



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Izabelle Barcellos Santos

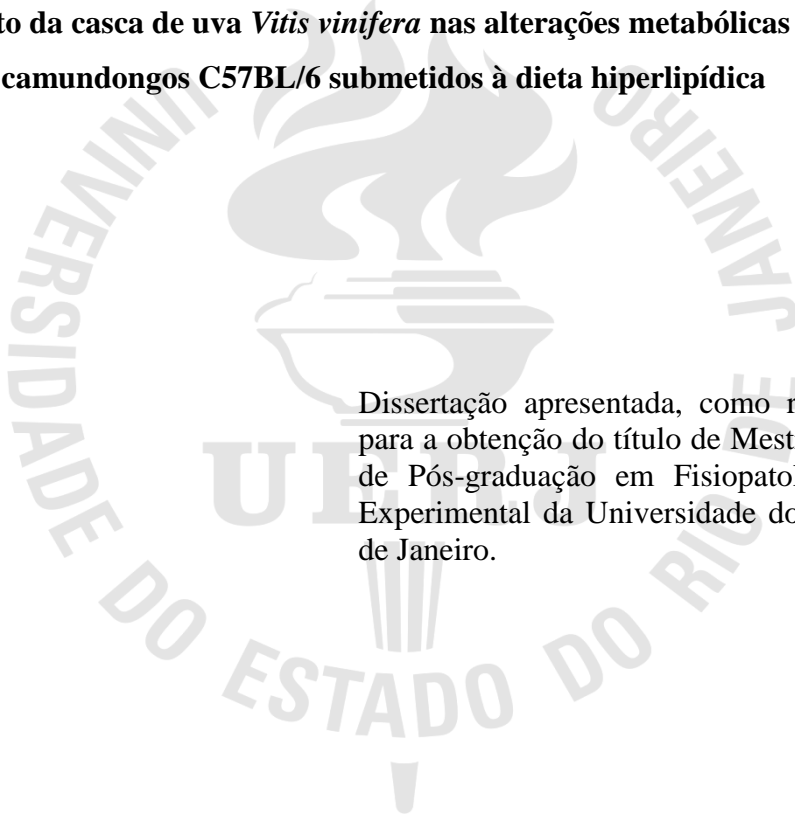
Efeito do extrato da casca de uva *Vitis vinifera* nas alterações metabólicas hepáticas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro

2015

Izabelle Barcellos Santos

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis vinifera* nas alterações metabólicas hepáticas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Angela de Castro Resende

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos, Izabelle Barcellos.
Efeito do extrato da casca de uva *Vitis vinifera* nas alterações metabólicas hepáticas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica/ Izabelle Barcellos Santos. – 2015.
83 f.

Orientadora: Angela de Castro Resende.

Coorientador: Roberto Soares de Moura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Uva - Uso terapêutico - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Fígado gorduroso - Teses. 4. Dieta Hiperlipídica - Efeitos adversos. I. Resende, Angela de Castro. II. Moura, Roberto Soares de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 634.8:615.244

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Izabelle Barcellos Santos

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis vinifera* nas alterações metabólicas hepáticas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2015.

Orientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Cristiane Matsuura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof. Dra. Isis Hara Trevenzoli

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente ao autor da minha vida que é o Senhor Jesus, à minha família querida, em especial à minha mãe, pai e irmãzinha, por me ajudarem tanto nesta caminhada,

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Senhor Jesus por estar comigo em todos os momentos da minha vida, por me fortalecer nas horas mais difíceis e pela sabedoria concedida durante toda a minha caminhada. Meu amor por Ti, Senhor, é incansável. Tu és o Dono dos meus dias!!

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr.^a. Ângela de Castro Resende por ter confiando a mim um projeto de uma grande relevância, e me fazer ser apaixonada por ele, um obrigada enorme por sempre estar ao meu lado, pela sua amizade e carinho, por sempre me ouvir, por sempre me incentivar a querer crescer sempre mais. Seus conhecimentos e experiências foram e serão sempre fundamentais e essenciais pra minha caminhada.

Agradeço ao meu Coorientador, Professor Dr. Roberto Soares de Moura pela amizade, por ter confiando em meu trabalho e dedicação, pelo carinho e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos meus lindos pais (Valfredo Alves Santos e Sandra Lúcia Barcellos), pela confiança, amor, carinho, conselhos, compreensão, dedicação e por sempre me incentivarem a estudar para ser uma pessoa cada dia melhor. Obrigada por existirem em minha vida. Vocês são tudo que tenho de mais precioso e especial. Meu amor por vocês vai além do infinito!

