

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DO EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS* SOBRE O  
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AOS  
MODELOS DE DIABETES TIPO I E SÍNDROME METABÓLICA**

**MAIZA CRISTINA VON DENTZ**

Porto Alegre

2023

MAIZA CRISTINA VON DENTZ

**EFEITOS DO EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS* SOBRE O  
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AOS  
MODELOS DE DIABETES TIPO I E SÍNDROME METABÓLICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

Co-orientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

Porto Alegre

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski e Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn, não apenas pelas contribuições para o desenvolvimento deste projeto como também pela disponibilidade e acessibilidade mesmo diante das adversidades.

Agradeço à professora Dra. Marli Camassola e ao professor Dr. Eliseu Rodrigues pela colaboração e disponibilização dos seus espaços para a realização dos experimentos deste estudo.

Aos colegas, a técnica e professores do LaMEC, agradeço pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pelas discussões acerca dos dados que surgiam, mas também pela companhia ao longo destes anos.

Agradeço à professora Dra. Miriam Salvador e ao professor Dr. Paulo Ivo Bittencourt, que se dispuseram a revisar e discutir os dados experimentais e contribuir com seu conhecimento na área.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela formação e suporte financeiro, tornando possível este trabalho.

Aos familiares e amigos que compreenderam a minha ausência em inúmeras situações ao longo desse processo.

Ao Éverton Vogt, meu companheiro de vida e de trabalho, pelo carinho, apoio e dedicação aos meus projetos.

Aos meus pais. Pelo suporte emocional que deram ao longo de toda a minha vida e a educação que me proporcionaram. Vocês são a base de todas as minhas conquistas. Obrigada.

## RESUMO

No contexto global atual, enfermidades como obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus alcançaram proporções epidêmicas. Essas condições estão intrinsecamente ligadas à resistência insulínica e ao desequilíbrio no metabolismo lipídico e glicídico, perturbando processos homeostáticos. A síndrome metabólica está associada a manifestações de resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e expansão do tecido adiposo. A hipertrofia adiposa desencadeia inflamação crônica de baixo grau, promovendo resistência insulínica através de citocinas que inibem vias de sinalização insulínica. Além disso, o aumento de ácidos graxos circulantes pela hipertrofia adiposa potencializa a ativação de células imunes, causando lipotoxicidade e apoptose das células beta pancreáticas. Ademais, em indivíduos obesos, modificações na microbiota causam aumento da permeabilidade intestinal, causando infiltração de lipopolissacarídeos que aumentam o quadro de inflamação e resistência insulínica. Entretanto, moléculas bioativas de vegetais e fungos, incluindo o *Pycnoporus sanguineus*, apresentam potencial farmacológico contra todas estas condições, embora seus mecanismos de ação ainda não tenham sido relatados. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar como o extrato de *P. sanguineus* exerce efeitos hipolipídicos em ratos com síndrome metabólica ou diabetes. A pesquisa envolveu a avaliação do perfil lipídico, expressão de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , e capacidade de oxidação de substratos. Além disso, foi realizada uma revisão narrativa de estudos sobre o impacto de cogumelos e seus compostos no metabolismo lipídico. No artigo "*Mushrooms and Their Compounds in the Modulation of Lipid Metabolism: A Comprehensive Review of Recent Findings*" foi realizada uma revisão abrangente discutindo estudos publicados nos últimos cinco anos que associaram cogumelos e seus compostos a alterações no metabolismo lipídico. Trinta e sete espécies foram mencionadas, influenciando metabolismo intermediário de ácidos graxos e do colesterol, inflamação, estresse oxidativo e microbiota. Foram listados potenciais terapêuticos como melhora do perfil lipídico, da obesidade e da esteatose. Já no artigo "*Treatment with the mushroom Pycnoporus sanguineus extract increases progression of Metabolic Syndrome effects in Wistar rats*", a administração de *P. sanguineus* em ratos com síndrome metabólica aumentou trigliceridemia, insulinemia e HOMA-IR. Houve diminuição da glicogênese, conteúdo de glicogênio e

oxidação de ácidos graxos no fígado, bem como aumento da lipólise. Estes resultados indicam um potencial modelo de resistência insulínica. Além dos artigos mencionados, dados não publicados revelaram que o tratamento com *P. sanguineus* no diabetes não impactou parâmetros morfométricos ou séricos. Afora isso, o tratamento diminuiu a oxidação hepática de glicose e ácidos graxos. O extrato de *P. sanguineus* não apresentou efeitos positivos no metabolismo lipídico de ratos com diabetes, acelerando, na verdade, a progressão da síndrome metabólica. Este trabalho sugere a necessidade de identificar as ações específicas das moléculas do extrato e explorar vias de administração alternativas à oral.

## ABSTRACT

In the current global context, diseases such as obesity, metabolic syndrome, and diabetes mellitus have reached epidemic proportions. These conditions are intrinsically linked to insulin resistance and lipid metabolism imbalance, disrupting homeostatic processes. Metabolic syndrome is associated with insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, and adipose tissue expansion. Adipose hypertrophy triggers low-grade chronic inflammation, leading to insulin resistance via cytokine-mediated inhibition of insulin signaling pathways. Adipose hypertrophy increases circulating fatty acids, enhancing immune cell activation and leading to lipotoxicity and pancreatic beta-cell apoptosis. Additionally, in obese individuals, changes in the microbiota cause increased intestinal permeability, leading to infiltration of lipopolysaccharides that worsen inflammation and insulin resistance. Bioactive molecules from plants and fungi, including *Pycnoporus sanguineus*, show pharmacological potential against all these conditions, although their mechanisms of action have yet to be reported. In this study, we aimed to investigate how the extract of *P. sanguineus* exerts hypolipidemic effects in rats with metabolic syndrome or diabetes. The research involved the evaluation of the lipid profile, expression of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , and substrate oxidation capacity. A narrative review of studies on the impact of mushrooms and their compounds on lipid metabolism was also conducted. In the article "Mushrooms and Their Compounds in the Modulation of Lipid Metabolism: A Comprehensive Review of Recent Findings," a comprehensive review discussed studies published in the last five years that associated mushrooms and their compounds with changes in lipid metabolism. Thirty-seven species were mentioned, influencing the intermediary metabolism of fatty acids and cholesterol, inflammation, oxidative stress, and microbiota. Potential therapeutic effects such as improvement of lipid profile, obesity, and steatosis were listed. In the article "Treatment with the mushroom *Pycnoporus sanguineus* extract increases the progression of Metabolic Syndrome effects in Wistar rats," administration of *P. sanguineus* in rats with metabolic syndrome increased triglyceridemia, insulinemia and HOMA-IR. There was a decrease in glycogenesis, glycogen content, and fatty acid oxidation in the liver, as well as an increase in lipolysis. These results indicate a potential model of insulin resistance. In addition to the mentioned articles, unpublished data revealed that treatment with *P.*

*sanguineus* in diabetes did not impact morphometric or serum parameters. Moreover, the treatment reduced hepatic glucose and fatty acid oxidation. The *P. sanguineus* extract did not positively affect the lipid metabolism of diabetic rats but rather accelerated the progression of metabolic syndrome. This study highlights the need to identify the extract's molecules' specific actions and explore alternative administration routes beyond oral intake.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Efeitos dos fatores inflamatórios sobre a sinalização insulínica. (Adaptado de Luca e Olefsky, 2008). .....	17
<b>Figura 2</b> Mudança da polarização do fenótipo M1/M2 em indivíduos obesos. ATMs: adipose tissue macrophages. (Fonte: Fujisaka, 2020) .....	19
<b>Figura 3</b> Relação entre dieta, microbiota e doenças associadas a obesidade. (Fonte: Cox, West e Cripps, 2015). .....	23
<b>Figura 4</b> Mudanças nas concentrações séricas de insulina em jejum e no estado alimentado em indivíduos magros, obesos, insulino-resistentes e diabéticos tipo II e sua relação com a célula beta-pancreática. (Fonte: Hudish, Reusch e Sussel, 2019). .....	25
<b>Figura 5</b> Interação entre adipócitos, inflamação e resistência à insulina. (Fonte: Cusi, 2010).....	27
<b>Figura 6</b> Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais saudáveis e síndrome metabólica.. .....	42
<b>Figura 7</b> Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, tecido adiposo retroperitoneal e soro) com as respectivas análises realizadas nos animais saudáveis e portadores de síndrome metabólica. ....	43
<b>Figura 8</b> Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais saudáveis e diabéticos.....	44
<b>Figura 9</b> Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, tecido adiposo retroperitoneal e soro) com as respectivas análises realizadas nos animais saudáveis e diabéticos.....	45
<b>Figura 10</b> Efeitos da diabetes e do extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre o metabolismo de carboidratos no fígado.. .....	89
<b>Figura 11</b> Efeitos da diabetes e do extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre o metabolismo de lipídeos no fígado.....	90
<b>Figura 12</b> Efeitos da diabetes e do extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a expressão gênica de PPARs. ....	91
<b>Figura 13</b> Efeitos da síndrome metabólica e do extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a expressão gênica de PPARs.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABCG5:** *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5*

**ABCG8:** *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 8*

**ACC:** *Acetyl-CoA Carboxylase*

**ACOX:** *Acyl-CoA Oxidase*

**ADP:** Adenosina Difosfato

**AKT:** *Protein Kinase B*

**ALT:** *Alanine Aminotransferase*

**AMPK:** *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*

**AP-1:** *Activating Protein 1*

**AST:** *Aspartate Aminotransferase*

**ATGL:** *Adipose Triglyceride Lipase*

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**CD36:** *Cluster of Differentiation 36*

**cDNA:** *Complementary Deoxyribonucleic Acid*

**CPT1:** *Carnitine Palmitoyltransferase 1*

**DAG:** Diacilglicerol

**DM2:** Diabetes Melito tipo 2

**FAS:** *Fatty Acid Synthase*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FosJun:** família de proteínas que inclui c-Fos, antígenos relacionados ao Fos, c-Jun, JunB e JunD

**GLP-1:** *Glucagon-Like Peptide 1*

**GLUT4:** *Glucose Transporter 4*

**GPR41:** *Orphan G Protein-Coupled Receptor 41*

**GPR43:** *Orphan G Protein-Coupled Receptor 43*

**HDLc:** *High Density Lipoprotein*

**HMG-CoA redutase:** *3-Hidroxi-3-Methyl-Glutaril-CoA reductase*

**HOMA-IR:** *Homeostasis Model of Assessment of Insulin Resistance*

**HPLC-MS:** *High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

**HSL:** *Hormone-Sensitive Lipase*

**IKK-β:** *I Kappa B Kinase beta*

**IL-1β:** *Interleucina 1 beta*

**IL-4:** *Interleucina 4*

**IL-6:** *Interleucina 6*

**IL-10:** *Interleucina 10*

**IMC:** *Índice de Massa Corporal*

**IRS:** *Insulin Receptor Substrate*

**JNK:** *c-Jun N-terminal Kinase*

**LDLc:** *Low Density Lipoprotein*

**LDLr:** *Low Density Lipoprotein Receptor*

**LPL:** *Lipoprotein Lipase*

**LPS:** *Lipopolissacarídeos*

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MCP-1:** *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

**MetS:** *Metabolic Syndrome*

**mRNA:** *Messenger Ribonucleic Acid*

**NFκB:** *Nuclear Factor of Kappa-Light-Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells*

**NLRP3:** *NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3*

**NPC1L1:** *Niemann-Pick C1 Like 1*

**PCSK9:** *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*

**PI3K:** *Phosphoinositide 3-Kinase*

**PKC:** *Protein Kinase C*

**PP2A:** *Protein Phosphatase 2A*

**PPARα:** *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*

**PPAR $\gamma$** : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

**RI**: Resistência Insulínica

**SCD1**: *Stearoyl-CoA Desaturase 1*

**SM**: Síndrome Metabólica

**SOCS**: *Supressor of Cytokine Signaling*

**SREBP1**: *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*

**STZ**: Estreptozotocina

**TLR4**: *Toll Like Receptor 4*

**TNF $\alpha$** : *Tumor Necrosis Factor alpha*

**VAT**: *Visceral Adipose Tissue*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Doenças associadas ao metabolismo intermediário: obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Desenvolvimento de resistência à insulina mediada por fatores inflamatórios .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Estabelecimento da inflamação crônica de baixo grau na obesidade.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Mudança do fenótipo do tecido adiposo branco na obesidade.....	18
1.3.2 Papel dos ácidos graxos livres e seus metabólitos na inflamação .....	19
1.3.3 Obesidade, disbiose e inflamação .....	21
<b>1.4 Progressão da resistência à insulina e desequilíbrios no metabolismo lipídico.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Redução dos lipídeos séricos como meta terapêutica no controle da síndrome metabólica e do diabetes tipo II.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Uso de produtos naturais no controle lipídico .....</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Potencial terapêutico de <i>Pycnoporus sanguineus</i> e suas aplicações na área da Saúde .....</b>	<b>31</b>
<b>2 HIPÓTESE E OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Hipótese.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Objetivo geral da revisão narrativa.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Objetivos específicos da revisão narrativa.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Objetivo geral do estudo experimental .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 Objetivos específicos do estudo experimental.....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Aspectos éticos, local e exequibilidade.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Seleção dos estudos científicos para elaboração de uma revisão narrativa .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Obtenção e análise do extrato .....</b>	<b>39</b>

3.3.1 Cultivo do cogumelo .....	39
3.3.2 Produção do extrato .....	40
3.3.3 Análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS).....	40
<b>3.4 Animais.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Avaliação dos efeitos do extrato de <i>Pycnoporus sanguineus</i> sobre o metabolismo intermediário de ratos Wistar portadores de Síndrome Metabólica .....</b>	<b>41</b>
3.5.1 Indução da Síndrome Metabólica (MetS).....	41
3.5.2 Administração do extrato e desenho experimental.....	41
3.5.3 Processamento dos tecidos.....	42
<b>3.6 Avaliação dos efeitos do extrato de <i>Pycnoporus sanguineus</i> sobre o metabolismo intermediário de ratos Wistar portadores de Diabetes induzido por estreptozotocina .....</b>	<b>43</b>
3.6.1 Indução do Diabetes.....	43
3.6.2 Administração do extrato e desenho experimental.....	43
3.6.3 Processamento dos tecidos.....	44
<b>3.7 Descrição das técnicas realizadas .....</b>	<b>45</b>
3.7.1 Parâmetros séricos.....	45
3.7.2 Cálculo do índice de avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR).....	45
3.7.3 Conteúdo de glicogênio e triglicerídeos hepáticos .....	46
3.7.4 Lipólise .....	46
3.7.5 Glicogênese.....	46
3.7.6 Oxidação de substratos .....	47
3.7.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	48
<b>3.8 Análise estatística.....</b>	<b>48</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>

<b>4.1 Artigo 1</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2 Artigo 2</b> .....	<b>64</b>
<b>4.3 Dados complementares – não publicados</b> .....	<b>87</b>
4.3.1 <i>Parâmetros morfométricos e séricos de ratos diabéticos submetidos ao tratamento com P. sanguineus</i> .....	87
4.3.2 <i>Metabolismo de carboidratos em ratos diabéticos submetidos ao tratamento com P. sanguineus</i> .....	89
4.3.3 <i>Metabolismo de lipídeos em ratos diabéticos submetidos ao tratamento com P. sanguineus</i> .....	90
4.3.4 <i>Expressão gênica de PPAR<math>\alpha</math> e PPAR<math>\gamma</math> em ratos diabéticos submetidos ao tratamento com P. sanguineus</i> .....	91
4.3.5 <i>Expressão gênica de PPAR<math>\alpha</math> e PPAR<math>\gamma</math> em ratos portadores de síndrome metabólica submetidos ao tratamento com P. sanguineus</i> .....	92
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>93</b>
<b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>97</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>114</b>
<b>ANEXO II</b> .....	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças associadas ao metabolismo intermediário: obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus

No cenário global atual, as doenças do metabolismo intermediário representam uma crescente preocupação de saúde pública. Condições como obesidade, síndrome metabólica (SM) e diabetes mellitus têm alcançado proporções epidêmicas, colocando um fardo significativo nos sistemas de saúde e impactando negativamente na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo (Bahia *et al.*, 2012; Saklayen, 2018; IDF, 2021). Essas doenças complexas estão intrinsecamente ligadas à resistência insulínica (RI) e ao desequilíbrio no metabolismo lipídico, afetando processos biológicos fundamentais que regulam a homeostase do corpo humano (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Yazıcı and Sezer, 2017).

A relação entre essas três patologias pode ser estabelecida como três fases de progressão do desequilíbrio metabólico, onde a obesidade é a primeira fase e o diabetes, a última. Para entender essa progressão, basta verificar os critérios de diagnóstico para cada uma dessas doenças. Enquanto a obesidade é diagnosticada simplesmente com base no índice de massa corporal ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ), o diabetes exige a avaliação laboratorial da glicemia de jejum e estabelece a presença da doença quando as concentrações séricas são  $\geq 126 \text{ mg/dL}$ , caracterizando hiperglicemia crônica (Wharton *et al.*, 2020; Cobas *et al.*, 2022).

Por outro lado, a SM é um conjunto de fatores de risco cardiovascular e é diagnosticada quando há obrigatoriamente aumento da circunferência abdominal ( $> 88 \text{ cm}$  para mulheres e  $> 102 \text{ cm}$  para homens) associada a pelo menos dois dos seguintes fatores: triglicérides séricos  $\geq 150 \text{ mg/dL}$ , HDLc (do inglês *High Density Lipoprotein*)  $< 40 \text{ mg/dL}$  em mulheres e  $< 50 \text{ mg/dL}$  em homens, glicemia de jejum  $\geq 100 \text{ mg/dL}$  ou pressão arterial  $\geq 130/85 \text{ mm/Hg}$  (NCEP, 2001; IDF, 2006). Além dos critérios estabelecidos internacionalmente para o diagnóstico, é comum associar a presença de SM a manifestações de RI, hiperinsulinemia compensatória, dislipidemia, microalbuminúria e aumento de proteína C-reativa (Alberti, Zimmet and Shaw, 2006; Bovolini *et al.*, 2021).

