envolvida em doenças como DGHNA e DGHA. A SIRT1 desempenha papel benéfico na regulação do metabolismo lipídico hepático, controlando o estresse oxidativo e mediando a inflamação hepática através da desacetilação de alguns reguladores transcricionais (DING; BAO; DENG, 2017). Evidências crescentes demonstraram que a SIRT1 atua como um importante sensor metabólico/energético, que diretamente acopla o status metabólico celular (via relação intracelular NAD⁺/NADH), à atividade transcricional e/ou expressão gênica de vários fatores cruciais de transcrição além de coativadores de transcrição que estão envolvidos na homeostase metabólica. Estes incluem ChREBP, SREBP-1c, PPAR α , PGC1 α e NF- κ B (DING; BAO; DENG, 2017; KEMPER; CHOI; KIM, 2013) (**Figura 23**).

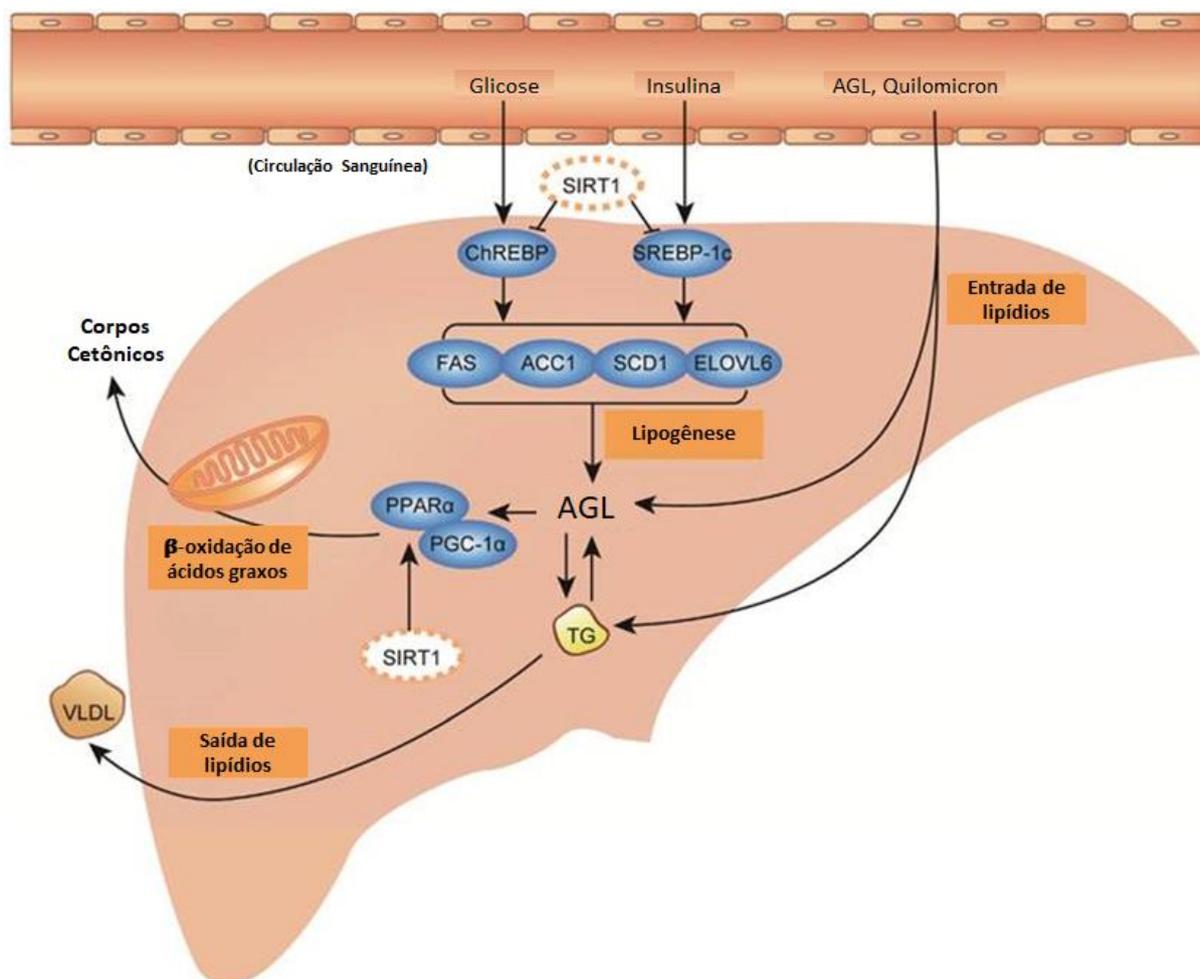


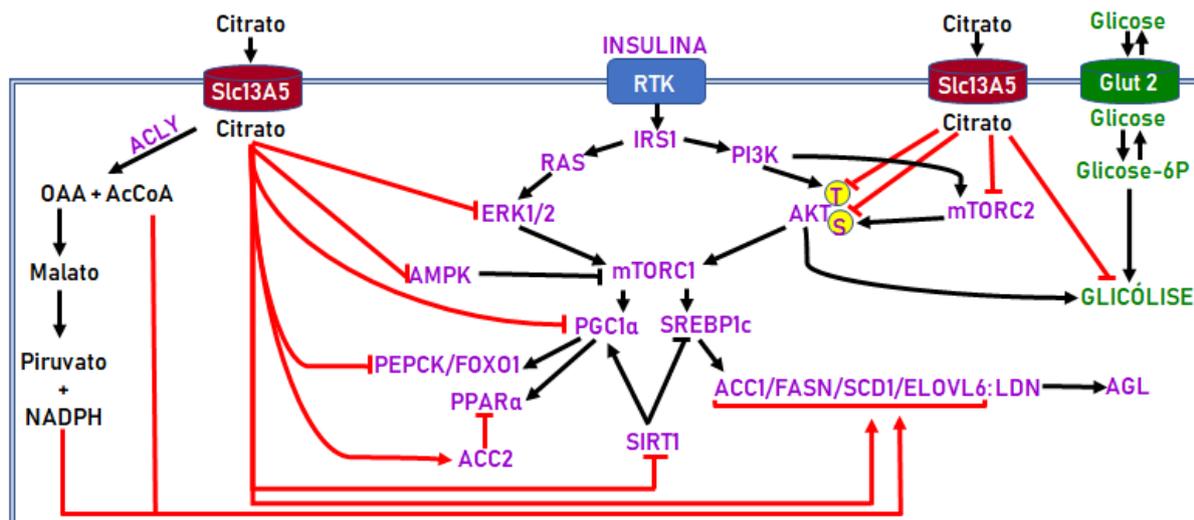
Figura 23: Representação esquemática da ação de SIRT 1 sobre o metabolismo de lipídeos. Adaptado de (DING; BAO; DENG, 2017)

SIRT, AMPK e mTOR são considerados sensores de energia molecular e muitos reguladores transcricionais gliconeogênicos são substratos de dessas moléculas. A PGC1 α é uma proteína