À minha linda irmã (Danielle Barcellos) por ser o meu maior exemplo, por sempre confiar e apoiar as minhas escolhas, por cuidar de mim em todos os momentos da minha vida. Meu amor por você é maior que o universo!

Às minhas amiguinhas da Universidade Veiga de Almeida Adriana, Gláucia, Cátia e Janaina por estarem presente na minha vida durante os cinco anos de faculdade sempre acreditando em mim e principalmente nos meus sonhos.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Lúcia Alves, Grazielle Fretas de Bem, Paola Raquel Braz de Oliveira, Dayane Teixeira Ognibene, Cristiane Aguiar da Costa, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Ana Paula Machado da Rocha, Anicet Okinga, Julio Beltrame, Giselle França, Ricardo Andrade, Douglas, As lindas e queridas alunas do Professor Julio Beltrame (Elisa, Elaine, Thaisa e Renatinha) pela amizade, pela colaboração e pelo apoio durante o mestrado.

Um agradecimento mais que especial às amigas Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, por sempre estar ao meu lado e pelos lindos e abençoados conselhos de mãe, Lúcia Alves (Santinha), por sempre ser tão carinhosa e dividir suas laranjas comigo (risos). Cristiane Aguiar da Costa, por ser mais que uma grande amiga, você tem um lugar especial em meu

coração, obrigada por sempre estar ao meu lado, por todo companheirismo e dedicação, amo nossas altas conversas pelo telefone (risos), obrigada por ser um lindo exemplo pra mim, te amo minha linda Flor, você tem um lindo coração e sei que posso confiar em você. Paola Raquel Braz de Oliveira, minha linha amiga obrigada pelo apoio e compreensão e por confiar e acreditar que eu posso sempre ir mais além. Viviane Cristino (Vivi's), obrigada amiga por sempre estar ao meu lado, por querer o meu bem e principalmente o meu crescimento, obrigada por sempre estar pronta em me ajudar, Obrigada pelas conversas sempre produtivas e por ter um coração muito bom, Você é especial amiga! Graziele Freitas de Bem, obrigada amiguinha por sempre estar ao meu lado, por todas as conversas, desabafos, conselhos, companheirismo, risadas... obrigada por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos, você um exemplo pra mim em que eu me espelho sempre... Você é mais que especial!! Anicet Okinga, você é um amigo que Deus colocou em minha vida! Seus conselhos sempre produtivos e vindos do coração de Deus me fazem acreditar ainda mais que existem milagres e prodígios vindos do coração do nosso Senhor! Obrigada por sempre estar ao meu lado! Amo-te! Giselle França (Gigi), obrigada primeiramente por ter me apresentado ao laboratório de Farmacologia e plantas medicinais, obrigada por sempre estar pronta em me ajudar, seus conselhos sempre são bem vindos, sua alegria é sempre contagiante pra mim, morro de rir com suas brincadeiras, e muito obrigada por todo conhecimento!! Amigos vocês são mais que especiais!

Agradeço à Professora Cristiane Matsuura por todo carinho e apoio.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Fisiologia Clínica e Experimental por me proporcionarem conhecimento, pela colaboração e apoio em minha formação.

Agradeço aos órgãos responsáveis pelo financiamento e concessão de bolsa para a realização desse projeto de pesquisa FAPERJ, CAPES e CNPQ.

A todos, o meu muito obrigado, vocês foram essenciais para que eu pudesse alcançar mais uma etapa importante de minha vida.

Por que o Senhor é bom, e eterna a sua misericórdia; e a sua verdade dura de geração
em geração.