A partir dos dados de diagnóstico, é possível identificar a SM como uma soma de fatores que tem seu desenvolvimento a partir do acúmulo de tecido adiposo, principalmente abdominal, que se não tratada tem como desfecho o desenvolvimento

de diabetes. De maneira simplificada, entende-se que a origem do diabetes tipo II (DM2) pode ocorrer a partir de modificações no tecido adiposo e a SM é a fase intermediária entre obesidade e diabetes. A relação entre obesidade e diabetes é tão intrínseca que o termo “diabesidade” foi cunhado nos anos 2000 e tem se tornado cada vez mais presente, destacando a relação entre os desequilíbrios no metabolismo de lipídeos e o desenvolvimento de RI (Astrup and Finer, 2000; Pappachan, Fernandez and Chacko, 2019; Michaelidou, Pappachan and Jeeyavudeen, 2023).

Embora a SM seja o meio termo entre obesidade e diabetes, isso não a exime de estar associada a taxas de morbidade e mortalidade elevadas. Estima-se que a SM aumente em cinco vezes o risco de desenvolvimento de DM2 e em três vezes o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Isomaa *et al.*, 2001; IDF, 2006). Além disso, portadores desta síndrome apresentam risco duas a quatro vezes maior de acidente vascular cerebral e duas a três vezes de infarto agudo do miocárdio, além de uma probabilidade duas vezes maior de morrer desses eventos em comparação a indivíduos sem a doença (Kaur and Jaspinder, 2014).

A fisiopatologia da SM ainda não é totalmente compreendida, mas é bem estabelecido que a RI está profundamente envolvida no aparecimento dos diferentes componentes da doença, provavelmente desencadeando-os (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; O'Neill and O'Driscoll, 2015). O consenso atual é de que o aumento dos ácidos graxos livres circulantes e a hipertrofia do tecido adiposo são responsáveis por manter uma inflamação crônica de baixo grau que, em última instância, desencadeia a resistência à insulina (de Luca and Olefsky, 2008; Saltiel and Olefsky, 2017).

## **1.2 Desenvolvimento de resistência à insulina mediada por fatores inflamatórios**

A insulina é um hormônio proteico secretado pelo pâncreas, responsável pela homeostase da glicose no estado alimentado e pelo crescimento celular. Seus efeitos metabólicos são associados principalmente aos tecidos hepático, muscular e adiposo, onde atua promovendo a captação de glicose, inibindo a gliconeogênese, a glicogenólise e a lipólise e estimulando a síntese de glicogênio, triglicerídeos e proteínas (Sims *et al.*, 2021).

Sua comunicação com os tecidos ocorre por meio de receptores de membrana do tipo tirosina quinase. Esses receptores possuem um domínio externo, onde ocorre

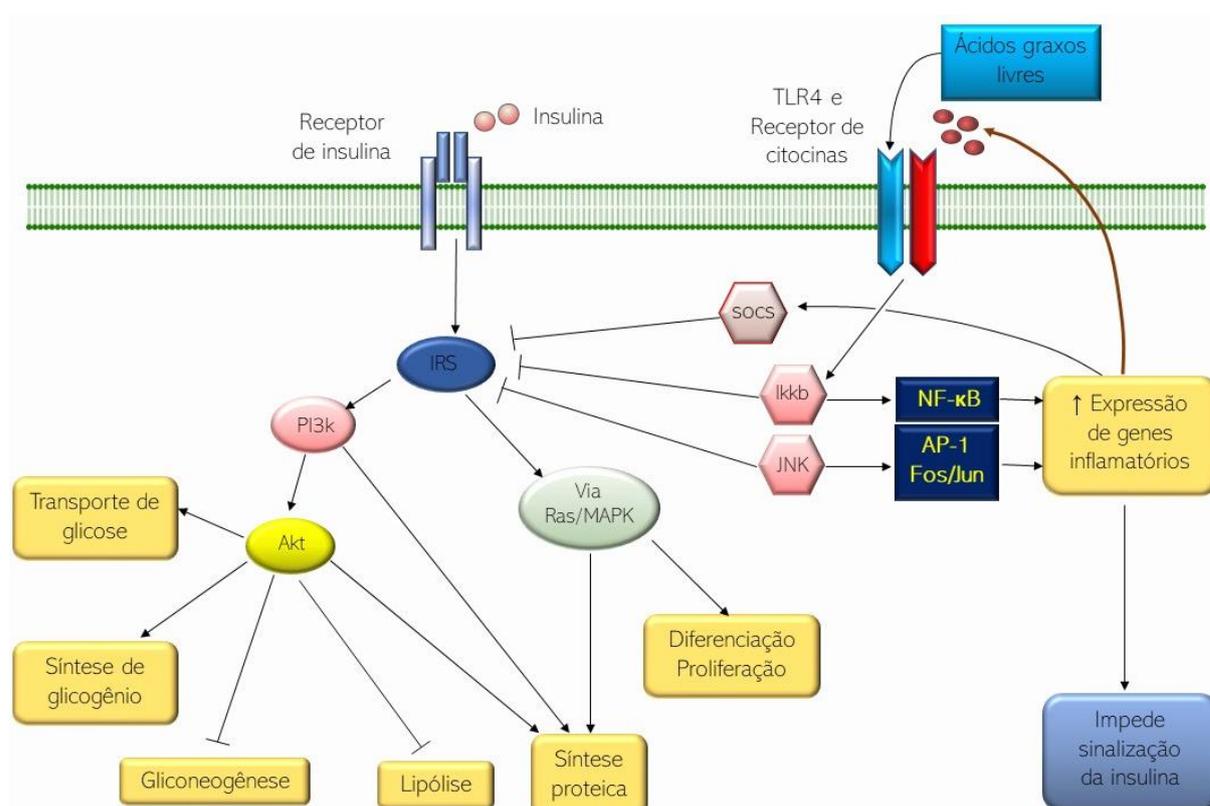
a ligação da insulina, e um domínio interno com atividade tirosina quinase. A ligação da insulina aos seus receptores promove a fosforilação de resíduos de tirosina dos IRS (do inglês *Insulin Receptor Substrate*) (White, 2002). A fosforilação de um resíduo de tirosina do IRS promove uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação de vias metabólicas e de crescimento celular. O IRS está relacionado a duas vias principais: a da PI3K/AKT (do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B*), responsável pela maior parte das ações metabólicas do hormônio, e a da MAPK (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*), relacionada aos efeitos de crescimento e proliferação celular. Prejuízos em um dos componentes da cascata de sinalização deflagram diminuição da atividade de AKT e diminuição da sensibilidade à insulina (White, 2002; Taniguchi, Emanuelli and Kahn, 2006).

Estudos epidemiológicos indicam uma forte correlação entre o desenvolvimento de RI e o aumento de fatores pró-inflamatórios como TNF $\alpha$  (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*), IL-6 (Interleucina 6) e IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 beta) (Strackowski *et al.*, 2002; Kowalska *et al.*, 2008; Ruscitti *et al.*, 2019). A ligação de TNF $\alpha$  aos seus receptores resulta na estimulação da via pró-inflamatória IKK- $\beta$ /NF $\kappa$ B (do inglês *I Kappa B Kinase beta/Nuclear Factor of Kappa-Light-Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells*). De fato, estudos mostraram que camundongos geneticamente modificados para não expressarem TNF $\alpha$  não desenvolveram RI mediante a oferta de dieta rica em gorduras e obesidade (Uysal *et al.*, 1997; Bouter *et al.*, 2010).

A IL-6 é uma citocina secretada principalmente pelo tecido adiposo e atua promovendo a ativação de SOCS (do inglês *Supressor of Cytokine Signaling*), um fator que impede a fosforilação de IRS, inibindo a sinalização insulínica (Kim, Bachmann and Chen, 2009). Já a síntese de IL-1 $\beta$  está relacionada à ativação da via das caspases por NLRP3 (do inglês *NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3*), e atua promovendo disfunção e apoptose das células  $\beta$  pancreáticas, prejudicando a produção e secreção de insulina (Wen *et al.*, 2011).

A ativação de vias pró-inflamatórias culmina na produção de fatores capazes de prejudicar a via PI3K/AKT. No processo inflamatório, macrófagos e adipócitos secretam TNF $\alpha$  e interleucinas que promovem a ativação de serina quinases como JNK (do inglês *c-Jun N-terminal Kinase*) e IKK- $\beta$  (Olefsky and Glass, 2010). Essas proteínas atuam fosforilando o IRS em um resíduo de serina ao invés de tirosina, inativando o substrato e prejudicando a cascata de sinalização intracelular da insulina.

Além disso, essas proteínas também ativam os fatores de transcrição AP-1/FosJun (do inglês *Activating Protein 1*/família de proteínas que inclui c-Fos, antígenos relacionados ao Fos, c-Jun, JunB e JunD) e NFκB que, por sua vez, promovem a transcrição de genes relacionados a outras proteínas pró-inflamatórias (Hotamisligil, 2006; de Luca and Olefsky, 2008). Dessa maneira, fica clara a relação entre inflamação e resistência à insulina, e o resumo dos eventos mencionados é apresentado na figura 1. Cabe agora discutir de que maneira a obesidade promove o aumento dos fatores pró-inflamatórios no organismo.



**Figura 1 Efeitos dos fatores inflamatórios sobre a sinalização insulínica.** Citocinas pró-inflamatórias estimulam a atividade de SOCS, IKK-β e JNK, prejudicando a sinalização da insulina. Esses fatores também estimulam vias que controlam a expressão de genes pró-inflamatórios. IRS: *insulin receptor substrate*. PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*. AKT: *protein kinase B*. MAPK: *mitogen-activated protein kinase*. TLR4: *toll-like receptors 4*. SOCS: *suppressor of cytokine signaling*. IKK-β: *I kappa B kinase beta*. JNK: *C-jun N-terminal kinase*. NFκB: *nuclear factor of kappa-light-polypeptide gene enhancer in b-Cells*. AP-1 Fos/Jun: *Activating Protein 1 transcription factor subunit*. (Adaptado de Luca e Olefsky, 2008).

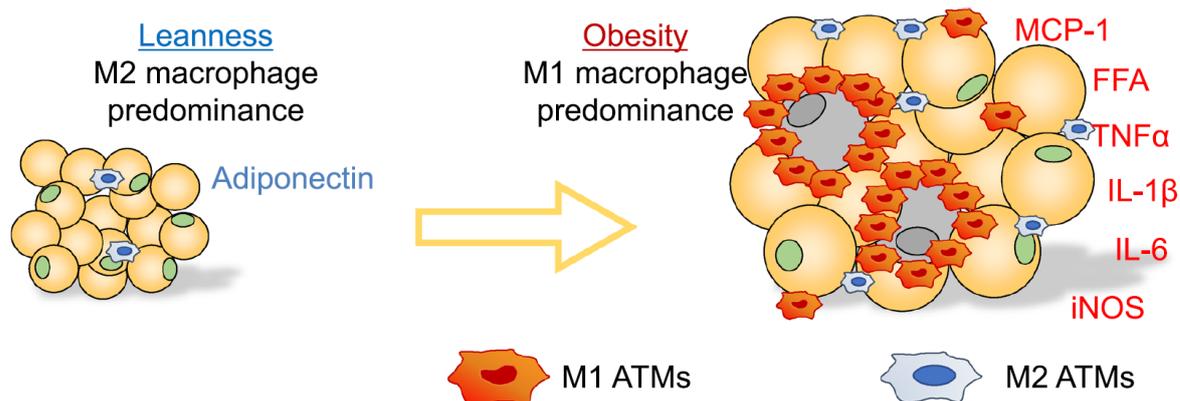
### 1.3 Estabelecimento da inflamação crônica de baixo grau na obesidade

#### 1.3.1 Mudança do fenótipo do tecido adiposo branco na obesidade

A compreensão de como as alterações no tecido adiposo branco podem levar à RI passa pelo entendimento de que esse tecido não é mais considerado apenas um local de reserva energética. Morfologicamente, é composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos, leucócitos e células endoteliais, adquirindo também funções metabólicas e imunológicas (Luo and Liu, 2016).

Os adipócitos são células capazes não apenas de estocar lipídeos na forma de triglicerídeos e colesterol, mas também de secretar diversas substâncias genericamente chamadas de adipocinas. No tecido adiposo branco saudável, as adipocinas exercem importantes funções na comunicação com outros órgãos, controlando a ingesta alimentar (leptina) e aumentando a sensibilidade à insulina (adiponectina) (Zhang and Chua, 2017; Fang and Judd, 2018). Os macrófagos residentes do tecido adiposo branco saudável possuem fenótipo tipo M2, e atuam secretando citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 (Interleucina 4) e IL-10 (Interleucina 10) (Cai, Huang and He, 2022).

Na obesidade, há hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco de maneira não proporcional à angiogênese, resultando em uma diminuição da densidade capilar e da perfusão de oxigênio tecidual. Ao mesmo tempo, o aumento de ácidos graxos circulantes estimula a fosforilação oxidativa, aumentando a demanda por oxigênio no tecido. A soma desses quadros leva à hipoxia do tecido adiposo, fator responsável por estimular a secreção de MCP-1 (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) pelos adipócitos (Rohm *et al.*, 2022). Este aumento de MCP-1 promove a infiltração de macrófagos do tipo M1 no tecido adiposo branco, que, diferentemente dos macrófagos do tipo M2, possuem fenótipo pró-inflamatório e atua secretando IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , como é ilustrado na figura 2 (Lumeng, Bodzin and Saltiel, 2007; Olefsky and Glass, 2010; Fujisaka, 2020). A partir disso, a inflamação é estabelecida de maneira crônica. Enquanto em indivíduos magros a quantidade de macrófagos no tecido adiposo é de 5-10%, em obesos a população desse tipo celular pode chegar a 50% do tecido adiposo total (Weisberg *et al.*, 2003; Chylikova *et al.*, 2018).



**Figura 2** Mudança da polarização do fenótipo M1/M2 em indivíduos obesos. ATMs: *adipose tissue macrophages*. MCP-1: *monocyte chemoattractant protein 1*. FFA: *free fatty acids*. TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*. IL-1 $\beta$ : *interleukine 1*. IL-6: *interleukine 6*. iNOS: *nitric oxide synthase inducible*. (Fonte: Fujisaka, 2020)

### 1.3.2 Papel dos ácidos graxos livres e seus metabólitos na inflamação

Os ácidos graxos são uma classe de lipídeos caracterizada estruturalmente por serem uma cadeia de carbonos associada a um grupo carboxila (Tvrzicka *et al.*, 2011). Eles ocupam papel importante no metabolismo, sendo estocados na forma de triglicerídeos durante o estado alimentado e tornam-se o principal substrato energético durante o jejum (De Carvalho and Caramujo, 2018).

A obesidade costuma estar associada a uma dieta hipercalórica, rica em carboidratos e lipídeos, onde ocorre aumento dos níveis de ácidos graxos no sangue. Os ácidos graxos livres, principalmente ácidos graxos saturados, atuam como substâncias pró-inflamatórias, estimulando os receptores TLR4 (do inglês *Toll Like Receptor 4*) em macrófagos (Rocha *et al.*, 2016). Os TLR4 atuam como receptores de reconhecimento de microrganismos e são parte da resposta imunológica inata, protegendo o organismo contra infecções. A ativação de TLR4 estimula vias pró-inflamatórias como IKK- $\beta$ /NF $\kappa$ B e JNK/AP-1, culminando na secreção de citocinas como IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e MCP-1 (de Luca and Olefsky, 2008; Neacsu *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015).

No pâncreas, níveis cronicamente elevados de ácidos graxos livres causam, além de ativação de vias pró-inflamatórias, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e apoptose das células beta pancreáticas, caracterizando um estado de lipotoxicidade (Cusi, 2010; Hudish, Reusch and Sussel, 2019). Esta lipotoxicidade pode ser definida como os efeitos do excesso de ácidos graxos/lipídeos em tecidos

não adiposos sobre o metabolismo da glicose, que surge pelo prejuízo na sinalização insulínica causado pelos fatores inflamatórios gerados (Engin, 2017).

A proteção contra a lipotoxicidade ocorre por meio do aumento da oxidação de ácidos graxos ou estímulo de seu armazenamento como triglicerídeos no tecido adiposo, impedindo o acúmulo ectópico de lipídeos no organismo. No entanto, a oxidação exacerbada de ácidos graxos aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio, causando estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial. No pâncreas, a diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial afeta a produção de ATP e conseqüentemente o estabelecimento da relação ATP/ADP, necessária para a secreção de insulina, causando disfunção da célula beta (Yazıcı and Sezer, 2017). O aumento da oxidação de ácidos graxos ainda pode resultar em acúmulo de Acetil-CoA e citrato, intermediários que inibem a oxidação de glicose pela inibição de enzimas da via glicolítica. No fígado a captação de glicose ocorre via GLUT2, que entra na via glicolítica. Enquanto citrato inibe a fosfofrutoquinase-1, enzima que controla um passo limitante da glicólise, o Acetil-CoA inibe a enzima e piruvato-quinase. Com isso, há acúmulo de glicose-6-fosfato, que inibe a enzima hexoquinase, culminando na redução da captação de glicose através de GLUT2 (Chabowski *et al.*, 2013).

Durante o processo de mobilização destes lipídeos ectópicos, alguns intermediários com capacidade pró-inflamatória são formados. Na obesidade, enquanto a ATGL (do inglês *Adipose Triglyceride Lipase*) tem seu conteúdo e função normais, a HSL (do inglês *Hormone-Sensitive Lipase*) apresenta conteúdo reduzido (Jocken *et al.*, 2010). Isso resulta na formação e acúmulo de DAG (Diacilglicerol), um importante sinalizador capaz de ativar a via IKK- $\beta$ /NF $\kappa$ B (Engin, 2017). Embora haja diferentes subtipos de DAG, cada um com funções específicas, indivíduos acometidos por RI hepática apresentam um acúmulo de triglicerídeos intra-hepáticos que está intimamente associado a um acúmulo de DAG. Esse DAG acumulado nos hepatócitos, por sua vez, ativa uma PKC (do inglês *Protein Kinase C*) que fosforila o receptor de insulina em um resíduo de treonina, resultando em inibição da atividade tirosina quinase. Assim, a cascata de sinalização insulínica adiante fica prejudicada (Petersen and Shulman, 2017). Dessa maneira, o DAG formado por alterações no metabolismo dos ácidos graxos é capaz de modificar a sinalização insulínica, comprometendo a captação de glicose. Entretanto, deve ser levado em consideração que as concentrações intracelulares aumentadas de DAG podem ser resultado tanto

da hidrólise de fosfatidilinositol da membrana celular como da reesterificação de ácidos graxos livres captados pela própria célula.