que possui sua capacidade de ativar genes gliconeogênicos diminuída quando acetilada (LERIN et al., 2006). SIRT1 desacetila a PGC1 α , ativando assim a gliconeogênese (RODGERS et al., 2005). Assim, em resposta a condições de baixa energética, como o jejum e restrição calórica, a SIRT1 é induzida, interagindo e desacetilando PGC1 α , controlando as vias gliconeogênica e glicolítica no fígado (RODGERS et al., 2005, RODGERS & PUIGSERVER, 2007). A PGC1 α é um coativador de PPAR α bem caracterizado que promove a β -oxidação (VEGA; HUSS; KELLY, 2000) e SIRT1 também interage fisicamente com o PPAR α , promovendo a atividade transcricional de PPAR α no fígado (PURUSHOTHAM et al., 2009).

Os produtos da FASN servem como ligantes endógenos para o PPAR α , um dos principais reguladores da β -oxidação de AG tanto nas mitocôndrias quanto nos peroxissomos (KERSTEN et al., 1999). A expressão do PPAR α no fígado é maior no estado de jejum, e sua deleção diminui a oxidação do AG hepático em jejum e exacerba a esteatose hepática induzida pelo jejum, hipoglicemia, hipocetonemia e hipotermia (KERSTEN et al., 1999; LEONE; WEINHEIMER; KELLY, 1999).