Bíblia Sagrada – Salmos 100

RESUMO

Santos, Izabelle Barcellos Santos. **Efeito do extrato da casca de uva *Vitis vinifera* nas alterações metabólicas hepáticas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A prevalência da obesidade nas últimas décadas tem mostrado rápida ascensão em todo o mundo e é considerado um importante problema de saúde pública. Estudos recentes do nosso grupo mostraram que o extrato hidroalcoólico da casca de uva *Vitis vinifera* (ACH09) rico em polifenóis diminui a glicemia no modelo experimental de diabetes induzida por aloxano, e aumenta a expressão de proteínas da cascata de sinalização de insulina no músculo esquelético. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos benéficos do tratamento preventivo com ACH09 em distúrbios metabólicos hepáticos observados num modelo experimental de obesidade. Camundongos machos C57BL/6 de 30 dias de idade foram separados em 4 grupos e receberam as seguintes dietas por 12 semanas: grupo Controle: dieta padrão; grupo ACH09: dieta padrão + ACH09 200 mg/kg/dia oral; grupo hiperlipídico (HF): dieta com 60% de gordura e o grupo hiperlipídico + ACH09 (HF+ACH09): dieta com 60% de gordura + ACH09 200 mg/kg/dia oral. Foram avaliados: a ingestão alimentar, a massa corporal, a massa de gordura visceral, os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, glicose e insulina, e os níveis hepáticos de colesterol, triglicerídeos, glicogênio e nitrito. A expressão do receptor de insulina (IR), PI3-K, pAKT, Glut 2, proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e colesterol (AMPK, pAMPK, HMG-CoA redutase, FAS, SREBP-1c, pACC), bem como a expressão de proteínas envolvidas na excreção de colesterol (transportadores ABCG5 e ABCG8) foram avaliadas em homogenatos de fígado por western blotting. O dano oxidativo hepático foi determinado também, através da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, e a atividade das enzimas antioxidantes (SOD), (CAT) e (GPx) foi avaliada por espectrofotometria. No grupo HF houve aumento da ingestão alimentar, do peso corporal, da massa de gordura visceral, do colesterol e triglicerídeo plasmático e hepático associado ao desenvolvimento de esteatose hepática que foram reduzidos pelo tratamento com o ACH09. Os níveis plasmáticos de glicose e resistência à insulina foram aumentados no HF e reduzidos pelo tratamento com ACH09. Esses achados correlacionaram com a redução da expressão das proteínas da cascata de sinalização de insulina no grupo HF e aumento pelo tratamento com ACH09. O conteúdo de glicogênio hepático foi reduzido no HF e aumentado no grupo HF+ACH09. O aumento da lipogênese no grupo HF foi caracterizado pelo aumento da expressão das proteínas SREBP-1c e AMPK e redução das proteínas pAMPK e pACC sem alteração da HMG-CoA redutase e FAS. O tratamento com ACH09 reduziu a expressão de SREBP-1c e aumentou a expressão de pAMPK sem alterar a expressão de pACC. Além disso, o ACH09 aumentou a expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 e apresentou um efeito antioxidante em tecido hepático ao diminuir a formação de malondialdeído e a carbonilação de proteínas e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. Em conclusão, o ACH09 pode modular a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina, assim como, as envolvidas na via da lipogênese, e na excreção do colesterol prevenindo o desenvolvimento da esteatose hepática. A síntese de NO, a ação antioxidante e o aumento da sensibilidade à insulina devem exercer um papel central nos efeitos do ACH09.

Palavras Chave: Obesidade; esteatose hepática; extrato da casca da uva (ACH09).

ABSTRACT

Santos, Izabelle Barcellos. **Grape skin extract effect *Vitis vinifera* in liver metabolic changes in C57BL / 6 mice subjected to high fat diet.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The prevalence of obesity over the past decades has shown rapid rise worldwide and is considered an important public health problem. Recent studies from our group have shown that the hydro-alcoholic grape skin extract (ACH09) rich in polyphenols lowers blood glucose in experimental model of diabetes induced by alloxan, and increases the expression of the insulin signaling cascade proteins in skeletal muscle. Thus, the aim of this study was to evaluate the beneficial effects of preventive treatment with ACH09 on metabolic disorders observed in an experimental model of obesity. Male mice C57BL/6 at 30 days of age were separated in four groups and received the following diets for 12 weeks. The Control group: standard diet; ACH09 group: standard diet + 200 mg/kg/day orally; hyperlipidic group (HF): diet with 60% fat and hyperlipidic group + ACH09 (HF + ACH09): diet with 60% fat + 200 mg/kg/day orally. We also determined the food intake, body weight, the mass of visceral fat, plasma levels of total cholesterol, triglycerides, glucose and insulin, and hepatic levels of cholesterol, triglycerides, glycogen and nitrite. Expression of insulin receptor (IR), PI3-K, pAKT, Glut 2, proteins involved in the synthesis of fatty acids and cholesterol (AMPK, pAMPK, HMG-CoA reductase, FAS, SREBP-1c, pACC), as well as the expression of proteins involved in the excretion of cholesterol (ABCG5 and ABCG8 transporters) were evaluated in liver homogenates by western blotting. Hepatic oxidative damage was also determined by lipid peroxidation and carbonyl protein, and the antioxidant enzyme activities (SOD), (CAT) and (GPx) were evaluated by spectrophotometry. was increased, The food intake, body weight and the mass of visceral fat were increased in the HF group, as well as, the plasma and liver cholesterol and triglycerides associated with the development of hepatic steatosis which were reduced by treatment with ACH09. Plasma levels of glucose and insulin resistance were increased in HFgroup and reduced by treatment with ACH09. These findings correlated with reduced expression of insulin signaling cascade proteins in the HF group and increased by treatment with ACH09. The liver glycogen content was reduced HF in and increased in HF+ ACH09. Increased lipogenesis in the HF group was characterized by the increased expression of SREPB-1c and AMPK proteins and reduction of pAMPK and pACC proteins without changing the HMG-CoA reductase and FAS expressions. The treatment with ACH09 reduced the expression of protein-1c SREPB and increased pAMPK expression without changing pACC. Moreover, the extract ACH09 increased the expression of ABCG5 and ABCG8 transporters and showed an antioxidant effect in hepatic tissue by decreasing the formation of malondialdehyde and carbonyl protein and increasing the antioxidant activities enzymes. In conclusion, the ACH09 can modulate the expression of the insulin signaling pathway proteins, as well as the proteins involved in lipogenesis, and excretion of cholesterol preventing the development of hepatic steatosis. The synthesis of NO, the antioxidant action and the increase in insulin sensitivity may exert a central role in ACH09 effects.