Enquanto o DAG é uma molécula intermediária do metabolismo lipídico, as ceramidas se apresentam como moléculas lipídicas bioativas que podem ser originadas da hidrólise da esfingomiéline, um lipídeo de membrana, pela ação de uma esfingomiélinase ativada por citocinas pró-inflamatórias, estando relacionadas ao desenvolvimento de RI (Peraldi *et al.*, 1996; Sawai and Hannun, 1999; Gomez-Muñoz *et al.*, 2016; Samuel and Shulman, 2016). As ceramidas são capazes de inibir a captação de glicose, síntese de glicogênio e ativação da AKT através da ativação de enzimas como a PP2A (do inglês *Protein Phosphatase 2A*), enzima responsável pela desfosforilação da AKT, cuja atividade está estimulada no músculo esquelético de indivíduos obesos e hepatócitos de ratos resistentes à insulina (Dobrowsky and Hannun, 1993; Itani *et al.*, 2000; Galbo *et al.*, 2011; Larsen and Tennagels, 2014; Mahfouz *et al.*, 2014). Além da defosforilação e inativação da AKT, as ceramidas ativam uma isoforma de PKC que é capaz de inibir a translocação da AKT até a membrana dos hepatócitos (Galbo *et al.*, 2011). A ausência da AKT na membrana celular impede a correta sinalização insulínica (Petersen and Shulman, 2017). Por último, uma diminuição na ativação da AKT resulta em prejuízo na capacidade da insulina em suprimir a liberação de glicose hepática, e na diminuição da captação de glicose nos tecidos muscular e adiposo (Galbo *et al.*, 2011) Dessa maneira, a formação de metabólitos intermediários do metabolismo lipídico, como DAG e ceramidas, apresenta uma associação direta à RI, culminando em um ciclo vicioso onde aumento da formação de metabólitos lipídicos leva a uma diminuição de captação de glicose que, por sua vez, leva à estimulação do metabolismo lipídico e formação de seus metabólitos.

### 1.3.3 Obesidade, disbiose e inflamação

A modulação da microbiota intestinal tem recebido grande atenção nos últimos anos quanto ao seu papel no desenvolvimento de doenças metabólicas. Ela tem capacidade de aumentar a extração de energia dos alimentos, regular a transcrição de alguns genes e síntese de proteínas que controlam o balanço energético e garantir a integridade da mucosa intestinal (Saad, Santos and Prada, 2016; Scheithauer *et al.*, 2020). Embora a diversidade da microbiota seja enorme, a distribuição das espécies

residentes se dá em três grandes filos, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria, presentes em proporções diferentes em indivíduos magros e obesos. O papel de cada uma das espécies presentes na microbiota intestinal ainda não está exatamente claro no que concerne à regulação do metabolismo intermediário, mas é bem estabelecido que mudanças na microbiota acompanham o IMC e hábitos alimentares (De Vos *et al.*, 2022).

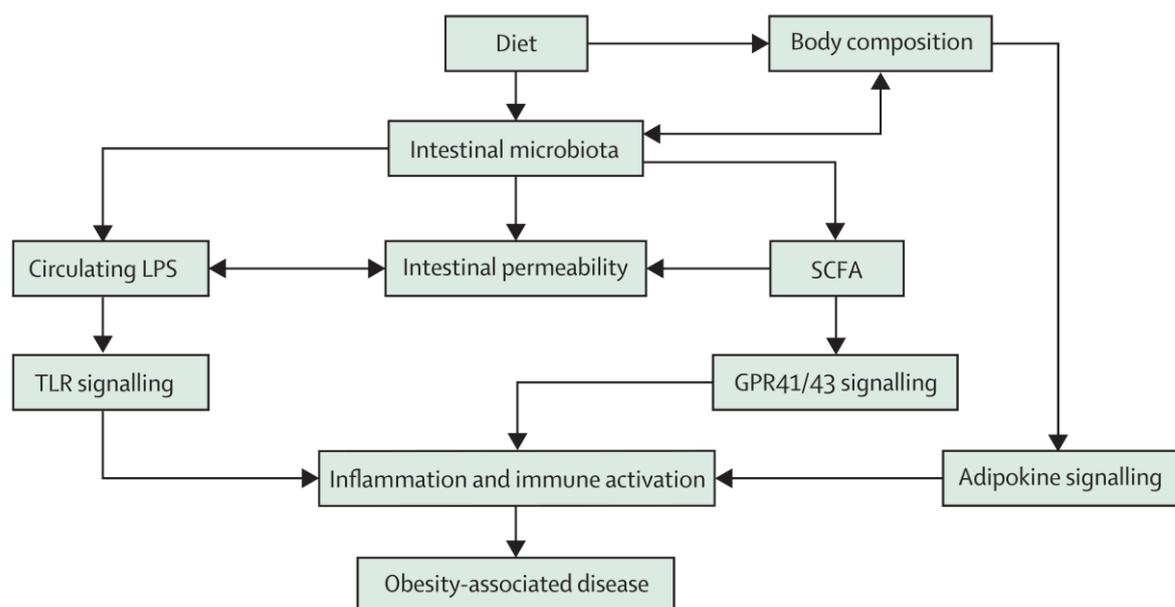
Em indivíduos obesos, por exemplo, há diminuição da população da espécie *Akkermansia muciniphila*, e seu reestabelecimento é associado à melhora da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (Everard *et al.*, 2013). Por outro lado, o transplante de fezes de animais obesos para animais magros foi capaz de induzir ao aumento da adiposidade e RI (Ridaura *et al.*, 2013). Quanto aos hábitos dietéticos, o fornecimento de uma dieta rica em lipídeos a camundongos também propiciou modificações na microbiota residente, promovendo o aumento das populações de bactérias relacionadas ao aumento de extração de energia e ao aumento da massa corporal (Daniel *et al.*, 2014).

A estabilidade da microbiota é importante para a manutenção da permeabilidade intestinal. Carboidratos não digeríveis são fermentados pela microbiota intestinal, que libera ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato como produtos do seu metabolismo. Esses ácidos graxos estão associados ao aumento da produção de muco intestinal, aumento da produção das proteínas ocludina e zonulina, responsáveis pelas *tigh-junctions*, aumento da oxidação de ácidos graxos, redução de massa corporal, aumento da secreção de GLP-1 (do inglês *Glucagon-Like Peptide 1*) e melhora da sensibilidade à insulina, além de possuir efeito anti-inflamatório pela inibição da via NFkB (De Vos *et al.*, 2022; Fahed *et al.*, 2022; Portincasa *et al.*, 2022). Os efeitos desses ácidos graxos se dão pela ativação de receptores acoplados a proteína G, especialmente GPR41 (do inglês *Orphan G Protein-Coupled Receptor 41*) e GPR43 (do inglês *Orphan G Protein-Coupled Receptor 43*) (Kobayashi *et al.*, 2017).

Logo, mudanças na microbiota podem causar disbiose, diminuindo a formação ácidos graxos de cadeia curta e aumentando permeabilidade intestinal. Um dos problemas associados ao aumento da permeabilidade intestinal é o aumento dos níveis circulantes de LPS (Lipopolissacarídeos) produzidos e secretados por bactérias do tipo Bacteroidetes. Estes LPS são potentes estimuladores dos TLR4 e da

formação de NLRP3 em macrófagos. Além disso, há evidências de que os LPS também estimulam a secreção de MCP-1, colaborando para o desenvolvimento do estado pró-inflamatório do indivíduo (Saad, Santos and Prada, 2016; Tang *et al.*, 2021). Esses eventos são esquematicamente demonstrados na figura 3.

Na obesidade e em situação de fornecimento de dieta hiperlipídica, há aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes. Logo, o aumento de LPS no sangue observado nessas situações ocorre por aumento da permeabilidade intestinal. Alguns estudos já mostraram que uma dieta hiperlipídica é capaz de aumentar os níveis circulantes de LPS, mesmo que de forma transiente. Os níveis de LPS se mostraram elevados entre uma e cinco horas após o consumo de uma refeição rica em gorduras (Cox, West and Cripps, 2015; Cândido, Bressan and Alfnas, 2018). Esse aumento não ocorre apenas pela perda de integridade da mucosa intestinal, mas também pelo fato de que os LPS são transportados no sangue através dos quilomícrons, e a digestão de lipídeos contribui para o aumento da produção dessas lipoproteínas (Cox, West and Cripps, 2015; Scheithauer *et al.*, 2020). Além disso, a dieta rica em lipídeos por si só atua diminuindo a expressão de genes relacionados a proteínas das *tight-junctions*, aumentando a permeabilidade intestinal (Rohr *et al.*, 2020).



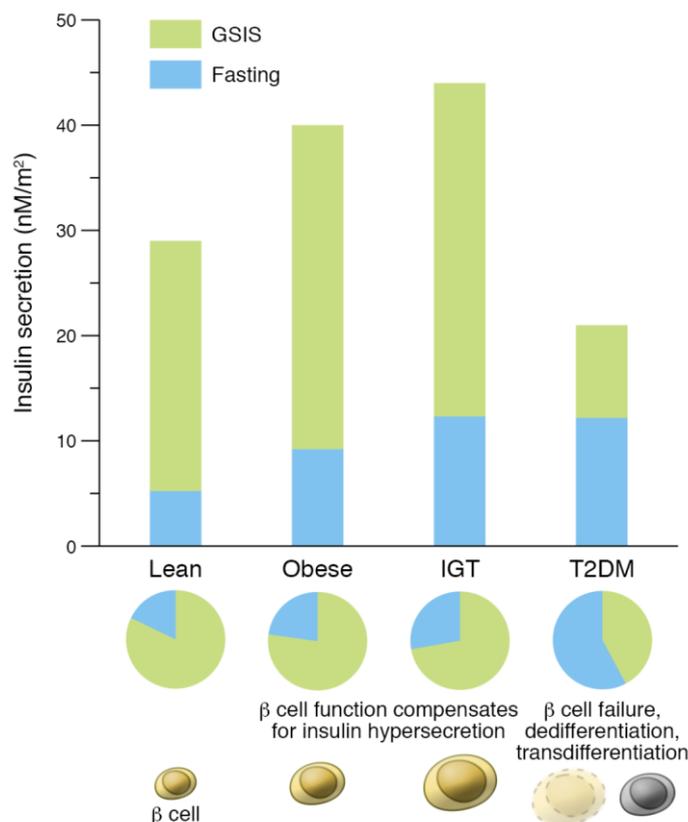
**Figura 3 Relação entre dieta, microbiota e doenças associadas à obesidade.** A dieta hiperlipídica e o aumento do IMC modificam a microbiota intestinal, causando diminuição da produção de ácidos graxos de cadeia curta e aumento da permeabilidade intestinal, levando ao estabelecimento do processo inflamatório. IMC: índice de massa corporal. TLR: *toll like receptor*. SCFA: *short-chain fatty acids*. LPS: *lipopolysaccharide*. (Fonte: Cox, West e Cripps, 2015).

#### **1.4 Progressão da resistência à insulina e desequilíbrios no metabolismo lipídico**

A RI é definida como a incapacidade do pâncreas de secretar insulina em resposta ao aumento da glicemia ou a perda da capacidade dos tecidos em executar as ações promovidas pela ativação do seu receptor (Bovolini *et al.*, 2021). Sem as ações mediadas pela insulina, os tecidos insulino-dependentes têm seu metabolismo alterado e efeitos sistêmicos são gerados.

Além do efeito clássico sobre a translocação de GLUT4 (do inglês *Glucose Transporter 4*) para a membrana celular, no indivíduo saudável, a ligação da insulina ao seu receptor tirosina quinase também desencadeia uma série de eventos que culminam na fosforilação e ativação da AKT. A AKT atua, por vias indiretas, estimulando a glicogênio-sintase e inibindo a HSL. A insulina também é capaz de impedir a produção hepática de glicose pela inibição da glicogênio-fosforilase (Templeman *et al.*, 2017; McCracken, Monaghan and Sreenivasan, 2018; Lan *et al.*, 2019). Estes são apenas alguns dos efeitos que garantem a homeostase do metabolismo intermediário durante o período alimentado.

Os níveis séricos de insulina variam de acordo com a progressão da RI. Como pode ser observado na figura 4, em um primeiro momento, a perda da sensibilidade é compensada com hiperinsulinemia, mantendo a homeostase da glicose. Essa hiperinsulinemia é possível pelo aumento do tamanho e da atividade das células beta pancreáticas. Se o estímulo for crônico, em um dado momento as células entram em exaustão e perdem a capacidade de secretar insulina. Nesse momento, os níveis de insulina diminuem e ocorre hiperglicemia (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Hudish, Reusch and Sussel, 2019). Dessa maneira, os desfechos sistêmicos observados pela perda da sensibilidade à insulina são múltiplos e dependentes do estágio da doença, sendo que há grande comprometimento do metabolismo do fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.

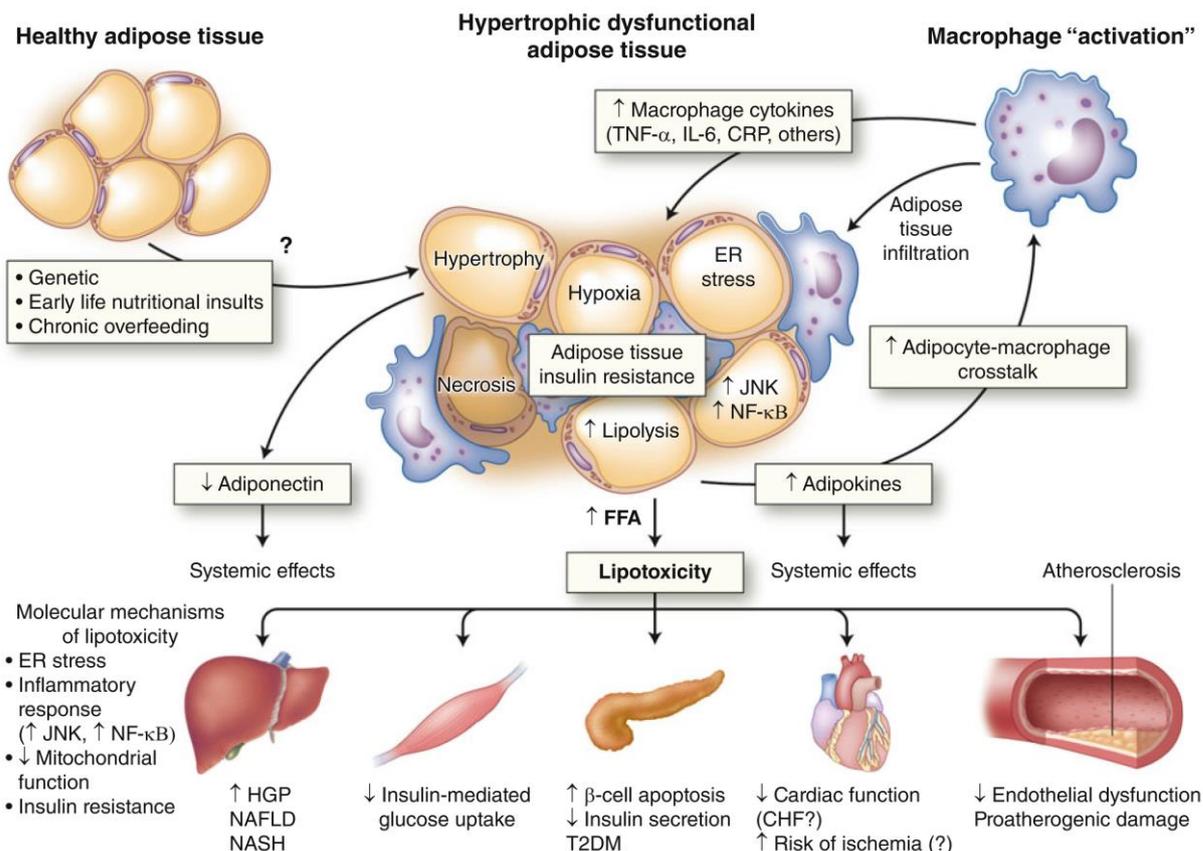


**Figura 4** Mudanças nas concentrações séricas de insulina em jejum e no estado alimentado em indivíduos magros, obesos, insulino-resistentes e diabéticos tipo II e sua relação com a célula beta-pancreática. Em resposta à hiperglicemia, as células beta passam por uma resposta adaptativa que gera hipertrofia da célula e aumento da secreção de insulina. Com a progressão da doença, as células sofrem apoptose e há diminuição dos níveis de insulina no sangue em resposta ao aumento da glicemia. GSIS: *glucose-stimulated insulin secretion*. IGT: *impaired glucose tolerance*. T2DM: *type 2 diabetes mellitus*. (Fonte: Hudish, Reusch e Sussel, 2019).

No indivíduo insulino-resistente, a hiperglicemia ocorre em virtude da menor captação da glicose pelos tecidos periféricos, principalmente músculo esquelético, e pelo aumento da produção hepática de glicose. Os níveis cronicamente elevados causam glicotoxicidade, acarretando desenvolvimento de doenças associadas como aterosclerose, retinopatias e nefropatias (Zheng *et al.*, 2016; Zheng, Ley and Hu, 2018). Outros prejuízos estão associados à lipotoxicidade, causada pelo aumento dos ácidos graxos circulantes derivados da lipólise no tecido adiposo, resultado da ausência de inibição da insulina sobre a HSL (Morigny *et al.*, 2016). Os ácidos graxos livres agravam este quadro causando danos às células beta pancreáticas e aumento do estresse oxidativo no retículo endoplasmático. O aumento de ácidos graxos estimula a oxidação mitocondrial desses substratos, e ainda é um paradoxo se este efeito é benéfico ou não.