Quando avaliamos as expressões de PGC1 α e PPAR α observamos que, por *immunoblotting*, os níveis proteicos de PGC1 α estão reduzidos nos grupos que receberam a administração de citrato, mostrando que a resposta a esse marcador está comprometida pelo citrato. A menor expressão do gene de PGC1 α condiz com o *immunoblotting* e também com a menor expressão de PPAR α (**Figura 20**), ambos indicando uma diminuição na biogênese mitocondrial.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que, embora um tratamento agudo com citrato dietético não tenha impacto sobre o ganho de peso em camundongos C57BL/6, é provável que o mesmo possa estar atuando como um agente facilitador do desenvolvimento da obesidade. Para isso, os resultados indicam que o citrato pode estar sinalizando de duas formas diferentes dentro da célula: aumentando a lipogênese celular com o conseqüente acúmulo de gordura, levando a um processo inflamatório local que desencadeia uma resposta molecular semelhante à resistência à insulina; e promovendo a acetilação de proteínas por aumentar a disponibilidade de Acetil-CoA intracelular *per se* e por reduzir a expressão de deacetilases como a SIRT1 (**Figura 24**). No entanto, estudos de médio e longo prazo são necessários para confirmar essas hipóteses.



EFEITOS DO CITRATO EXÓGENO NA SINALIZAÇÃO INSULÍNICA DO FÍGADO INDEPENDENTE DE DIETA.
 - Redução da utilização hepática de glicose, aumento da LDN, intolerância à glicose -

Figura 24: Representação esquemática do efeito do citrato no metabolismo do fígado dos camundongos após 1 dia de dieta.

6 CONCLUSÃO

As alterações metabólicas oriundas da ingestão de citrato num curto período de tempo de tratamento são diversas e dissociadas da dieta hipercalórica. Aparentemente, os parâmetros modulados pelo citrato, principalmente aqueles relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina, podem ser exacerbados pela dieta hipercalórica. O tratamento agudo com esse aditivo alimentar já mostrou ser potencializador da resposta inflamatória e promotor de intolerância à glicose frente a dieta, mostrando a importância do citrato no cenário da alimentação contemporânea.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse estudo foi baseado nos efeitos de um tratamento agudo do citrato e as condições analisadas são respostas pontuais e não crônicas. Apesar disso, mostrar o potencial do citrato como iniciador do desenvolvimento de resistência à insulina e como facilitador do aparecimento dos efeitos já descritos para dieta hipercalórica, foi de extrema importância. Dentro deste contexto, é importante avaliar se a administração contínua de citrato sustenta a modulação do metabolismo em tratamentos de médio e longo prazo. Para isso, serão utilizados camundongos C57BL/6 machos, alimentados com uma dieta normal ou dieta hiperlipídica suplementados ou não com citrato. Estes camundongos serão mantidos em dieta por médio prazo (12 semanas de dieta) ou por um prazo longo (20 semanas de dieta) em suas respectivas dietas. Serão avaliados parâmetros como: de tolerância à glicose; bioquímicos e imunológicos analisando marcadores de glicólise, gliconeogênese, metabolismo de lipídeos, genes ligados a respostas anti- e pró-inflamatórias, relacionadas com o transporte de citrato e reguladores metabólicos. Além disso é importante a utilização células das linhagens de células hepáticas e adipócitos para a comparação do efeito do citrato no metabolismo *in vivo* e *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMIAN, H.; KAUTZKY-WILLER, A. Sexualität bei Übergewicht und Adipositas. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 166, n. 3–4, p. 121–128, 2016.

AGIUS, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. **Biochemical Journal**, v. 414, n. 1, p. 1–18, 2008.

ALJOHANI, A. M.; SYED, D. N.; NTAMBI, J. M. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 12, p. 831–842, 2017.

ALVAREZ-LLAMAS, G. et al. Characterization of the Human Visceral Adipose Tissue Secretome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 4, p. 589–600, 2007.

ARDESTANI, A. et al. MTORC1 Signaling: A Double-Edged Sword in Diabetic β Cells. **Cell Metabolism**, n. 2017, p. 1–18, 2017.

ASHBROOK, M. J. et al. Citrate modulates lipopolysaccharide-induced monocyte inflammatory responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 180, n. 3, p. 520–530, 2015.

ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. SUPPL.1, 2011.

BEDNARSKI, T. et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 12, p. 2029–2037, 2016.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. The Glycolytic Pathway is Tightly Controlled. In: **Biochemistry 5th edition**. New York: W. H. Freeman: [s.n.].

BISACCIA, F. et al. Kinetic characterization of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. **BBA - Bioenergetics**, v. 1019, n. 3, p. 250–256, 1990.