É importante ressaltar que há diferenças quanto à contribuição do tecido adiposo visceral e subcutâneo no agravamento da RI. Pela sua localização anatômica, a lipólise no tecido adiposo visceral resulta na liberação de ácidos graxos diretamente no sistema porta, sobrecarregando o fígado (Matsuzawa *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 2022). Somado a isso, enquanto o pâncreas ainda é capaz de secretar insulina adequadamente, a hiperinsulinemia promove aumento de SREBP1 (do inglês *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*), aumentando a lipogênese e resultando no acúmulo de triglicerídeos no fígado, estabelecendo um quadro de esteatose que pode progredir para esteatohepatite não alcoólica (Wendel *et al.*, 2013).

Dito isso, é possível estabelecer a obesidade e hiperalimentação como o fator desencadeante da inflamação crônica de baixo grau que, por sua vez, prejudica a sinalização da insulina, causando resistência ao hormônio. A perda da sensibilidade insulínica desencadeia uma série de alterações metabólicas, incluindo o aumento de ácidos graxos no sangue, reiniciando o ciclo hiperlipidemia-inflamação-RI, culminando no desenvolvimento de SM e DM2. O resumo das alterações nos adipócitos que levam ao desenvolvimento de inflamação e RI, bem como os efeitos sistêmicos da RI são demonstrados na figura 5.



**Figura 5 Interação entre adipócitos, inflamação e resistência à insulina.** O desenvolvimento da resistência à insulina pelo tecido adiposo branco resulta no aumento da lipólise e lipotoxicidade sistêmica, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática, diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético e dano às células beta-pancreáticas. Os efeitos contribuem para o aumento da resistência à insulina, criando um ciclo vicioso que culmina no estabelecimento de diabetes tipo 2. CHF: *congestive heart failure*. CRP: *C-reactive protein*. HGP: *hepatic glucose production*. IL-6: *interleukin 6*. JNK: *C-Jun N-terminal kinase*. NAFLD: *nonalcoholic fatty liver disease*. NASH: *nonalcoholic steatohepatitis*. NF $\kappa$ B: *nuclear factor of kappa-light-polypeptide gene enhancer in b-cells*. T2DM: *type 2 diabetes mellitus*. TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*. (Fonte: Cusi, 2010).

### 1.5 Redução dos lipídeos séricos como meta terapêutica no controle da síndrome metabólica e do diabetes tipo II

Além dos lipídeos circulantes estarem profundamente envolvidos na fisiopatologia da SM e do diabetes, eles representam um aumento do risco de desenvolvimento de doença aterosclerótica por esses pacientes. A dislipidemia é caracterizada por aumento de colesterol total e LDLc (do inglês *Low Density Lipoprotein*), e diminuição de HDLc, onde o tratamento da dislipidemia diabética é recomendado por diversos profissionais no intuito de diminuir o risco cardiovascular nessa população (Mach *et al.*, 2019). O acompanhamento de pacientes diabéticos tipo II tratados com hipoglicemiantes associados a hipolipemiantes e de pacientes tratados apenas com hipoglicemiantes durante quase oito anos mostrou que o primeiro grupo apresentou menor risco de morte por causas cardiovasculares, menor incidência de

eventos cardiovasculares e menor progressão da doença para nefropatias e retinopatias, comprovando os benefícios clínicos da abordagem multiterapêutica (Gæde *et al.*, 2008).

Enquanto alguns hipolipemiantes atuam diminuindo a absorção e síntese de colesterol ou aumentando sua excreção, outros modulam direta ou indiretamente a expressão e degradação de LDLr (do inglês *Low Density Lipoprotein Receptor*). Além destes, há ainda os que agem aumentando a oxidação de ácidos graxos por vias dependentes de PPAR $\alpha$  (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*). Clinicamente, as estatinas são os fármacos mais prescritos no tratamento de dislipidemia associada ao diabetes, seguidas por ezetimiba e fibratos. Além destes, os inibidores de PCSK9 (do inglês *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*) são uma classe emergente na terapia dislipidêmica, alcançando bons resultados quando associados a estatinas e ezetimiba (Steinmetz, 2002; Chapman *et al.*, 2010; Phan, Dayspring and Toth, 2012; Gouni-Berthold, 2015; Hirota, Fujita and Ieiri, 2020).

As estatinas atuam como inibidores competitivos da enzima HMG-CoA redutase (do inglês *3-Hidroxi-3-Methyl-Glutaryl-CoA reductase*), impedindo, em última instância, a biossíntese hepática de colesterol. A diminuição dos níveis de colesterol nos hepatócitos estimula a síntese de LDLr. Uma vez translocados à membrana celular, esses receptores atuam na captação de LDLc e, conseqüentemente, na redução desta lipoproteína no sangue (Jeon and Blacklow, 2005; Hirota, Fujita and Ieiri, 2020). A administração de doses médias a altas de estatinas podem causar uma diminuição de até 50% nos níveis de LDLc (Boekholdt *et al.*, 2014), além deste fármaco também apresentar efeitos discretos sobre os triglicerídeos plasmáticos, diminuindo em até 20% suas concentrações (Reiner, 2013). A associação de estatinas a outros agentes hipolipemiantes é importante para pacientes intolerantes a estatinas ou que possuam níveis de LDLc plasmático acima de 70 mg.dL<sup>-1</sup>. Nestes casos, a dose máxima segura de estatina não é suficiente para alcançar a redução desejada e a terapia associada à ezetimiba ou inibidores de PCSK9 é recomendada (Hao *et al.*, 2022).

A ezetimiba, por sua vez, atua reduzindo a absorção de colesterol da dieta pelo intestino, através da inibição do transportador NPC1L1 (do inglês *Niemann-Pick C1 Like 1*), presente na membrana apical do enterócito. Com esse efeito, a quantidade de colesterol que chega ao fígado diminui e, assim como ocorre com as estatinas, o resultado é o aumento da síntese de LDLr (Phan, Dayspring and Toth, 2012; Xie *et*

*al.*, 2012). Os efeitos da ezetimiba são menos pronunciados do que o das estatinas, e sua administração na dose de 10 mg.dia<sup>-1</sup> resulta em, no máximo, 22% de redução de LDLc no plasma (Phan, Dayspring and Toth, 2012). A associação desse medicamento à terapia com estatinas promove uma redução adicional de aproximadamente 24% nas concentrações plasmáticas de LDLc e diminuição do risco cardiovascular dos pacientes (Cannon *et al.*, 2015).

Não é raro a coadministração de estatinas e ezetimiba com sequestrantes de ácidos biliares. Os ácidos biliares são produzidos no fígado a partir do colesterol e secretados no intestino, onde atuam na emulsificação de gorduras da dieta. Os ácidos biliares costumam ser reabsorvidos e sua retenção nas fezes consiste na única via de excreção de colesterol pelo organismo. Os sequestrantes de ácidos biliares, como a colestiramina, são fármacos que não são absorvidos pelo trato gastrointestinal, ao invés disso, ligam-se aos ácidos biliares impedindo sua reabsorção (Feng *et al.*, 2021). A desvantagem desse tipo de intervenção é a incidência de efeitos colaterais associados ao sistema digestório, como constipação e náusea, além de interação com fármacos e vitaminas lipossolúveis (Steinmetz, 2002).

Ainda como alvo de fármacos hipolipemiantes, a PCSK9 é a enzima responsável pela degradação de LDLr e sua associação com a manutenção dos níveis de LDLc foi estabelecida apenas em 2003 (Abifadel *et al.*, 2003). A partir daí, inibidores de PCSK9 foram desenvolvidos e testados, culminando na produção dos fármacos evolocumabe e alirocumabe, disponíveis no Brasil desde 2016 e 2019, respectivamente. Estes medicamentos são administrados por via subcutânea em intervalos que variam de duas semanas a um mês (Gouni-Berthold, 2015; ANVISA, 2016, 2019). Quando associados a estatinas ou outros fármacos hipolipemiantes, as concentrações de LDLc plasmático podem reduzir em até 60% de maneira dose-dependente. Embora os efeitos desses fármacos sejam muito promissores, os custos são elevados, dificultando o acesso ao tratamento (Moriarty *et al.*, 2015).

Por último, os fibratos representam a classe farmacológica dos agonistas de PPAR $\alpha$ . A ativação do PPAR $\alpha$  promove a transcrição de genes relacionados ao transporte e oxidação de ácidos graxos (Montagner *et al.*, 2016; Naiman *et al.*, 2019). Os fibratos são capazes de reduzir a trigliceridemia em até 50%, e o LDLc plasmático em até 20% (Chapman *et al.*, 2010). Na prática clínica, podem ser prescritos como monoterapia ou ainda associados a estatinas.

## 1.6 Uso de produtos naturais no controle lipídico

Ao longo da história, a busca por moléculas bioativas em produtos naturais provou ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de agentes farmacológicos. Entre as aplicações, destaca-se a identificação e uso dessas substâncias como modelos moleculares para posterior produção de drogas sintéticas ou a mimetização da atividade de uma molécula biológica. Para exemplificar, apenas 24,6% das drogas aprovadas pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration* – EUA) entre 1981 e 2020 são totalmente sintéticas e 67,9% tem algum tipo de origem natural (Newman and Cragg, 2020).

Embora haja opções farmacológicas disponíveis no tratamento de dislipidemias, a busca por novas moléculas bioativas é importante para pacientes intolerantes a estatinas, assim como para o desenvolvimento de tratamentos adjuvantes. Talvez o exemplo de produto natural clinicamente mais utilizado atualmente na diminuição de lipídeos séricos seja o ômega-3, derivado do óleo de peixe. A suplementação de 2-4 g.dia<sup>-1</sup> dos ácidos eicosapentaenoico e docosahexaenoico atua aumentando a síntese de LPL (do inglês *Lipoprotein Lipase*) e a oxidação de ácidos graxos, e diminuindo a síntese de lipídeos, culminando na diminuição de triglicerídeos plasmáticos em até 45% de maneira dose-dependente (Bays *et al.*, 2011; Backes *et al.*, 2016; Stroes *et al.*, 2018).

Quanto às moléculas bioativas de origem vegetal, a berberina, uma molécula alcaloide presente em diversas plantas como *Coptis chinensis*, *Phellodendron chinense*, e *Mahonia bealei*, foi capaz de diminuir as concentrações de LDLc e triglicerídeos em pacientes portadores de DM2 (Hu, Yu and Wang, 2011; Lan *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2020). Entre estes compostos bioativos, moléculas alcaloides estão presentes em diversas espécies de plantas e cogumelos e muitas vezes são relacionadas à regulação do metabolismo lipídico por diferentes vias, como no controle da expressão de HMG-CoA redutase, dos receptores de LDLc, sobre o aumento da sensibilidade à insulina e sobre ativação de PPAR $\alpha$  (Bourebaba *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Bhambhani, Kondhare and Giri, 2021).

Inúmeros cogumelos já foram associados a alguma forma de controle do metabolismo lipídico, sendo capazes de regular lipídeos séricos e hepáticos, bem como a massa corporal. A espécie *Cordyceps militaris* já foi associada à diminuição de lipídeos séricos por inibição de NPC1L1, aumento da expressão de LDLr e dos

transportadores ABCG5 (do inglês *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5*) e ABCG8 (do inglês *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 8*) envolvidos na excreção de ácidos biliares. Esta espécie também atuou aumentando a expressão de PPAR $\alpha$  e ATGL, e diminuindo a expressão de SREBP1 (Hu *et al.*, 2019; Boontiam *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). O gênero *Ganoderma* sp. também é amplamente estudado, e seus efeitos são relatados na literatura como aumento de HSL, ACOX (do inglês *Acyl-CoA Oxidase*), CPT1 (do inglês *Carnitine Palmitoyltransferase 1*), AMPK (do inglês *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*) e PPAR $\alpha$ , e diminuição de FAS (do inglês *Fatty Acid Synthase*), SREBP1 e ACC (do inglês *Acetyl-CoA Carboxylase*) (Bu *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Jeong and Park, 2020; Subramaniam *et al.*, 2020; Romero-Córdoba *et al.*, 2021). A espécie *Grifola frondosa*, assim como as estatinas, inibe a ação da HMG-CoA redutase e possui outros mecanismos associados ao aumento da produção e excreção de sais biliares, aumento da oxidação de ácidos graxos e diminuição da síntese de lipídeos (Pan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Enquanto algumas espécies possuem efeitos fortemente associados à regulação da transcrição gênica e síntese de determinados fatores, outras espécies emergem como potenciais agentes hipolipidêmicos sem mecanismos associados. É o caso dos cogumelos *Basidiomycetes-X*, *Phellinus igniarius*, *Tremella fuciformis* e *Pycnoporus sanguineus* (Dong *et al.*, 2020; Khatun, Sato and Konishi, 2020; Rech *et al.*, 2020; Von Dentz *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023).

### **1.7 Potencial terapêutico de *Pycnoporus sanguineus* e suas aplicações na área da Saúde**

O gênero *Pycnoporus* pertence ao filo Basidiomycota, ordem Polyporales e família Polyporaceae. Esse gênero é dividido em quatro espécies com diferentes origens geográficas, sendo que *P. sanguineus* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Levasseur *et al.*, 2014). *P. sanguineus* é conhecido popularmente como orelha-de-pau sendo encontrado na madeira, onde se fixa e se alimenta. Sua cor laranja-avermelhado é caracterizada pela presença de pigmentos do tipo alcaloide como a cinabarina, tramesanguina, ácido cinabarínico e outras fenoxazonas (Sullivan and Henry, 1971; Achenbach and Blümm, 1991; Dias and Urban, 2009). Além desses

pigmentos, outras moléculas como ergosterol, lambertelina, enzimas lignolíticas e lacases já foram identificadas (Dias and Urban, 2009; Camarero *et al.*, 2012; Jouda *et al.*, 2018).

Devido ao teor de enzimas lignolíticas e lacases nos cogumelos pertencentes a este gênero, as aplicações de *Pycnoporus* sp. são amplamente estudadas no setor biotecnológico dentro da indústria de alimentos, papel, corantes e na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Eggert, 1997; Garcia, Santiago and Ulhoa, 2006; Camarero *et al.*, 2012). Contudo, estudos que avaliam a aplicação de *Pycnoporus* sp. e seus derivados na área da saúde são escassos e recentes. Existem relatos do uso da espécie por comunidades do nordeste do Brasil que consideram a utilização de infusões do basidioma para o tratamento de cólicas gástricas e renais, asma e para diminuição do sangramento durante a menstruação. Contudo, nenhum uso para controle de distúrbios no metabolismo intermediário foi relatado por essas populações (Andrade *et al.*, 2021).

Os compostos identificados e extraídos de *P. sanguineus* foram avaliados em alguns contextos na área da saúde. A cinabarina é uma molécula que possui ainda hoje função biológica desconhecida, possui peso molecular 286,243 g.mol<sup>-1</sup> e fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sendo uma molécula orgânica do tipo alcaloide. Um estudo avaliou a toxicidade da cinabarina em ratos e observou que a maior concentração utilizada (1000 mg.kg<sup>-1</sup>) não foi suficiente para matar os animais ou causar danos morfológicos no fígado e rins (Smânia *et al.*, 2003). Esta molécula já foi associada à ação antiviral pela capacidade de diminuir a infecção pelo vírus da raiva em cultura celular, e a efeito antibacteriano, pela inibição do crescimento de *Bacillus cereus*, *Leuconostoc plantarum* e *Klebsiella pneumoniae* (Smânia, Smânia Júnior and Loguercio-Leite, 1998; Smânia *et al.*, 2003).

Embora pouco se conheça sobre os efeitos da cinabarina, sabe-se que outras moléculas da mesma família como o próprio ácido cinabarínico e a fenoxazinona podem atuar no sistema nervoso ativando receptores metabotrópicos de glutamato, no fortalecimento do sistema imunológico estimulando a produção de linfócitos, além de possuírem atividade neuroprotetora, antibacteriana e antioxidante (Eggert, 1997; Fazio *et al.*, 2012, 2014; Lowe *et al.*, 2014; Polak *et al.*, 2016). Os efeitos da ativação do ácido cinabarínico sobre os receptores metabotrópicos de glutamato foram investigados em um modelo de dor neuropática e verificou-se que a molécula produziu

analgesia a partir da administração de 0,125 mg.kg<sup>-1</sup> por via intraperitoneal (Notartomaso *et al.*, 2022).

O ácido cinabaránico endógeno, gerado pelo metabolismo do triptofano, também pode exercer efeitos hepatoprotetores pela ativação do receptor de hidrocarboneto aril, promovendo a expressão de staniocalcina 2 (Lowe *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2015). Esses efeitos foram investigados com mais profundidade recentemente e observou-se que a injeção intraperitoneal de ácido cinabaránico (12 mg.kg<sup>-1</sup>) três vezes por semana, durante 6 semanas, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, foi capaz de diminuir o ganho de peso e a esteatose hepática e aumentar a tolerância a glicose. Essa melhora se deu por regulação de genes envolvidos na síntese e oxidação de lipídeos e na resposta inflamatória. O tratamento promoveu diminuição de CD36 (do inglês *Cluster of Differentiation 36*), ACC, FAS, SCD1 (do inglês *Stearoyl-CoA Desaturase 1*), SREBP1, PPAR $\gamma$  (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*), TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e MCP-1, e aumento de CPT1 $\alpha$  e CPT2 (Patil *et al.*, 2022). Destaca-se que estes estudos utilizaram ácido cinabaránico produzido quimicamente e não a partir da extração de produtos naturais.

Quanto aos estudos envolvendo moléculas extraídas de *P. sanguineus*, já foi atribuído ao ergosterol atividade leishmanicida. Todavia, os autores também observaram essa atividade em outras frações do extrato livres de ergosterol, concluindo que outras moléculas deveriam ser identificadas e estudadas (Correa *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi avaliado o efeito anti-inflamatório da lambertelina extraída de *P. sanguineus*. Nesse estudo, o pré-tratamento com a lambertelina em macrófagos com inflamação induzida por LPS foi capaz de diminuir a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  por modulação das vias MAPK e NF $\kappa$ B (Jouda *et al.*, 2018). Efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos também foram associados ao extrato etanólico e aos polissacarídeos de *P. sanguineus*. Através desses efeitos houve restauração da barreira epitelial intestinal de camundongos expostos a um modelo de colite ulcerosa (Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

O extrato metanólico de *P. sanguineus* foi capaz de inibir o crescimento de uma série de bactérias e fungos. Antibiogramas e antifungogramas com discos impregnados com o extrato inibiram o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e dos fungos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida maltosa*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Al-Fatimi *et al.*, 2013).

A capacidade antioxidante de *P. sanguineus* foi avaliada em alguns estudos e recentemente foi aplicada no tratamento de úlceras diabéticas em camundongos C57BL/6 com diabetes induzida por STZ (estreptozotocina). Nesse estudo foram produzidas e aplicadas nanopartículas de prata revestidas com polissacarídeos de *P. sanguineus*, cuja intervenção acelerou a cicatrização e reduziu o processo infeccioso (Borderes *et al.*, 2011; Jaszek *et al.*, 2015; Gambato *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2023).

No que concerne aos efeitos sobre o metabolismo intermediário, nosso grupo de pesquisa identificou que o extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus* apresentou efeito hipolipídico em ratos diabéticos tratados por 30 dias. O tratamento promoveu diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol não-HDL a valores considerados normais. Acredita-se que o efeito observado possa ser atribuído à molécula cinabarina, molécula majoritária na composição do extrato utilizado (Von Dentz *et al.*, 2020). Outro estudo recente identificou que a administração de ração suplementada com o micélio de *P. sanguineus* também promoveu diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol não-HDL em ratos diabéticos (Rech *et al.*, 2020). Em outro estudo do nosso grupo, o tratamento com o extrato de *P. sanguineus* também foi capaz de promover o ganho de massa corporal e o aumento da oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> e síntese de lipídeos a partir de glicose no tecido adiposo retroperitoneal em ratos diabéticos (Von Dentz, 2018). Esse perfil de atuação sugere que o extrato de *P. sanguineus* pode atuar ativando PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ .

Recentemente, um estudo mostrou o efeito hipolipidêmico *in vivo* de diferentes tipos de fenoxazinonas produzidas de forma sintética. Posteriormente, pela técnica de *docking* molecular, esse mesmo estudo comprovou que essas moléculas são potentes agonistas do PPAR $\alpha$ . A modulação do PPAR $\alpha$  pelas moléculas estudadas foi atribuída à existência do grupo carboxamida, semelhante ao encontrado nas moléculas cinabarina e ácido cinabarínico (Ugwu *et al.*, 2018).

Com base nesses dados, fica evidente que a espécie de basidiomiceto *P. sanguineus* é uma fonte de moléculas pouco exploradas que podem atuar como agentes farmacológicos. A ação sobre o metabolismo lipídico é uma das linhas que começa a ser delineada, mas ainda carece de informações quanto às vias reguladas e compostos responsáveis por tal efeito.

## 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 Hipótese

Existem evidências que o extrato de *P. sanguineus* tem o potencial para ser utilizado como um nutracêutico no tratamento de dislipidemias relacionadas a doenças metabólicas, como diabetes mellitus, obesidade e SM. Assim, o extrato pode atuar sobre vias bioquímicas ligadas ao metabolismo de lipídeos levando à normalização de seus níveis.

### 2.2 Objetivo geral da revisão narrativa

Analisar criticamente os estudos publicados nos últimos cinco anos que investigaram o impacto das espécies de cogumelos e seus compostos bioativos no metabolismo lipídico, identificando os principais fatores modulados e os desfechos sistêmicos obtidos.

### 2.3 Objetivos específicos da revisão narrativa

- Identificar os estudos científicos que avaliaram os efeitos de cogumelos sobre o metabolismo lipídico publicados nos últimos cinco anos em revistas indexadas aos repositórios PubMed/NCBI, Scopus e Web Of Science.
- Catalogar as espécies e compostos bioativos mencionados nos estudos selecionados.
- Relacionar as espécies catalogadas aos desfechos sistêmicos provocados no que concerne ao metabolismo lipídico.
- Investigar os mecanismos pelos quais os cogumelos utilizados nos estudos modularam o metabolismo lipídico.
- Promover uma visão geral dos mecanismos atribuídos a cada espécie pelos diferentes estudos nos últimos cinco anos.
- Identificar lacunas nos estudos existentes e propor direções futuras para a pesquisa neste campo.

## 2.4 Objetivo geral do estudo experimental

Investigar as vias metabólicas pelas quais o extrato de *P. sanguineus* atua para produzir efeitos hipolipídicos em ratos portadores de SM e portadores de diabetes induzido por STZ (tipo I). A investigação foi realizada pela avaliação do metabolismo hepático e do tecido adiposo por meio da análise das vias de síntese e catabolismo de carboidratos e lipídeos, além de marcadores moleculares relacionados.

## 2.5 Objetivos específicos do estudo experimental

- Identificar as moléculas presentes no extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus*.
- Determinar as concentrações de cinabarina e ácido cinabarínico no extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus*.
- Submeter ratos portadores de SM ao tratamento com o extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus* e após:
  - Avaliar a massa corporal total, massa do fígado e massa do tecido adiposo retroperitoneal.
  - Determinar os níveis colesterol total, HDLc, LDLc, triglicerídeos, glicose e insulina séricos.
  - Calcular o índice de RI (HOMA-IR – do inglês *Homeostasis Model of Assessment of Insulin Resistance*).
  - Quantificar as enzimas transferases hepáticas (AST e ALT – do inglês *Aspartate Aminotransferase* e *Alanine Aminotransferase*, respectivamente).
  - Determinar o conteúdo hepático de triglicerídeos, a lipólise no tecido adiposo retroperitoneal e a oxidação de acetato e palmitato em ambos os tecidos.
  - Determinar o conteúdo de glicogênio, glicogênese hepática e oxidação de glicose no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal.
  - Quantificar a expressão gênica de PPAR $\alpha$  (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) no fígado e PPAR $\gamma$  (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) no tecido adiposo.
- Submeter ratos portadores de diabetes induzido por STZ ao tratamento com o extrato hidroalcoólico de *P. sanguineus* e após:

- Avaliar a massa corporal total, massa do fígado e massa do tecido adiposo retroperitoneal.
- Determinar os níveis colesterol total, HDLc, LDLc, triglicerídeos e glicose séricos.
- Quantificar as enzimas transferases hepáticas (AST e ALT).
- Determinar o conteúdo triglicerídeos, a lipogênese a partir de glicose e a oxidação de acetato e palmitato no fígado.
- Determinar o conteúdo de glicogênio, glicogênese hepática e oxidação de glicose no fígado.
- Quantificar a expressão gênica de PPAR $\alpha$  (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) no fígado e PPAR $\gamma$  ( do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) no tecido adiposo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos, local e exequibilidade

As técnicas descritas a seguir foram realizadas em laboratórios da UFRGS e da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Enquanto o cultivo do cogumelo e a produção do extrato foram realizados no Laboratório de Enzimas e Biomassas da UCS, a análise do extrato e os experimentos envolvendo animais foram realizados na UFRGS, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA-UFRGS) e no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) do Departamento de Fisiologia (UFRGS), respectivamente.

Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei Arouca (Lei n. 11.794, 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pela Sociedade Brasileira de Animais de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e está registrado no sistema dessa universidade sob o **número 35657** (anexo I). Os responsáveis pelo manuseio dos animais passaram por treinamento prévio e possuem experiência com o protocolo experimental e com a prática de eutanásia.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) concedeu autorização de acesso ao componente do patrimônio genético das amostras. A autorização está registrada sob o cadastro de número ACCE626, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

A estirpe de fungo utilizada nesse trabalho foi a espécie *Pycnoporus sanguineus*, linhagem 14G. A cepa foi coletada na cidade de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil (29° 26' 52" S, 50° 35' 2" W). O micélio foi isolado e está armazenado no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul. A exsicata do macrofungo coletado após isolamento em meio artificial está depositado no Herbário da Universidade de Caxias do Sul, na micoteca da mesma (HUCS/MIUCS).

### 3.2 Seleção dos estudos científicos para elaboração de uma revisão narrativa

Para encontrar estudos que avaliassem os efeitos de cogumelos sobre o metabolismo lipídico, foi conduzida uma pesquisa utilizando os repositórios científicos PubMed/NCBI, Scopus e Web of Science. Foram utilizados os seguintes termos de busca: “mushroom”, “mushroom and lipid metabolism” e “lipid metabolism”, bem como suas formas plurais. Estas buscas foram realizadas entre fevereiro e maio de 2023, respeitando um corte temporal dos últimos cinco anos de publicação. Apenas artigos experimentais e escritos na língua inglesa foram selecionados, e todos os autores conduziram suas buscas de forma independente. Posteriormente, 189 artigos encontrados foram reunidos e suas duplicatas eliminadas, totalizando 109 artigos. Dois avaliadores analisaram de forma independente quais artigos deveriam ser incluídos na revisão. Após isso, foi realizada uma avaliação criteriosa dos trabalhos selecionados, onde foram excluídos artigos que avaliaram apenas efeitos *in vitro*, *in silico* ou que não tinham como foco a avaliação direta do metabolismo de lipídeos. Dessa maneira, 67 artigos foram selecionados para a redação desta revisão.

### 3.3 Obtenção e análise do extrato

#### 3.3.1 Cultivo do cogumelo

As condições adotadas para o cultivo e produção do extrato de *Pycnoporus sanguineus* foram seguidas conforme descrito por Gambato e colaboradores (Gambato *et al.*, 2016). Primeiramente, o micélio do cogumelo foi cultivado em placa de Petri com meio de cultivo contendo 2% serragem de *Pinus* moída, 2% farelo de trigo moído, 0,2% carbonato de cálcio e 2% ágar. O micélio foi mantido em estufa pelo período de sete dias a 24°C. Após esse período os discos colonizados foram transferidos para sacos de propileno com novo meio de cultivo contendo 94% serragem de *Pinus* moída, 5% farelo de trigo moído, 1% carbonato de cálcio e 66% água.

Os sacos permaneceram fechados pelo período de quatro semanas em ambiente escuro a 24°C para a propagação do micélio. Após foram perfurados e colocados em estufa a 20°C e umidade relativa 80-90% para o crescimento dos basidiomas. A colheita do macrofungo ocorreu diariamente assim que os basidiomas começaram a se formar.

### 3.3.2 Produção do extrato

Após a colheita, os basidiomas de *P. sanguineus* foram secos em estufa a 60°C e macerados em um processador. Foram então acrescidos 400 mL de etanol 70°G a 100 g do macrofungo moído e esta mistura foi fervida em destilador a 90°C durante 30 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro e a fração líquida foi armazenada para utilização posterior. Ao sólido resultante foram adicionados 400 mL de água destilada e a mistura foi novamente fervida em destilador a 100°C durante 60 minutos e em seguida filtrada em papel filtro (Gambato *et al.*, 2016). Foi então preparada uma mistura com quantidades proporcionais de cada fração líquida obtida. Esta mistura foi liofilizada e armazenada em frasco âmbar em um dessecador à temperatura ambiente até o momento da utilização.

### 3.3.3 Análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS)

As quantidades relativas de cinabarina e ácido cinabárínico do extrato foram mensuradas através de adaptações na metodologia proposta por Dias e Urban (Dias and Urban, 2009).

Antes da análise, o extrato foi dissolvido em CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) e filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm. Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18 (4 µm, 250 mm x 4,6 mm) utilizando como fase móvel um gradiente de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (0-2 min 10% CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O; 14-24 min 75% CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O; 26-30 min 100% CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O e 32-40 min 10% CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O). O fluxo da fase móvel foi de 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 29 °C. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm. Após a saída do detector DAD, um divisor de fluxo permitiu a entrada de 0,45 mL.min<sup>-1</sup> no EM. Os espectros de massas foram adquiridos com um *scan range* de 100 a 800 m/z. Os parâmetros da EM foram os seguintes: fonte ESI no modo de ionização positivo; voltagem do capilar: 3000 V, temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>): 310 °C, fluxo: 8 L.min<sup>-1</sup>, nebulizador: 30 psi; fragmentação no modo automático e energia de fragmentação da EM<sup>2</sup> de 35 eV.

Para quantificação dos compostos ácido cinabárínico e cinabarina, foi utilizado ácido cinabárínico comercial (Sigma Aldrich, 98% de pureza). As concentrações estão expressas em mg do composto por g de extrato em equivalentes de ácido cinabárínico (mg.g<sup>-1</sup>).

### 3.4 Animais

Foram utilizados nesse estudo 64 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No experimento envolvendo a indução de síndrome metabólica os animais chegaram ao biotério com 23 dias de vida. No experimento envolvendo a indução do diabetes os animais chegaram ao biotério com 76 dias de vida. A administração do extrato, independente do modelo, iniciou-se quando os animais atingiram 90 dias de vida.

Os animais foram mantidos no biotério setorial (ICBS), acomodados em caixas padrão de tamanho 340 mm x 410 mm x 200 mm, totalizando 110 cm<sup>2</sup> de piso e separados em grupos de dois a três animais por caixa, com livre acesso à alimentação e à água, em ambiente com temperatura controlada entre 23<sup>o</sup>±2<sup>o</sup>C, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 3.5 Avaliação dos efeitos do extrato de *Pycnoporus sanguineus* sobre o metabolismo intermediário de ratos Wistar portadores de Síndrome Metabólica

#### 3.5.1 Indução da Síndrome Metabólica (MetS)

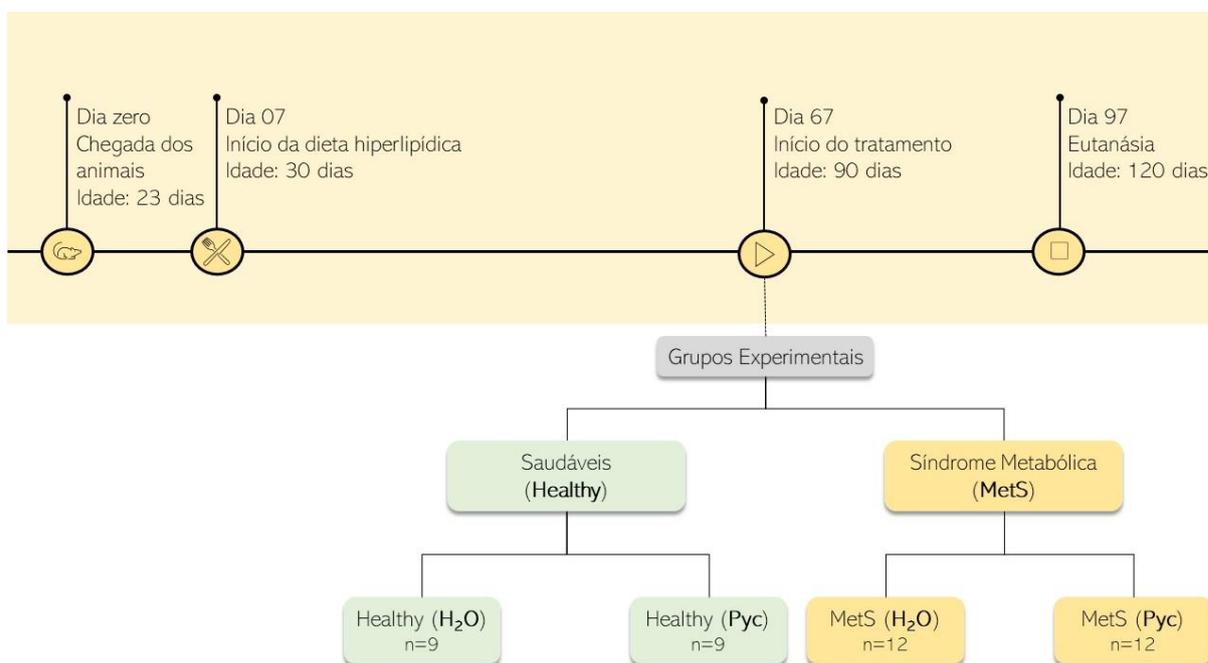
Para indução da Síndrome Metabólica (Mets), os animais receberam dieta hiperlipídica produzida de maneira artesanal, contendo 35,17% de lipídeos, 55,57% de carboidratos e 9,26% de proteínas durante 60 dias (n=24) (Vogt *et al.*, 2021). Os animais saudáveis receberam dieta padrão de biotério (Nuvilab®), contendo 80,01% de carboidratos, 14,47% de proteínas e 5,52% de lipídeos durante o mesmo período (n=18). Os animais portadores de síndrome metabólica e os animais saudáveis continuaram recebendo a dieta hiperlipídica ou padrão respectivamente, durante o período de administração do extrato.

#### 3.5.2 Administração do extrato e desenho experimental

Após a oferta da dieta hiperlipídica ou padrão pelo período de 60 dias, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: MetS e Saudáveis (*Healthy*), cada um composto por subgrupos não tratados (água da torneira - H<sub>2</sub>O) e tratados (extrato de *P. sanguineus* dissolvido em água da torneira - Pyc) (figura 6). Ao longo de um período de 30 dias, o extrato foi administrado aos subgrupos tratados (Pyc) numa dose de 15 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, substituindo a água dos bebedouros (Von Dentz *et al.*,

2020). A solução foi ajustada semanalmente com base nos dados de peso e de consumo hídrico dos ratos. O consumo hídrico foi obtido pela média do consumo dos ratos por caixa em um período de 24h.

Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação. Todos os animais ficaram em jejum por 3-4 horas antes da coleta de sangue e tecidos.



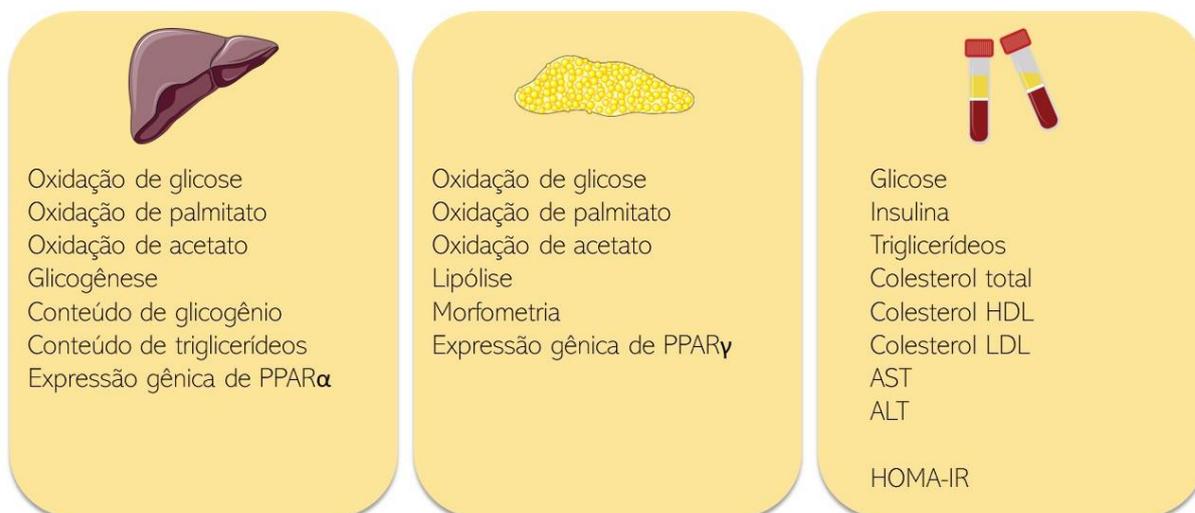
**Figura 6** Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais saudáveis e síndrome metabólica. Após o período de aclimação, a dieta padrão e a dieta hiperlipídica foram ofertadas durante 60 dias até o início do tratamento. O tratamento com *P. sanguineus* teve duração de 30 dias e as dietas continuaram sendo ofertadas nesse período. O número de animais por grupo está representado dentro das caixas.