BISACCIA, F. et al. Reaction mechanism of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. **BBA - Bioenergetics**, v. 1142, n. 1–2, p. 139–145, 1993.

BROWNSEY, R. W. et al. Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase. **Biochemical Society**, v. 22, n. C, p. 143–176, 2006.

CHEN, D. et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction service Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. **Genes Dev.**, v. 22, p. 1753–57, 2008.

CHEN, G. et al. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 31, p. 11245–11250, 2004.

CHEN, M. et al. Increased glucose tolerance and reduced adiposity in the absence of fasting hypoglycemia in mice with liver-specific G α deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3217–3227, 2005.

CHESNEY, J. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, n. 5, p. 535–539, 2006.

CHOUDHARY, C. et al. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 536–550, 2014.

CHRISTIAN, M. et al. Reductive glutamine metabolism by IDH 1 mediates lipogenesis under hypoxia. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 380–384, 2014.

CHUNYUE YIN, KIMBERLEY J. EVASON, K. A. AND D. Y. R. S. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **Journal of hepatology**, v. 51, n. 1, p. 212–223, 2010.

COHEN, P. et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 240–243, 2002.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. May, p. 341–354, 2005.

COSTA ROSA, L. F. et al. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O $_2$ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate d. **The Biochemical journal**, v. 310 (Pt 2, p. 709–14, 1995.

COSTELLO, L. C. et al. The status of citrate in the hydroxyapatite/collagen complex of bone; and its role in bone formation. **Journal of Regenerative Medicine and Tissue Engineering**, v. 3, n. 1, p. 4, 2014.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. Plasma Citrate Homeostasis: How It Is Regulated; And Its Physiological and Clinical Implications. An Important, But Neglected, Relationship in Medicine. **HSOA Journal of Human Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2016.

CUMMINS, T. D. et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 3, p. E262–E277, 2014.

CYBULSKI, N. et al. mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 24, p. 9902–9907, 2009.

DICKENS, F.; DICKENS, B. Y. F. The citric acid content of animal tissues, with

reference to its occurrence in bone and tumour. **The Biochemical journal**, v. 35, n. 8–9, p. 1011–1023, 1941.

DING, R.-B.; BAO, J.; DENG, C.-X. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 7, p. 852–867, 2017.

DRAGOS, S. M. et al. Reduced SCD1 activity alters markers of fatty acid reesterification, glyceroneogenesis, and lipolysis in murine white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 313, n. 3, p. C295–C304, 2017.

ENGIN, A. Human Protein Kinases and Obesity. **Obesity and Lipotoxicity**, v. 960, 2017.

ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Mol. BioSyst.**, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 2015.

EVANS, G.; DE CHALLEMAISON, B.; COX, D. N. Consumers' ratings of the natural and unnatural qualities of foods. **Appetite**, v. 54, n. 3, p. 557–563, 2010.

FAN, C. Y. et al. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24698–24710, 1996.

FLAMEZ, D. et al. Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2018–2024, 2002.

FLIER, J. S. et al. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. **Science**, v. 237, n. 4813, p. 405–408, 1987.

FREZZA, C. Mitochondrial metabolites: Undercover signalling molecules. **Interface Focus**, v. 7, n. 2, p. 0–5, 2017.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: Cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 1, p. R1–R21, 2017.

GIUDETTI, A. M. et al. Nutritional and hormonal regulation of citrate and carnitine/acylcarnitine transporters: Two mitochondrial carriers involved in fatty acid metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

GREEN, M. J. et al. Enzymatic Reduction of Oxysterols Impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 4, p. 221–229, 2005.

HAGIWARA, A. et al. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 725–738, 2012.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes and Development**, v. 25, n. 18, p. 1895–1908, 2011.

HARDIE, D. G. AMPK - Sensing energy while talking to other signaling pathways.

Cell Metabolism, v. 20, n. 6, p. 939–952, 2014.

HARDIE, D. G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 138, p. 20170774, 2018.

HARDIE, D. G.; ASHFORD, M. L. J. AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels. **Physiology**, v. 29, n. 2, p. 99–107, 2014.

HASEEB, A.; MAKKI, M. S.; HAQQL, T. M. Modulation of ten-eleven translocation 1 (TET1), isocitrate dehydrogenase (IDH) expression, α -ketoglutarate (α -KG), and DNA hydroxymethylation levels by interleukin-1 β in primary human chondrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 10, p. 6877–6885, 2014.