### 3.5.3 Processamento dos tecidos

O sangue foi coletado em tubo de coleta contendo gel separador e ativador de coágulo (Vacutube®), o qual possibilita a obtenção da amostra de soro com maior qualidade e facilidade de manuseio. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 1150 x g por 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C até o momento da realização das técnicas bioquímicas.

O fígado e o tecido adiposo visceral (VAT, do inglês *Visceral Adipose Tissue*), representado pela gordura retroperitoneal, foram removidos e pesados para que fosse calculado o peso do órgão como porcentagem do peso corporal. Os tecidos removidos durante a dissecação foram imediatamente utilizados nas técnicas de

avaliação metabólica ou congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização nas técnicas bioquímicas e moleculares. O resumo dos parâmetros avaliados em cada tecido pode ser observado na figura 7.



**Figura 7** Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, tecido adiposo retroperitoneal e soro) com as respectivas análises realizadas nos animais saudáveis e portadores de síndrome metabólica.

### **3.6 Avaliação dos efeitos do extrato de *Pycnopus sanguineus* sobre o metabolismo intermediário de ratos Wistar portadores de Diabetes induzido por estreptozotocina**

#### *3.6.1 Indução do Diabetes*

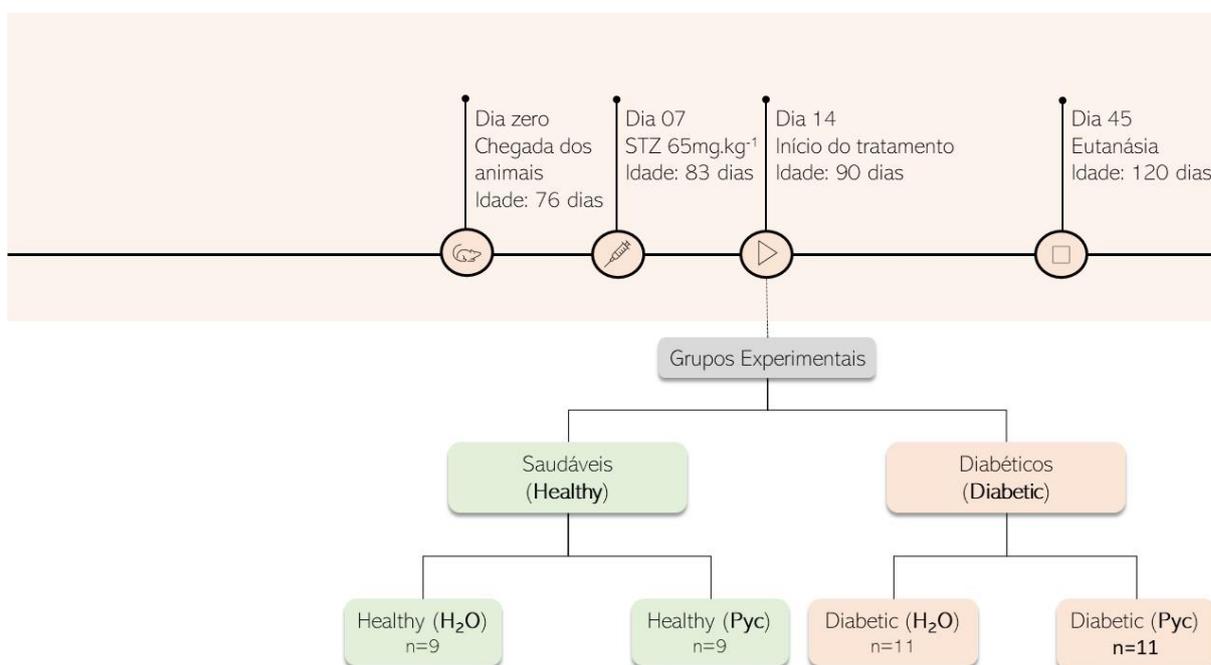
Após o período de aclimatação, o diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de STZ (Sigma) na dose de  $65 \text{ mg.kg}^{-1}$  diluída em 1mL de tampão citrato ( $n=22$ ). Os grupos não diabéticos também receberam injeção intraperitoneal com o mesmo volume de tampão citrato ( $n=18$ ). Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática superior a  $250 \text{ mg.dL}^{-1}$  três dias após a injeção de STZ (Takeuchi *et al.*, 1994; Radenković, Stojanović and Prostran, 2016).

#### *3.6.2 Administração do extrato e desenho experimental*

Sete dias após a indução do diabetes, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Diabéticos e Saudáveis (*Healthy*), cada um composto por subgrupos não tratados (água da torneira -  $\text{H}_2\text{O}$ ) e tratados (extrato de *P. sanguineus* dissolvido em água da torneira - Pyc) (figura 8). Ao longo de um período de 30 dias, o extrato foi administrado aos subgrupos tratados (Pyc) numa dose de  $15 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ,

substituindo a água dos bebedouros (Von Dentz *et al.*, 2020). A solução foi ajustada semanalmente com base no peso dos ratos e nos dados de consumo hídrico. O consumo hídrico foi obtido pela média do consumo dos ratos por caixa em um período de 24h.

Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação. Todos os animais ficaram em jejum por 3-4 horas antes da coleta de sangue e tecidos.



**Figura 8** Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais saudáveis e diabéticos. Após o período de aclimação, a diabetes foi induzida por injeção intraperitoneal de estreptozotocina. Sete dias após, o tratamento com *P. sanguineus* foi iniciado e teve duração de 30 dias. O número de animais por grupo está representado dentro das caixas.

### 3.6.3 Processamento dos tecidos

O sangue foi coletado em tubo de coleta contendo gel separador e ativador de coágulo (Vacutube®), o qual possibilita a obtenção da amostra de soro com maior qualidade e facilidade de manuseio. As amostras de sangue foram então centrifugadas a  $1150 \times g$  por 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização das técnicas bioquímicas.

O fígado e o VAT, representado pela gordura retroperitoneal, foram removidos e pesados para calcular o peso do órgão como porcentagem do peso corporal. Em vista da escassez de tecido adiposo, neste estudo o tecido foi destinado apenas as avaliações moleculares. O tecido hepático removido durante a dissecação foi

imediatamente utilizado nas técnicas de avaliação metabólica ou congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização nas técnicas bioquímicas e moleculares. O resumo dos parâmetros avaliados em cada tecido pode ser observado na figura 9.



**Figura 9** Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, tecido adiposo retroperitoneal e soro) com as respectivas análises realizadas nos animais saudáveis e diabéticos.

### 3.7 Descrição das técnicas realizadas

#### 3.7.1 Parâmetros séricos

O perfil bioquímico foi avaliado pela análise das concentrações séricas ( $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) de colesterol total, HDLc, LDLc, triglicerídeos e glicose. Além disso, os níveis de AST e ALT foram avaliados ( $\text{U/L}$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando kits enzimáticos comerciais (LABTEST Diagnóstica, Brasil) e avaliadas por espectrofotometria (Anthos Zenyth 200RT, Biochrom).

As concentrações de insulina ( $\mu\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram determinadas por meio de ensaio imunoenzimático automatizado (Elisa) usando o kit comercial IBL *International-Tecan* (Hamburgo, Alemanha) em equipamento especializado (BRIO-Radim).

#### 3.7.2 Cálculo do índice de avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR)

O índice de avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina foi calculado como  $\text{HOMA-IR} = [\text{glicose} (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{insulina} (\mu\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1})/22,5]$  (Matthews *et al.*, 1985).

### 3.7.3 Conteúdo de glicogênio e triglicerídeos hepáticos

Para determinar o conteúdo de glicogênio hepático, o tecido hepático foi homogeneizado por fervura em uma solução de KOH a 30% durante 1 hora. Após o glicogênio foi precipitado pela adição de álcool 96°G e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35%. As amostras então foram centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em água destilada. A hidrólise do glicogênio em glicose foi realizada pela fervura do mesmo com HCl 4M durante 1 hora. Após foi acrescido aos tubos 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M para reestabelecimento do pH e a concentração de glicose das amostras foi determinada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). O conteúdo total de glicogênio foi avaliado como equivalentes de glicose usando um kit colorimétrico de glicose-oxidase e expresso como mg% (mg de glicogênio.100mg de tecido<sup>-1</sup> - peso úmido) (Van Handel, 1965; Vogt *et al.*, 2021).

Para determinação dos triglicerídeos hepáticos, amostras do tecido foram homogeneizadas em solução NaCl 0,9% na proporção de 1:10 e a concentração foi então dosada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). Os resultados foram relatados como mg% (mg de triglicerídeos.100mg de tecido<sup>-1</sup> - peso úmido) (Vogt *et al.*, 2021).

### 3.7.4 Lipólise

As amostras de tecido adiposo visceral foram fatiadas e incubadas em um banho metabólico com agitação do tipo Dubnoff (60 ciclos por minuto) a 37°C por 1 hora com 1mL de tampão Krebs-Ringer (KRB: 118 mM NaCl, 4,61 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O, 1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O 0,74 mM, NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM, pH 7.4), suplementado com 1% de albumina livre de ácidos graxos e 5 mM de glicose. A fase gasosa foi saturada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. A taxa de lipólise foi estimada medindo a liberação de glicerol do tecido adiposo visceral, de acordo com Stich e colaboradores (Stich *et al.*, 1997). O glicerol foi mensurado utilizando kit comercial enzimático (R-Biopharm®). Os resultados foram apresentados como g.100g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (gramas de glicerol por 100 gramas de tecido por hora de incubação).

### 3.7.5 Glicogênese

A síntese de glicogênio foi medida seguindo o método de Wredenberg e colaboradores (Wredenberg *et al.*, 2006). Amostras de fígado que foram submetidas ao ensaio de oxidação de glicose foram utilizadas para medir a síntese de glicogênio

pela incorporação de  $U\text{-}^{14}\text{C}$ -glicose no glicogênio. As amostras foram fervidas por 60 minutos em uma solução de KOH a 30%. A precipitação do glicogênio foi obtida adicionando etanol a 96°G e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a 35%. As amostras foram então centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,2 mL de água destilada. A solução foi transferida para outros frascos contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi quantificada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  de glicose de  $^{14}\text{C}$  convertidos em glicogênio por grama de tecido por hora de incubação).

### 3.7.6 Oxidação de substratos

A oxidação de substratos no fígado e no tecido adiposo visceral foi avaliada pela incorporação de radioisótopos marcados com  $^{14}\text{C}$  em  $\text{CO}_2$ , conforme descrito por Mersmann e Hu (Mersmann and Hu, 1987). Fatias de fígado e tecido adiposo retroperitoneal foram incubadas a 37°C por 60 minutos em frascos hermeticamente fechados contendo 1 mL de tampão Krebs-Ringer (KRB: 118 mM NaCl, 4,61 mM KCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,74 mM,  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM, pH 7.4) contendo os substratos marcados e frios, de maneira que:

- Oxidação de glicose: 0,1  $\mu\text{Ci}$  de [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ] glicose (55  $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ , Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) + glicose fria 5 mM;
- Oxidação de acetato: 0,1  $\mu\text{Ci}$  de [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ] acetato (55  $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ , Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) + acetato frio 2 mM;
- Oxidação de palmitato: 0,1  $\mu\text{Ci}$  de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] palmitato (55  $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ , Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) + palmitato frio 0,05 mM (para o fígado) ou 0,1 mM (para o VAT).

A fase gasosa foi saturada com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  e a reação ocorreu em pequenos poços dentro dos frascos de vidro contendo tiras de papel *Whatman* 3MM colocados acima do nível do meio de incubação para capturar o  $^{14}\text{CO}_2$  formado. O processo de oxidação foi interrompido através da adição de ácido tricloroacético 50% (v/v) nos poços contendo tecido e NaOH 2 M nos poços contendo o papel *Whatman* 3MM – esse processo foi realizado inserindo agulhas através das tampas de borracha, sem que ocorresse a perda do  $^{14}\text{CO}_2$  formado. Após 24 h, o papel *Whatman* 3MM foi transferido para uma mistura de cintilação líquida e a radioatividade foi quantificada (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram

apresentados como  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  do substrato de  $^{14}\text{C}$  incorporado em  $\text{CO}_2$  por g de tecido por hora).

### 3.7.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Amostras congeladas de fígado e VAT foram homogeneizadas em TriReagent® (Sigma) e o mRNA (do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*) foi extraído pelo método do clorofórmio-isopropanol. Amostras de mRNA (1 $\mu\text{g}$ ) foram submetidas à transcrição reversa utilizando o *GoScript Reverse Transcription System* (Promega) em um volume total de 20 $\mu\text{l}$ , conforme protocolo do fabricante. Para análise de mRNA, primers específicos de genes (Tabela 1) foram misturados a GoTaq® qPCR e RT-qPCR Systems (Promega) para uma concentração final das alíquotas de cDNA (do inglês *Complementary Deoxyribonucleic Acid*) de 0,2 $\mu\text{M}$  e triplicado de acordo com o protocolo do fabricante. As condições de ciclagem térmica foram de 2 minutos a 95°C, 10 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 10 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C (35 ciclos) seguido de análise da curva de *melting* no Stratagene Mx3000P (Tecnologias Agilent). O método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  foi utilizado para calcular as mudanças relativas nas concentrações de mRNA.

**Tabela 1: Sequência dos primers utilizados**

Gene	Sequência do primer
<i>PPAR<math>\alpha</math> forward primer 5'-3'</i>	TGAACAAAGACGGGATG
<i>PPAR<math>\alpha</math> reverse primer 3'-5'</i>	TCAAACCTTGGGTTCATGAT
<i>PPAR<math>\gamma</math> primers</i>	PrimePCR™ Assays BIORAD

### 3.8 Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado com a utilização do programa Minitab (versão 15) utilizando como base para cálculo os resultados de protocolos experimentais de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa levando em consideração o desvio padrão encontrado nos grupos de diferentes experimentos que utilizaram protocolos semelhantes. Os resultados foram inicialmente analisados usando o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados. Outliers, se presentes, foram identificados e posteriormente excluídos usando o método ROUT (Q=10%). Dados paramétricos estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, enquanto dados não paramétricos estão expressos como valores de mediana, mínimo

e máximo. Para dados paramétricos, a significância estatística foi avaliada usando uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores 1: modelo e 2: tratamento, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados para significância estatística usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ . As análises e representações gráficas foram realizadas usando o software *GraphPad Prism*, San Diego (Versão 8.0.2).

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados obtidos a partir das metodologias descritas nessa tese serão apresentados em três seções distintas:

- I. Artigo 1 (revisão)
- II. Artigo 2 (experimental)
- III. Dados complementares - não publicados

#### **4.1 Artigo 1**

**Título: Mushrooms and Their Compounds in the Modulation of Lipid Metabolism:  
A Comprehensive Review of Recent Findings**

**Periódico: Food Bioscience (ISSN 2212-4292)**

**Qualis: A2**

**Fator de Impacto: 5.2**

**Status: Publicado**

**Acesso: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429223011914>**

#### **4.2 Artigo 2**

**Título: Treatment with the mushroom *Pycnoporus sanguineus* extract increases progression of Metabolic Syndrome effects in Wistar rats**

**Periódico: Brazilian Journal of Medical and Biological Research – BJMBR (ISSN 1414-431X)**

**Qualis: A3**

**Fator de Impacto: 2.9**

**Status: Em revisão - Submetido para publicação em 02 de outubro de 2023**

O e-mail confirmando a submissão do artigo está disponível no anexo II deste documento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abifadel, M. *et al.* (2003) 'Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia', *Nature Genetics* 2003 34:2. Nature Publishing Group, 34(2), pp. 154–156. doi: 10.1038/ng1161.
- Achenbach, H. and Blümm, E. (1991) 'Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus* - *Pycnosanguin* and New Phenoxazin-3-ones', *Archiv der Pharmazie*. Wiley-Blackwell, 324(1), pp. 3–6. doi: 10.1002/ardp.19913240103.
- Al-Fatimi, M. *et al.* (2013) 'Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen.', *Pharmazie*, 68(3), pp. 221–226. doi: 10.1691/PH.2013.2729.
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. and Shaw, J. (2006) 'Metabolic syndrome-a new worldwide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation', *Diabetic Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, 23(5), pp. 469–480. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.
- Andrade, L. H. C. *et al.* (2021) 'Medicinal fungi used by rural communities in Northeastern Brazil', *Indian Journal of Traditional Knowledge*. National Institute of Science Communication and Information Resources, 20(4), pp. 982–989. doi: 10.56042/ijtk.v20i4.27775.
- ANVISA (2016) *Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351062667201529/?substancia=25584> (Accessed: 11 November 2023).
- ANVISA (2019) *Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351189722201963/?nomeProduto=praluent&substancia=25852> (Accessed: 11 November 2023).
- Astrup, A. and Finer, N. (2000) 'Redefining type 2 diabetes: "diabesity" or "obesity dependent diabetes mellitus"?'', *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. *Obes Rev*, 1(2), pp. 57–59. doi: 10.1046/J.1467-789X.2000.00013.X.
- Backes, J. *et al.* (2016) 'The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia', *Lipids in health and disease*. *Lipids Health Dis*, 15(1). doi: 10.1186/S12944-016-0286-4.
- Bahia, L. *et al.* (2012) 'The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study', *BMC Public Health*, 12(1), p. 440. doi: 10.1186/1471-2458-12-440.

- Bays, H. E. *et al.* (2011) 'Eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in patients with very high triglyceride levels (from the Multi-center, placebo-controlled, Randomized, double-blinded, 12-week study with an open-label Extension [MARINE] trial)', *The American journal of cardiology*. *Am J Cardiol*, 108(5), pp. 682–690. doi: 10.1016/J.AMJCARD.2011.04.015.
- Bhambhani, S., Kondhare, K. R. and Giri, A. P. (2021) 'Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids', *Molecules (Basel, Switzerland)*. *Molecules*, 26(11). doi: 10.3390/MOLECULES26113374.
- Boekholdt, S. M. *et al.* (2014) 'Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials', *Journal of the American College of Cardiology*. *J Am Coll Cardiol*, 64(5), pp. 485–494. doi: 10.1016/J.JACC.2014.02.615.
- Boontiam, W. *et al.* (2020) 'Effect of spent mushroom (*Cordyceps militaris*) on growth performance, immunity, and intestinal microflora in weaning pigs', *Animals*. MDPI AG, 10(2360), pp. 1–12. doi: 10.3390/ani10122360.
- Borderes, J. *et al.* (2011) 'Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium', *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Tecpar, 54(6), pp. 1167–1174. doi: 10.1590/S1516-89132011000600012.
- Bourebaba, L. *et al.* (2016) 'Evaluation of antidiabetic effect of total calystegines extracted from *Hyoscyamus albus*', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, pp. 337–344. doi: 10.1016/j.biopha.2016.05.011.
- Bouter, B. *et al.* (2010) 'Diet-genotype interactions in the early development of obesity and insulin resistance in mice with a genetic deficiency in tumor necrosis factor- $\alpha$ ', *Metabolism: clinical and experimental*. *Metabolism*, 59(7), pp. 1065–1073. doi: 10.1016/J.METABOL.2009.11.003.
- Bovolini, A. *et al.* (2021) 'Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors', *International journal of sports medicine*. *Int J Sports Med*, 42(3), pp. 199–214. doi: 10.1055/A-1263-0898.
- Bu, S. *et al.* (2020) 'Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), polysaccharides suppressed adipogenesis and stimulated lipolysis in HPA-V and 3T3-L1 adipocytes', *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(9), pp. 897–908. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020035861.
- Cai, Z., Huang, Y. and He, B. (2022) 'New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance', *Cells*. *Cells*, 11(9). doi: 10.3390/CELLS11091424.

- Camarero, S. *et al.* (2012) 'Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), pp. 1370–1384. doi: 10.1128/AEM.07530-11.
- Cândido, T. L. N., Bressan, J. and Alfenas, R. de C. G. (2018) 'Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet', *Nutricion hospitalaria*. Nutr Hosp, 35(6), pp. 1432–1440. doi: 10.20960/NH.1792.
- Cannon, C. P. *et al.* (2015) 'Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes', *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 372(25), pp. 2387–2397. doi: 10.1056/NEJMOA1410489.
- De Carvalho, C. C. C. R. and Caramujo, M. J. (2018) 'The Various Roles of Fatty Acids', *Molecules (Basel, Switzerland)*. Molecules, 23(10). doi: 10.3390/MOLECULES23102583.
- Chabowski, A. *et al.* (2013) 'Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes', *Acta Physiologica*. John Wiley & Sons, Ltd, 207(2), pp. 346–357. doi: 10.1111/APHA.12022.
- Chapman, M. J. *et al.* (2010) 'Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk', *Pharmacology & therapeutics*. Pharmacol Ther, 126(3), pp. 314–345. doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2010.01.008.
- Chen, H. Y. *et al.* (2012) 'Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from *Rhizoma Coptis* in HepG2 cells', *Fitoterapia*. Fitoterapia, 83(1), pp. 67–73. doi: 10.1016/J.FITOTE.2011.09.014.
- Chen, X. *et al.* (2017) 'The biodistribution, excretion and potential toxicity of different-sized Pd nanosheets in mice following oral and intraperitoneal administration', *Biomaterials science*. Biomater Sci, 5(12), pp. 2448–2455. doi: 10.1039/C7BM00769H.
- Chen, X. *et al.* (2020) 'Ethanol extract of *Pycnoporus sanguineus* relieves the dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by suppressing helper T cell-mediated inflammation via apoptosis induction', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 127, p. 110212. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110212.
- Chylikova, J. *et al.* (2018) 'M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue', *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 162(2), pp. 79–82. doi: 10.5507/BP.2018.015.
- Cobas, R. *et al.* (2022) 'Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2',

*Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*. Conectando Pessoas. doi: 10.29327/557753.2022-2.

Correa, E. *et al.* (2006) 'Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*', *Phytotherapy Research*, 20(6), pp. 497–499. doi: 10.1002/ptr.1890.

Cox, A. J., West, N. P. and Cripps, A. W. (2015) 'Obesity, inflammation, and the gut microbiota', *The lancet. Diabetes & endocrinology*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(3), pp. 207–215. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2.

Cusi, K. (2010) 'The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes', *Current diabetes reports*. *Curr Diab Rep*, 10(4), pp. 306–315. doi: 10.1007/S11892-010-0122-6.

Daniel, H. *et al.* (2014) 'High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice', *The ISME journal*. *ISME J*, 8(2), pp. 295–308. doi: 10.1038/ISMEJ.2013.155.

Von Dentz, M. C. (2018) *Avaliação da atividade do extrato de Pycnoporus sanguineus sobre o metabolismo energético de ratos submetidos aos modelos de diabetes e dislipidemia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Available at: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/174928> (Accessed: 9 October 2020).

Von Dentz, M. *et al.* (2020) 'Antihyperlipidemic effect of the hydroalcoholic extract of Basidiomycete *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. in streptozotocin-induced diabetic rats', *Advances in Traditional Medicine*. Springer, 21, pp. 453–461. doi: 10.1007/S13596-020-00459-1.

Dias, D. A. and Urban, S. (2009) 'HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*.', *Natural product communications*, 4(4), pp. 489–98. doi: 10.1177/1934578X0900400409.

Dobrowsky, R. T. and Hannun, Y. A. (1993) 'Ceramide-activated protein phosphatase: partial purification and relationship to protein phosphatase 2A.', *Advances in lipid research*, 25, pp. 91–104.

Dong, Y. *et al.* (2020) 'Metabolomics study of the hepatoprotective effect of *Phellinus igniarius* in chronic ethanol-induced liver injury mice using UPLC-Q/TOF-MS combined with ingenuity pathway analysis', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH, 74. doi: 10.1016/J.PHYMED.2018.09.232.

Eggert, C. (1997) 'Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*', *Microbiological Research*, 152(3), pp. 315–318. doi: 10.1016/S0944-5013(97)80046-8.

Engin, A. B. (2017) 'What Is Lipotoxicity?', *Advances in experimental medicine and*

- biology*. Adv Exp Med Biol, 960, pp. 197–220. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5\_8.
- Everard, A. *et al.* (2013) 'Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(22), pp. 9066–9071. doi: 10.1073/PNAS.1219451110.
- Fahed, G. *et al.* (2022) 'Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021', *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 23(2). doi: 10.3390/IJMS23020786.
- Fang, H. and Judd, R. L. (2018) 'Adiponectin Regulation and Function', *Comprehensive Physiology*. Compr Physiol, 8(3), pp. 1031–1063. doi: 10.1002/CPHY.C170046.
- Fazio, F. *et al.* (2012) 'Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors', *Molecular Pharmacology*, 81(5), pp. 643–656. doi: 10.1124/mol.111.074765.
- Fazio, F. *et al.* (2014) 'Cinnabarinic acid, an endogenous agonist of type-4 metabotropic glutamate receptor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice', *Neuropharmacology*, 81, pp. 237–243. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.011.
- Feng, Y. *et al.* (2021) 'Bile acid sequestrants: a review of mechanism and design', *The Journal of pharmacy and pharmacology*. J Pharm Pharmacol, 73(7), pp. 855–861. doi: 10.1093/JPP/RGAB002.
- Fujisaka, S. (2020) 'The role of adipose tissue M1/M2 macrophages in type 2 diabetes mellitus', *Diabetology international*. Diabetol Int, 12(1), pp. 74–79. doi: 10.1007/S13340-020-00482-2.
- Furman, B. L. (2021) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current protocols*. Curr Protoc, 1(4). doi: 10.1002/CPZ1.78.
- Gæde, P. *et al.* (2008) 'Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes', *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 358(6), pp. 580–591. doi: 10.1056/NEJMOA0706245.
- Galbo, T. *et al.* (2011) 'Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism', *PloS one*. PLoS One, 6(11). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0027424.
- Gambato, G. *et al.* (2016) 'Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*',

- Bioresource Technology*, 207, pp. 46–51. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.121.
- Garcia, T. A., Santiago, M. F. and Ulhoa, C. J. (2006) 'Properties of Laccases Produced by *Pycnoporus sanguineus* Induced by 2,5-xylidine', *Biotechnology Letters*, 28(9), pp. 633–636. doi: 10.1007/s10529-006-0026-3.
- Gomez-Muñoz, A. *et al.* (2016) 'Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate', *Progress in lipid research. Prog Lipid Res*, 61, pp. 51–62. doi: 10.1016/J.PLIPRES.2015.09.002.
- Gouni-Berthold, I. (2015) 'PCSK9 antibodies: A new class of lipid-lowering drugs', *Atherosclerosis. Supplements. Atheroscler Suppl*, 18, pp. 21–27. doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSISSUP.2015.02.003.
- Guo, W. L. *et al.* (2020) 'Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Grifola frondosa* polysaccharides and their relationships with the modulation of intestinal microflora in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin', *International Journal of Biological Macromolecules. Elsevier B.V.*, 153, pp. 1231–1240. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.10.253.
- Gupta, R. A. *et al.* (2015) 'Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice', *Journal of ethnopharmacology. J Ethnopharmacol*, 164, pp. 239–246. doi: 10.1016/J.JEP.2015.01.039.
- Van Handel, E. (1965) 'Estimation of glycogen in small amounts of tissue', *Analytical Biochemistry. Anal Biochem*, 11(2), pp. 256–265. doi: 10.1016/0003-2697(65)90013-8.
- Hao, Q. *et al.* (2022) 'PCSK9 inhibitors and ezetimibe for the reduction of cardiovascular events: a clinical practice guideline with risk-stratified recommendations', *BMJ (Clinical research ed.)*. *BMJ*, 377. doi: 10.1136/BMJ-2021-069066.
- He, K. *et al.* (2016) 'Hypolipidemic Effects of Alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters', *Planta Medica*, 82(08), pp. 690–697. doi: 10.1055/s-0035-1568261.
- Hirota, T., Fujita, Y. and Ieiri, I. (2020) 'An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins', *Expert opinion on drug metabolism & toxicology. Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 16(9), pp. 809–822. doi: 10.1080/17425255.2020.1801634.
- Hotamisligil, G. S. (2006) 'Inflammation and metabolic disorders.', *Nature*, 444(7121),

pp. 860–7. doi: 10.1038/nature05485.

Hu, S. *et al.* (2019) 'Structural characterisation and cholesterol efflux improving capacity of the novel polysaccharides from *Cordyceps militaris*', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 131, pp. 264–272.

Hu, W., Yu, L. and Wang, M. H. (2011) 'Antioxidant and antiproliferative properties of water extract from *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. leaves', *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. *Food Chem Toxicol*, 49(4), pp. 799–806. doi: 10.1016/J.FCT.2010.12.001.

Huang, X. *et al.* (2023) 'Pycnoporus sanguineus Polysaccharides as Reducing Agents: Self-Assembled Composite Nanoparticles for Integrative Diabetic Wound Therapy', *International journal of nanomedicine*. *Int J Nanomedicine*, 18, pp. 6021–6035. doi: 10.2147/IJN.S427055.

Huang, Y. *et al.* (2020) 'Triterpenoids from functional mushroom *Ganoderma resinaceum* and the novel role of Resinacein S in enhancing the activity of brown/beige adipocytes', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 136. doi: 10.1016/J.FOODRES.2020.109303.

Hudish, L. I., Reusch, J. E. B. and Sussel, L. (2019) ' $\beta$  Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes', *The Journal of clinical investigation*. *J Clin Invest*, 129(10), pp. 4001–4008. doi: 10.1172/JCI129188.

IDF (2006) *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. Edited by IDF Communications. doi: 10.2337/diacare.24.4.683.

IDF (2021) *IDF Diabetes Atlas 2021 - 10th edition*, *International Diabetes Publication*. doi: 10.1016/j.diabres.2013.10.013.

Isomaa, B. *et al.* (2001) 'Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome', *Diabetes Care*, 24(4), pp. 683–689. doi: 10.2337/diacare.24.4.683.

Itani, S. I. *et al.* (2000) 'Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity', *Diabetes*. *Diabetes*, 49(8), pp. 1353–1358. doi: 10.2337/DIABETES.49.8.1353.

Jaszek, M. *et al.* (2015) 'Stimulation of the Antioxidative and Antimicrobial Potential of the Blood Red Bracket Mushroom *Pycnoporus sanguineus* (Higher Basidiomycetes).', *International journal of medicinal mushrooms*, 17(8), pp. 701–12. doi: 10.1615/intjmedmushrooms.v17.i8.10.

- Jeon, H. and Blacklow, S. C. (2005) 'Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor', *Annual review of biochemistry*. Annu Rev Biochem, 74, pp. 535–562. doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.74.082803.133354.
- Jeong, Y. U. and Park, Y. J. (2020) 'Ergosterol peroxide from the medicinal mushroom ganoderma lucidum inhibits differentiation and lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 21(460), pp. 1–13. doi: 10.3390/ijms21020460.
- Jocken, J. W. E. *et al.* (2010) 'Skeletal muscle lipase content and activity in obesity and type 2 diabetes', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. J Clin Endocrinol Metab, 95(12), pp. 5449–5453. doi: 10.1210/JC.2010-0776.
- Joshi, A. D. *et al.* (2015) 'Aryl Hydrocarbon Receptor–Dependent Stanniocalcin 2 Induction by Cinnabarinic Acid Provides Cytoprotection against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress s', *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS J Pharmacol Exp Ther*, 353, pp. 201–212. doi: 10.1124/jpet.114.222265.
- Jouda, J.-B. *et al.* (2018) 'Lambertellin from Pycnoporus sanguineus MUCL 51321 and its anti-inflammatory effect via modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways', *Bioorganic Chemistry*. Academic Press Inc., 80, pp. 216–222. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.06.021.
- Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) 'Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.', *Nature*, 444(7121), pp. 840–6. doi: 10.1038/nature05482.
- Kaur, J. and Jaspinder (2014) 'A comprehensive review on metabolic syndrome.', *Cardiology research and practice*. Hindawi, 2014, p. 943162. doi: 10.1155/2014/943162.
- Khatun, M. A., Sato, S. and Konishi, T. (2020) 'Obesity preventive function of novel edible mushroom, Basidiomycetes-X (Echigoshirayukidake): Manipulations of insulin resistance and lipid metabolism', *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. National Taiwan University, 10(3), pp. 245–251. doi: 10.1016/J.JTCME.2020.03.004.
- Kim, J. H., Bachmann, R. A. and Chen, J. (2009) 'Interleukin-6 and Insulin Resistance', *Vitamins and Hormones*. Academic Press, 80(C), pp. 613–633. doi: 10.1016/S0083-6729(08)00621-3.
- Klein, S. *et al.* (2022) 'Why does obesity cause diabetes?', *Cell Metabolism*. Elsevier, 34(1), pp. 11–20. doi: 10.1016/J.CMET.2021.12.012.

- Kobayashi, M. *et al.* (2017) 'Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells', *Biochemical and biophysical research communications*. *Biochem Biophys Res Commun*, 486(2), pp. 499–505. doi: 10.1016/J.BBRC.2017.03.071.
- Kowalska, I. *et al.* (2008) 'Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome', *Metabolism: clinical and experimental*. *Metabolism*, 57(11), pp. 1539–1544. doi: 10.1016/J.METABOL.2008.06.008.
- Lan, J. *et al.* (2015) 'Meta-analysis of the effect and safety of berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus, hyperlipemia and hypertension', *Journal of ethnopharmacology*. *J Ethnopharmacol*, 161, pp. 69–81. doi: 10.1016/J.JEP.2014.09.049.
- Lan, Y. L. *et al.* (2019) 'Update on the synergistic effect of HSL and insulin in the treatment of metabolic disorders', *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 10. doi: 10.1177/2042018819877300.
- Larsen, P. J. and Tennagels, N. (2014) 'On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis', *Molecular metabolism*. *Mol Metab*, 3(3), pp. 252–260. doi: 10.1016/J.MOLMET.2014.01.011.
- Levasseur, A. *et al.* (2014) 'The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown', *BMC Genomics*, 15(1), p. 486. doi: 10.1186/1471-2164-15-486.
- Li, L. *et al.* (2019) 'Grifola frondosa polysaccharides ameliorate lipid metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis in high-fat diet fed rats', *Food and Function*, 10(5), pp. 2560–2572. doi: 10.1039/c9fo00075e.
- Li, M. *et al.* (2020) 'Polysaccharide from *Pycnoporus sanguineus* ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via helper T cells repertoire modulation and autophagy suppression', *Phytotherapy research: PTR*. *Phytother Res*, 34(10), pp. 2649–2664. doi: 10.1002/PTR.6695.
- Li, Y. *et al.* (2022) 'The polysaccharide-peptide complex from mushroom *Cordyceps militaris* ameliorates atherosclerosis by modulating the lncRNA-miRNA-mRNA axis', *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 13(6), pp. 3185–3197. doi: 10.1039/d1fo03285b.
- Lowe, M. M. *et al.* (2014) 'Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous

- Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production', *PLoS ONE*. Edited by M. Platten, 9(2), p. e87877. doi: 10.1371/journal.pone.0087877.
- de Luca, C. and Olefsky, J. M. (2008) 'Inflammation and insulin resistance', *FEBS letters*. *FEBS Lett*, 582(1), pp. 97–105. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2007.11.057.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R. (2007) 'Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization', *The Journal of clinical investigation*. *J Clin Invest*, 117(1), pp. 175–184. doi: 10.1172/JCI29881.
- Luo, L. and Liu, M. (2016) 'Adipose tissue in control of metabolism', *Journal of Endocrinology*, 231(3), pp. R77–R99. doi: 10.1530/JOE-16-0211.
- Mach, F. *et al.* (2019) '2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk', *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 290(1), pp. 140–205. doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2019.08.014.
- Mahfouz, R. *et al.* (2014) 'Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight', *PLoS one*. *PLoS One*, 9(7). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0101865.
- Matsuzawa, Y. *et al.* (1995) 'Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity', *Obesity research*. *Obes Res*, 3 Suppl 2(2 S), pp. 187s-194s. doi: 10.1002/J.1550-8528.1995.TB00462.X.
- Matthews, D. R. *et al.* (1985) 'Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man', *Diabetologia*. *Diabetologia*, 28(7), pp. 412–419. doi: 10.1007/BF00280883.
- McCracken, E., Monaghan, M. and Sreenivasan, S. (2018) 'Pathophysiology of the metabolic syndrome', *Clinics in dermatology*. *Clin Dermatol*, 36(1), pp. 14–20. doi: 10.1016/J.CLINDERMATOL.2017.09.004.
- Mersmann, H. J. and Hu, C. Y. (1987) 'Factors affecting measurements of glucose metabolism and lipolytic rates in porcine adipose tissue slices in vitro.', *Journal of animal science*, 64(1), pp. 148–64. doi: 10.2527/jas1987.641148x.
- Michaelidou, M., Pappachan, J. M. and Jeeyavudeen, M. S. (2023) 'Management of diabetes: Current concepts', *World journal of diabetes*. *World J Diabetes*, 14(4), pp. 396–411. doi: 10.4239/WJD.V14.I4.396.
- Montagner, A. *et al.* (2016) 'Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD', *Gut*. *Gut*, 65(7), pp. 1202–1214. doi: 10.1136/GUTJNL-2015-310798.