HATANO, T. et al. Fission yeast rnh1 gtpase activates tor complex 2 in response to glucose. **Cell Cycle**, v. 14, n. 6, p. 848–856, 2015.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. **New England Journal of Medicine**, 2017.

HILLAR, M.; LOTT, V.; LENNOX, B. Correlation of the effects of citric acid cycle metabolites on succinate oxidation by rat liver mitochondria and submitochondrial particles. **Journal of Bioenergetics**, v. 7, p. 1–16, 1975.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 2002.

HUARD, K. et al. Discovery and characterization of novel inhibitors of the sodium-coupled citrate transporter (NaCT or SLC13A5). **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

HUARD, K. et al. Optimization of a Dicarboxylic Series for in Vivo Inhibition of Citrate Transport by the Solute Carrier 13 (SLC13) Family. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 1165–1175, 2016.

IACOBAZZI, V.; INFANTINO, V. Citrate-new functions for an old metabolite. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 387–399, 2014.

INFANTINO, V. et al. ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 1, p. 105–111, 2013.

INFANTINO, V. et al. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 11, p. 1217–1225, 2014.

INOUE, H. et al. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 267–275, 2006.

KAPLAN, R. S. et al. Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 22, p. 13379–13385, 1990.

KEMPER, J. K.; CHOI, S.; KIM, D. H. Sirtuin 1 Deacetylase: A Key Regulator of Hepatic Lipid Metabolism. **Vitam Horm**, v. 91, p. 385–404, 2013.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 11, p. 1489–1498, 1999.

KLEINERT, M. et al. mTORC2 and AMPK differentially regulate muscle triglyceride content via Perilipin 3. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 646–655, 2016.

KOVES, T. R. et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 45–56, 2008.

KUMAR, A. et al. Fat Cell-Specific Ablation of Rictor in Mice Impairs Insulin-Regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. **Diabetes**, v. 59, n. June, p. 1397–1406, 2010.

LABONTE, A. C.; TOSELLO-TRAMPONT, A.-C.; HAHN, Y. S. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. **Molecules and Cells**, v. 37, n. 4, p. 275–285, 2014.

LAMMING, D. W. et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. **Science**, v. 335, n. 6076, p. 1638–1643, 2012.

LAVIGNE, C. et al. Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 281, n. 1, p. E62–E71, 2001.

LEANDRO, J. G. B. et al. Exogenous citrate impairs glucose tolerance and promotes visceral adipose tissue inflammation in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 6, p. 967–973, 2016.

LEE, P. L.; JUNG, S. M.; GUERTIN, D. A. The Complex Roles of Mechanistic Target of Rapamycin in Adipocytes and Beyond. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 319–339, 2017.

LEE, J. V.; SHAH, S. A.; WELLEN, K. E. Obesity, cancer and acetyl-CoA metabolism. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 10, n. 1–2, p. 1–13, 2013.

LENGYEL, E. et al. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 5, p. 374–384, 2018.

LEONE, T. C.; WEINHEIMER, C. J.; KELLY, D. P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 13, p. 7473–8, 1999.

LERIN, C. et al. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 429–438, 2006.

LI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3441–3446, 2010.

LI, Y. et al. AMPK Phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin resistant mice. **Cell metabolism**, v. 13, n. 4, p. 376–388, 2011.

LIN, H. V.; ACCILI, D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 9–19, 2011.

LIPSKI, E. Traditional non-Western diets. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, n. 6, p. 585–593, 2010.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

MARTINEZ, K. B.; LEONE, V.; CHANG, E. B. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 130–142, 2017.

MASUI, K. et al. Glucose-dependent acetylation of Rictor promotes targeted cancer therapy resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 30, p. 9406–9411, 2015.

MATSUZAKA, T. et al. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2199–2208, 2012.

MEDSKER, B. et al. Structure based identification of inhibitors for the SLC13 family of Na⁺/dicarboxylate cotransporters. **Biochemistry**, v. 70, n. 12, p. 773–779, 2016.

MENDEZ, M. A.; MONTEIRO, C. A.; POPKIN, B. M. Overweight exceeds underweight among women in most developing countries. **The American Society for Clinical Nutrition**, v. 2005, n. 81, p. 714–721, 2009.

MIYAZAKI, M. et al. Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 484–496, 2007.

MONICE M. FIUME, BART A. HELDRETH, WILMA F. BERGFELD, DONALD V. BELSITO, RONALD A. HILL, CURTIS D. KLAASSEN, DANIEL C. LIEBLER, JAMES G. MARKS JR, RONALD C. SHANK, THOMAS J. SLAGA, P. W. S. AND F. A. A. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, p. 165–465, 2014.

MOYER, B. J. et al. Obesity and fatty liver are prevented by inhibition of the aryl hydrocarbon receptor in both female and male mice. **Nutrition Research**, v. 44, p. 38–50, 2017.

MYCIELSKA, M. E. et al. Extracellular citrate affects critical elements of cancer cell metabolism and supports cancer development in vivo. **Cancer research**, p. canres.2959.2017, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. In: New York: W. H. Freeman: [s.n.].

NEWSHOLME, P. Glutamine Metabolism : Nutritional and Clinical Significance Why Is L -Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health , Postinjury , Surgery or Infection ? 1 , 2. **American Society for Nutritional Sciences**, n. May, p. 2515–2522, 2001.

NEYRINCK, A. M. et al. Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with bifidogenic properties abolishes metabolic disorders induced by western diet in mice. **Nutrition and Diabetes**, v. 8, n. 1, 2018.

O'NEILL, L. A. J.; GRAHAME HARDIE, D. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 346–355, 2013.

PAJOR, A. M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 451, n. 5, p. 597–605, 2007.

PAJOR, A. M. Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 466, n. 1, 2014.

PALMIERI, E. M. et al. Acetylation of human mitochondrial citrate carrier modulates mitochondrial citrate/malate exchange activity to sustain NADPH production during macrophage activation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1847, n. 8, 2015.

PALMIERI, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 689–709, 2004.

PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Mitochondrial metabolite transport. **Essays In Biochemistry**, v. 47, p. 37–52, 2010.

PAULA NETO, H. A. et al. Effects of food additives on immune cells as contributors to body weight gain and immune-mediated metabolic dysregulation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–11, 2017.

PAUMEN, M. B. et al. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3324–3329, 1997.

PIETROCOLA, F. et al. Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second

messenger. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 6, 2015.

POLOZ, Y.; STAMBOLIC, V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. **Cell death & disease**, v. 6, n. 12, p. e2037, 2015.

PONUGOTI, B. et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33959–33970, 2010.

POOLSRI, W.-A. et al. Combination of Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporter Inhibitors Inhibits De Novo Lipogenesis Pathway and Triggers Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutr Rev**, v. 70, n. 1, p. 3–21, 2013.

PURUSHOTHAM, A. et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT 1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. **Cell Metabolism**, v. 40, n. 6, p. 1301–1315, 2009.

RAIMUNDO, N.; BAYSAL, B. E.; SHADEL, G. S. Revisiting the TCA cycle: Signaling to tumor formation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 11, p. 641–649, 2011.

RAMADOSS, P. et al. STAT3 Targets the Regulatory Regions of Gluconeogenic Genes *in Vivo*. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 6, p. 827–837, 2009.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. **American Journal Of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, p. G852–G858, 2006.

REPA, J. J. et al. Regulation of mouse sterol regulatory by oxysterol receptors , LXR a and LXR b. **Genes & Development**, p. 2819–2830, 2000.

REPOUSI, N. et al. Depression and metabolic syndrome in the older population: a review of evidence. **Journal of Affective Disorders**, 2018.

RHODES, C. J. et al. Direct autocrine action of insulin on β -cells: Does it make physiological sense? **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2157–2163, 2013.

RODGERS, J. T. et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1a and SIRT1. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 113–118, 2005.

ROGERS, R. P.; ROGINA, B. The role of INDY in metabolism, health and longevity. **Frontiers in genetics**, v. 6, n. June, p. 204, 2015.

ROGINA, B. INDY—A New Link to Metabolic Regulation in Animals and Humans. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. May, p. 4–10, 2017.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Compr Physiol**, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.

SALMINEN, A. et al. Impaired mitochondrial energy metabolism in Alzheimer's

disease: Impact on pathogenesis via disturbed epigenetic regulation of chromatin landscape. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 1–20, 2015.

SATO, M. et al. Improving type 2 diabetes through a distinct adrenergic signaling pathway involving mTORC2 that mediates glucose uptake in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 4115–4129, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHULTZ, J. R. et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. **Genes and Development**, v. 14, n. 22, p. 2831–2838, 2000.