- Moriarty, P. M. *et al.* (2015) 'Efficacy and safety of alirocumab vs ezetimibe in statin-intolerant patients, with a statin rechallenge arm: The ODYSSEY ALTERNATIVE randomized trial', *Journal of clinical lipidology*. *J Clin Lipidol*, 9(6), pp. 758–769. doi: 10.1016/J.JACL.2015.08.006.
- Morigny, P. *et al.* (2016) 'Adipocyte lipolysis and insulin resistance', *Biochimie*. *Biochimie*, 125, pp. 259–266. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.10.024.
- Naiman, S. *et al.* (2019) 'SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPAR $\alpha$ ', *Cell reports*. *Cell Rep*, 29(12), pp. 4127–4143.e8. doi: 10.1016/J.CELREP.2019.11.067.
- NCEP (2001) 'Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 285(19), pp. 2486–2497. doi: 10.1001/jama.285.19.2486.
- Neacsu, O. *et al.* (2013) 'IGF-I attenuates FFA-induced activation of JNK1 phosphorylation and TNF $\alpha$  expression in human subcutaneous preadipocytes', *Obesity (Silver Spring, Md.)*. *Obesity (Silver Spring)*, 21(9), pp. 1843–1849. doi: 10.1002/OBY.20329.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2020) 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019', *Journal of natural products*. *J Nat Prod*, 83(3), pp. 770–803. doi: 10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285.
- Notartomaso, S. *et al.* (2022) 'Analgesic Activity of Cinnabarinic Acid in Models of Inflammatory and Neuropathic Pain', *Frontiers in molecular neuroscience*. *Front Mol Neurosci*, 15. doi: 10.3389/FNMOL.2022.892870.
- O'Neill, S. and O'Driscoll, L. (2015) 'Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies', *Obesity Reviews*, 16(1), pp. 1–12. doi: 10.1111/obr.12229.
- Olefsky, J. M. and Glass, C. K. (2010) 'Macrophages, inflammation, and insulin resistance', *Annual review of physiology*. *Annu Rev Physiol*, 72, pp. 219–246. doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021909-135846.
- Pan, Y. Y. *et al.* (2018) 'Effect of *Grifola frondosa* 95% ethanol extract on lipid metabolism and gut microbiota composition in high-fat diet-fed rats', *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 9(12), pp. 6268–6278. doi: 10.1039/C8FO01116H.

- Pappachan, J. M., Fernandez, C. J. and Chacko, E. C. (2019) 'Diabetes and antidiabetic drugs', *Molecular aspects of medicine*. Mol Aspects Med, 66, pp. 3–12. doi: 10.1016/J.MAM.2018.10.004.
- Patil, N. Y. *et al.* (2022) 'Cinnabarinic Acid Provides Hepatoprotection Against Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. J Pharmacol Exp Ther, 383(1), pp. 32–43. doi: 10.1124/JPET.122.001301.
- Peraldi, P. *et al.* (1996) 'Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase', *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 271(22), pp. 13018–13022. doi: 10.1074/JBC.271.22.13018.
- Petersen, M. C. and Shulman, G. I. (2017) 'Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance', *Trends in pharmacological sciences*. Trends Pharmacol Sci, 38(7), pp. 649–665. doi: 10.1016/J.TIPS.2017.04.004.
- Phan, B. A. P., Dayspring, T. D. and Toth, P. P. (2012) 'Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update', *Vascular health and risk management*. Vasc Health Risk Manag, 8(1), pp. 415–427. doi: 10.2147/VHRM.S33664.
- Polak, J. *et al.* (2016) 'Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties – the optimisation process', *New Biotechnology*. Elsevier, 33(2), pp. 255–262. doi: 10.1016/J.NBT.2015.09.004.
- Portincasa, P. *et al.* (2022) 'Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis', *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 23(3). doi: 10.3390/IJMS23031105.
- Radenković, M., Stojanović, M. and Prostran, M. (2016) 'Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, pp. 13–31. doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.004.
- Rajčević, N. *et al.* (2022) 'Interactions between Natural Products-A Review', *Metabolites*. Metabolites, 12(12). doi: 10.3390/METABO12121256.
- Rech, G. *et al.* (2020) 'Lipid-lowering effect of Pinus sp. sawdust and Pycnoporus sanguineus mycelium in streptozotocin-induced diabetic rats', *Journal of Food Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1111/jfbc.13247.
- Reiner, Ž. (2013) 'Managing the residual cardiovascular disease risk associated with HDL-cholesterol and triglycerides in statin-treated patients: a clinical update', *Nutrition*,

*metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 23(9), pp. 799–807. doi: 10.1016/J.NUMECD.2013.05.002.

Ridaura, V. K. *et al.* (2013) 'Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice', *Science (New York, N.Y.)*. Science, 341(6150). doi: 10.1126/SCIENCE.1241214.

Rocha, D. M. *et al.* (2016) 'Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response', *Atherosclerosis*. Atherosclerosis, 244, pp. 211–215. doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2015.11.015.

Rohm, T. V. *et al.* (2022) 'Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders', *Immunity*. Immunity, 55(1), pp. 31–55. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2021.12.013.

Rohr, M. W. *et al.* (2020) 'Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review', *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. Adv Nutr, 11(1), pp. 77–91. doi: 10.1093/ADVANCES/NMZ061.

Romero-Córdoba, S. L. *et al.* (2021) 'Mexican ganoderma lucidum extracts decrease lipogenesis modulating transcriptional metabolic networks and gut microbiota in C57BL/6 mice fed with a high-cholesterol diet', *Nutrients*, 13(1), pp. 1–24. doi: 10.3390/nu13010038.

Ruscitti, P. *et al.* (2019) 'IL-1 inhibition improves insulin resistance and adipokines in rheumatoid arthritis patients with comorbid type 2 diabetes: An observational study', *Medicine*. Medicine (Baltimore), 98(7). doi: 10.1097/MD.00000000000014587.

Saad, M. J. A., Santos, A. and Prada, P. O. (2016) 'Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance', *Physiology (Bethesda, Md.)*. Physiology (Bethesda), 31(4), pp. 283–293. doi: 10.1152/PHYSIOL.00041.2015.

Saklayen, M. G. (2018) 'The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome', *Current Hypertension Reports*. Current Medicine Group LLC 1, 20(2), p. 12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.

Saltiel, A. R. and Olefsky, J. M. (2017) 'Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 127(1), pp. 1–4. doi: 10.1172/JCI92035.

Samuel, V. T. and Shulman, G. I. (2016) 'The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 126(1), pp. 12–22. doi: 10.1172/JCI77812.

Sawai, H. and Hannun, Y. A. (1999) 'Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses', *Chemistry and physics of lipids*. Chem Phys Lipids,

- 102(1–2), pp. 141–147. doi: 10.1016/S0009-3084(99)00082-1.
- Scheithauer, T. P. M. *et al.* (2020) 'Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes', *Frontiers in immunology*. Front Immunol, 11. doi: 10.3389/FIMMU.2020.571731.
- Sims, E. K. *et al.* (2021) '100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy', *Nature medicine*. NIH Public Access, 27(7), p. 1154. doi: 10.1038/S41591-021-01418-2.
- Smânia, A. *et al.* (2003) 'Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr', *Phytotherapy Research*, 17(9), pp. 1069–1072. doi: 10.1002/ptr.1304.
- Smânia, E. de F. A., Smânia Júnior, A. and Loguercio-Leite, C. (1998) 'Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products', *Revista de Microbiologia*. SBM, 29(4), pp. 317–320. doi: 10.1590/S0001-37141998000400017.
- Steinmetz, K. L. (2002) 'Colesevelam hydrochloride', *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. Am J Health Syst Pharm, 59(10), pp. 932–939. doi: 10.1093/AJHP/59.10.932.
- Stich, V. *et al.* (1997) 'Adipose Tissue Lipolysis and Hormone-Sensitive Lipase Expression during Very-Low-Calorie Diet in Obese Female Identical Twins<sup>1</sup>', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(3), pp. 739–744. doi: 10.1210/jcem.82.3.3793.
- Strackowski, M. *et al.* (2002) 'Increased plasma-soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 2 level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects', *Diabetes care*. Diabetes Care, 25(10), pp. 1824–1828. doi: 10.2337/DIACARE.25.10.1824.
- Stroes, E. S. G. *et al.* (2018) 'Omega-3 carboxylic acids in patients with severe hypertriglyceridemia: EVOLVE II, a randomized, placebo-controlled trial', *Journal of clinical lipidology*. J Clin Lipidol, 12(2), pp. 321–330. doi: 10.1016/J.JACL.2017.10.012.
- Subramaniam, S. *et al.* (2020) 'The medicinal mushroom ganoderma neo-japonicum (Agaricomycetes) from malaysia: Nutritional composition and potentiation of insulin-like activity in 3t3-I1 cells', *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(1), pp. 65–78. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020033250.
- Sullivan, G. and Henry, E. D. (1971) 'Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in the genus *pycnoporus*', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(7), pp.

1097–1098. doi: 10.1002/jps.2600600725.

Takeuchi, K. *et al.* (1994) 'Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats', *Digestive Diseases and Sciences*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 39(3), pp. 626–634. doi: 10.1007/BF02088352.

Tang, J. *et al.* (2021) 'Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway', *International immunopharmacology*. *Int Immunopharmacol*, 91. doi: 10.1016/J.INTIMP.2020.107272.

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R. (2006) 'Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:2. Nature Publishing Group, 7(2), pp. 85–96. doi: 10.1038/nrm1837.

Templeman, N. M. *et al.* (2017) 'A causal role for hyperinsulinemia in obesity', *The Journal of endocrinology*. *J Endocrinol*, 232(3), pp. R173–R183. doi: 10.1530/JOE-16-0449.

Tvrzicka, E. *et al.* (2011) 'Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions', *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155(2), pp. 117–130. doi: 10.5507/BP.2011.038.

Ugwu, D. I. *et al.* (2018) 'Novel Phenoxazinones as potent agonist of PPAR- $\alpha$ : design, synthesis, molecular docking and in vivo studies', *Lipids in Health and Disease*, 17(1), p. 120. doi: 10.1186/s12944-018-0764-y.

Uysal, K. T. *et al.* (1997) 'Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function', *Nature*. *Nature*, 389(6651), pp. 610–614. doi: 10.1038/39335.

Vogt, É. L. *et al.* (2021) 'Metabolic and molecular subacute effects of a single moderate-intensity exercise bout, performed in the fasted state, in obese male rats', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI, 18(14), p. 7543. doi: 10.3390/IJERPH18147543/S1.

De Vos, W. M. *et al.* (2022) 'Gut microbiome and health: mechanistic insights', *Gut*. *Gut*, 71(5), pp. 1020–1032. doi: 10.1136/GUTJNL-2021-326789.

Wang, C. *et al.* (2021) 'Coumarin-rich *Grifola frondosa* ethanol extract alleviate lipid metabolism disorders and modulates intestinal flora compositions of high-fat diet rats', *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 85. doi: 10.1016/J.JFF.2021.104649.

- Weisberg, S. P. *et al.* (2003) 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 112(12), pp. 1796–1808. doi: 10.1172/JCI19246.
- Wen, H. *et al.* (2011) 'Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling', *Nature immunology*. Nat Immunol, 12(5), pp. 408–415. doi: 10.1038/NI.2022.
- Wendel, A. A. *et al.* (2013) 'Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)-1, but not GPAT4, incorporates newly synthesized fatty acids into triacylglycerol and diminishes fatty acid oxidation', *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 288(38), pp. 27299–27306. doi: 10.1074/JBC.M113.485219.
- Wharton, S. *et al.* (2020) 'Obesity in adults: A clinical practice guideline', *CMAJ*. Canadian Medical Association, 192(31), pp. E875–E891. doi: 10.1503/CMAJ.191707/TAB-RELATED-CONTENT.
- White, M. F. (2002) 'IRS proteins and the common path to diabetes', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 283(3). doi: 10.1152/AJPENDO.00514.2001.
- Wong, S. K. *et al.* (2016) 'Animal models of metabolic syndrome: a review', *Nutrition & Metabolism*. BioMed Central, 13(1), p. 65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
- Wredenberg, A. *et al.* (2006) 'Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(1), pp. 202–207. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.029.
- Xie, C. *et al.* (2012) 'Ezetimibe blocks the internalization of NPC1L1 and cholesterol in mouse small intestine', *Journal of lipid research*. J Lipid Res, 53(10), pp. 2092–2101. doi: 10.1194/JLR.M027359.
- Yazıcı, D. and Sezer, H. (2017) 'Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity', *Advances in experimental medicine and biology*. Adv Exp Med Biol, 960, pp. 277–304. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5\_12.
- Yu, H. *et al.* (2016) 'Berberine is a potent agonist of peroxisome proliferator activated receptor alpha.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 21, pp. 1052–60. doi: 10.2741/4440.
- Yu, W.-Q. *et al.* (2021) 'Polysaccharide CM1 from *Cordyceps militaris* hinders adipocyte differentiation and alleviates hyperlipidemia in LDLR<sup>(+/-)</sup> hamsters', *Lipids in Health and Disease*, 20(1). doi: 10.1186/s12944-021-01606-6.
- Zhang, S. *et al.* (2023) 'The structural characteristics of dietary fibers from *Tremella*

- fuciformis and their hypolipidemic effects in mice', *Food Science and Human Wellness*. Elsevier B.V., 12, pp. 503–511. doi: 10.1016/J.FSHW.2022.07.052.
- Zhang, Y. and Chua, S. (2017) 'Leptin Function and Regulation', *Comprehensive Physiology*. Compr Physiol, 8(1), pp. 351–369. doi: 10.1002/CPHY.C160041.
- Zheng, H. *et al.* (2016) 'Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications', *Biochemistry insights*. Biochem Insights, 9, p. BCI.S36141. doi: 10.4137/BCI.S36141.
- Zheng, Y., Ley, S. H. and Hu, F. B. (2018) 'Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications', *Nature reviews. Endocrinology*. Nat Rev Endocrinol, 14(2), pp. 88–98. doi: 10.1038/NREND0.2017.151.
- Zhu, Z. *et al.* (2020) 'Effect of berberine on LPS-induced expression of NF- $\kappa$ B/MAPK signalling pathway and related inflammatory cytokines in porcine intestinal epithelial cells', *Innate immunity*. Innate Immun, 26(7), pp. 627–634. doi: 10.1177/1753425920930074.

## ANEXO I



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35657

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERLIPÍDICA DO EXTRATO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS E DA CINABARINA SOBRE O METABOLISMO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AOS MODELOS DE DIABETES OU SÍNDROME METABÓLICA

Vigência: 01/08/2018 à 31/07/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - coordenador desde 01/08/2018  
DEBORA SANTOS ROCHA - Aluno de Doutorado desde 01/08/2018  
RENATA VICTÓRIA DA CRUZ OHLWEILER - Aluno de Especialização desde 01/08/2018  
Maíza Cristina Von Dentz - Aluno de Doutorado desde 01/08/2018

Equipe Externa:

MATHEUS PARMEGIANI JAHN - pesquisador desde 01/08/2018  
MARLI CAMASSOLA - pesquisador desde 01/08/2018

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 03/12/2018 - Sala 323 - Anexo I do prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos Wistar com 83 dias de vida para o experimento 1, e 96 ratos Wistar com 23 dias de vida para o experimento 2, todos provenientes do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 14 de Dezembro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

## ANEXO II

### BJMBR - 13320 is now in your Admin Center



De Journal Office <onbehalfof@manuscriptcentral.com>  
Para <maiza.dentz@ufrgs.br>  
Responder p... <bjournal@terra.com.br>  
Data 2023-10-02 16:28

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is an OPEN-ACCESS journal. Articles published in the BJMBR are available only online in pdf.

\*\*\*\*\*

Dear Dr. Ms. Von Dentz,

On 02-Oct-2023, your manuscript entitled "Treatment with the mushroom *Pycnoporus sanguineus* extract increases progression of Metabolic Syndrome effects in Wistar rats" by Von Dentz, Maiza; Vogt, Éverton; Rocha, Débora; Model, Jorge; Ohlweiler, Renata; de Amaral, Marjoriane; Silveira, Diane; Maschio, Jéssica; Fontana, Roselei; Camassola, Marli; Rodrigues, Eliseu; Jahn, Matheus; Kucharski, Luiz was received.

Your manuscript has been assigned the number: 13320.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Author Center" link under the following URL:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmb-r-scielo>  
(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your paper to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Sincerely yours,

Journal Office  
Brazilian Journal of Medical and Biological Research