SEVILLA-GONZÁLEZ, M. DEL R.; QUINTANA-MENDOZA, B. M.; AGUILAR-SALINAS, C. A. Interaction Between Depression, Obesity, and Type 2 Diabetes: A Complex Picture. **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 7, p. 582–591, 2017.

SIITERI, K. Adipose tissue as a source of hormones. **Am J Clin Nutr**, n. May, 1987.

STRABLE, M. S.; NTAMBI, J. M. Genetic control of de novo lipogenesis: Role in diet-induced obesity. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 3, p. 199–214, 2010.

TAKIISHI, T. et al. Vitamin D and diabetes. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 179–206, 2012.

TANG, Y. et al. Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. **Nature Communications**, v. 48, n. 7, p. 829–834, 2016.

TAYLOR, W. M.; HALPERIN, M. L. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase in Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 17, p. 6060–6083, 1973.

TUO, Y.; XIANG, M. mTOR: A double-edged sword for diabetes. **Journal of Leukocyte Biology**, n. September 2017, p. 1–11, 2018.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Citric acid, Citrates.**

VEGA, R. B.; HUSS, J. M.; KELLY, D. P. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1868–1876, 2000.

VIOLANTE, S. et al. Substrate specificity of human carnitine acetyltransferase: Implications for fatty acid and branched-chain amino acid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 6, p. 773–779, 2013.

WALKER, A. K.; NÄÄR, A. M. SREBPs: regulators of cholesterol/lipids as therapeutic targets in metabolic disorders, cancers and viral diseases. **Clinical Lipidology**, v. 7, n. 1, p. 27–36, 2012.

WEINERT, B. T. et al. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Systems Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2014.

WHO. **Obesity and Overweight**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 28 maio. 2018.

WILLMES, D. M. et al. The longevity gene INDY (I'm Not Dead Yet) in metabolic control: Potential as pharmacological target. **Pharmacology and Therapeutics**, n. xxxx, p. 0–1, 2017.

WILLMES, D. M.; BIRKENFELD, A. L. The Role of INDY in Metabolic Regulation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2013.

WILLMES, D. M.; HELFAND, S. L.; BIRKENFELD, A. L. The longevity transporter mIndy (Slc13a5) as a target for treating hepatic steatosis and insulin resistance. **Aging**, v. 8, n. 2, p. 208–209, 2016.

WONG, R. H. F. et al. A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1056–1072, 2009.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847–1856, 2009.

XU, T. L.; SEYFERT, H. M.; SHEN, X. Z. Epigenetic mechanisms contribute to decrease stearoyl-CoA desaturase 1 expression in the liver of dairy cows after prolonged feeding of high-concentrate diet. **Journal of Dairy Science**, v. 6, p. 1–13, 2017.

XU, Y. et al. High-yield bacterial expression, purification, and functional reconstitution of the tricarboxylate transport protein from rat liver mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 207, p. 783–789, 1995.

YALCIN, A. et al. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 36, p. 24223–24232, 2009.

YANG, C. et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. **Journal of Molecular Biology**, v. 56, n. 3, p. 414–424, 2015.

YOSHIKAWA, K.; SAITO, S.; SAKURAGAWA, A. Simultaneous analysis of acidulants and preservatives in food samples by using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1385–1390, 2011.

YUAN, M. et al. Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29579–29588, 2012.

YUAN, T. et al. mTORC2 Signaling: A Path for Pancreatic β Cell's Growth and Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 7, p. 904–918, 2018.

ZAIDI, N.; SWINNEN, J. V.; SMANS, K. ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. **Cancer Research**, v. 72, n. 15, p. 3709–3714, 2012.

ZANCAN, P. et al. ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure. **IUBMB Life**, v. 60, n. 8, p. 526–533, 2008.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 1994.

ZHAO, L.-F. et al. Liver X Receptor α Is Involved in the Transcriptional Regulation of the 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase Gene. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 1062–1071, 2012.

9 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 01 de novembro de 2016

Prezado Professor Mauro Sola-Penna

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Avaliação Metabólica, Biométrica e Inflamatória de Camundongos Suplementados com Aditivos Alimentares.”, protocolo nº 090/16**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **18/10/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 31/03/2019
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i>/C57BL/6
Nº de animais	96 animais
Peso/idade	15g / 4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia Bloco B, subsolo - CCS /UFRJ

Atenciosamente;



Prof. Marcel Frajblat

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar

Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil

Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br