Keywords: obesity; hepatic steatosis; grape skin extract (ACH09).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Regulação do metabolismo da glicose no fígado	19
Figura 2	Regulação do metabolismo de lipídeos no fígado	22
Figura 3	Via da síntese de colesterol e ácidos graxos	25
Figura 4	Diagrama demonstrando como a redução univalente do oxigênio, na presença de um elétron livre, forma O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$	28
Figura 5	Uva <i>Vitis vinífera</i>	30
Quadro 1	Classificação científica da uva <i>Vitis vinífera</i>	31
Figura 6	Perfil de HPLC a partir de extrato da casca da uva (ACH09)	32
Quadro 2	Composição das dietas padrão e hiperlipídica.....	36
Figura 7	Camundongo C57BL/6	37
Figura 8	Figura esquemática representando a contagem de pontos através do sistema de 36 pontos-teste	45
Figura 9	Ingestão alimentar	46
Figura 10	Peso corporal	47
Figura 11	Massa de gordura visceral	48
Figura 12	Peso e volume do fígado	49
Figura 13	Glicemia	50
Figura 14	- Resistência à insulina	51
Figura 15	Conteúdo de glicogênio hepático	52
Figura 16	Perfil lipídico e hepático	53
Figura 17	Expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido hepático	55
Figura 18	Expressão das proteínas SREBP1-c, pACC, FAS no tecido hepático	57
Figura 19	Expressão das proteínas AMPK, pAMPK e HMG-CoAr no tecido hepático ..	59
Figura 20	Expressão das proteínas envolvidas na excreção de colesterol no tecido hepático	60
Figura 21	Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no tecido hepático	61
Figura 22	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e os níveis de nitrito no tecido hepático	62
Figura 23	Efeito do tratamento com ACH09 sobre a esteatose hepática	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG5	ATP – Binding Cassete Transporter Tipo G5
ABCG8	ATP – Binding Cassete Transporter Tipo G8
ACC	Acetil- CoA carboxilase
ACH09	Extrato da Casca de Uva
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CT	Colesterol total
CYP7A1	Colesterol-7-alfa-hidrolase
DCV	Doença cardiovascular
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Ácido graxo sintase
GLUT	Transportador de glicose
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutationa peroxidase
GSE	Extrato da casca de uva

GSH	Glutathiona
GSK3	Glicogênio- sintase- quinase 3
GTP	Guanosina trifosfato
HF	Grupo hiperlipídico
HF+ACH09	Grupo hiperlipídico + ACH09
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HF	Alto teor de gordura
HMG CoAr	3-hidróxi-3-metil-guataril CoA redutase
HOMA	Modelo de avaliação da homeostase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IR	Receptor da insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LP	Lipoproteínas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitôgeno
MDA	Malondialdeído
NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
O ₂	Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde

PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
pACC	Acetil- CoA carboxilase fosforilada
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
pAMPK	Proteína quinase ativada por AMP fosforilada
PI3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
pIRS	Substrato do receptor da insulina fosforilado
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR	Receptor ativado por proliferadores do peroxissoma
RI	Resistência à insulina
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido desmutase
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBESIDADE	16
1.1	Insulina e resistência à insulina	18
1.2	Alterações hepáticas associadas à obesidade	21
1.3	Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial hepática	26
1.4	Modelo experimental de obesidade	28
1.5	Polifenóis e o extrato-hidroalcoólico da casca da uva <i>Vitis vinifera</i> (ACH09).	29
2	OBJETIVO	34
2.1	Geral	34
2.2	Específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Obtenção do extrato hidro-alcoólico da casca da uva <i>Vitis Vinifera</i>	35
3.2	Animais utilizados e modelo experimental	35
3.3	Ingestão alimentar e massa corporal	37
3.4	Medida da massa de gordura visceral	37
3.5	Medidas do Peso e Volume do Fígado	38
3.6	Análises bioquímicas	38
3.6.1	<u>Glicemia de jejum</u>	38
3.6.2	<u>Insulina</u>	38
3.6.3	<u>Análise da sensibilidade à insulina</u>	38
3.6.4	<u>Perfil lipídico</u>	39
3.7	Medida de glicogênio hepático	39
3.8	Ensaio pró-oxidantes	39
3.8.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</u>	39
3.8.2	<u>Carbonilação de proteína</u>	40
3.9	Atividade das enzimas antioxidantes	41
3.9.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	41
3.9.2	<u>Medida da catalase</u>	41
3.9.3	<u>Medida da glutatona peroxidase</u>	42
3.10	Medida de nitrito	42
3.11	Análise da expressão de proteínas por Western Blotting	43

3.12	Histologia do fígado	44
3.12.1	<u>Análise morfológica do fígado</u>	44
3.13	Análises estatísticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Ingestão alimentar	46
4.2	Peso corporal	47
4.3	Massa de gordura visceral	48
4.4	Peso e Volume do fígado	48
4.5	Glicemia	49
4.6	Resistência à insulina	50
4.7	Conteúdo de glicogênio hepático	51
4.8	Perfil lipídico plasmático e hepático	52
4.9	Expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido hepático	54
4.10	Expressão das proteínas SREBP1-c, pACC, FAS no tecido hepático	56
4.11	Expressão das proteínas AMPK, pAMPK e HMG-CoAr no tecido hepático	58
4.12	Expressão das proteínas envolvidas na excreção de colesterol no tecido hepático	60
4.13	Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no tecido hepático	61
4.14	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e os níveis de nitrito no tecido hepático	62
4.15	Efeito do tratamento com ACH09 sobre a esteatose hepática	63
5	DISCUSSÃO	65
	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

INTRODUÇÃO

A civilização passou por grandes mudanças no estilo de vida nos últimos séculos, e os hábitos da cultura humana moderna, tais como alimentação inadequada e sedentarismo contribuíram para o aumento da prevalência de diversas doenças como: hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), certos tipos de câncer, dentre outras, sendo a obesidade o principal fator de risco que gera o quadro de síndrome metabólica (SM) (Cataneo *et al.*, 2005).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde revelam que, pela primeira vez, o percentual de pessoas com excesso de peso é superior a mais da metade da população brasileira. A pesquisa Vigitel 2012 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) mostra que 51% da população (acima de 18 anos) está acima do peso ideal. Em 2006, o índice era de 43%. Entre os homens, o excesso de peso atinge 54% e entre as mulheres, 48% (Ministério da Saúde, 2013).

A importância na prevenção e tratamento da obesidade tem sido muito discutida e reconhecida (WHO, 2003), e a identificação dos fatores de risco modificáveis, como mudança nos hábitos alimentares com a ingestão de alimentos mais saudáveis para o controle de peso e práticas de exercícios físicos vem adquirindo grande relevância entre as populações mais obesas (Sartorelli & Franco, 2003).

1 OBESIDADE

A obesidade representa um sério problema de saúde pública na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento por aumentar o risco de aparecimento de uma série de condições patológicas, incluindo a resistência à insulina (RI), DM2, dislipidemia, HAS e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)(Jung & Choi, 2014).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2008-2009), realizada em parceria entre o IBGE e o Ministério da Saúde, analisando dados de 188 mil brasileiros em todas as idades, mostrou que a obesidade e o sobrepeso têm aumentado rapidamente nos últimos anos. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres se encontram com excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade(Nunes, 2010).

As estimativas da OMS são ainda mais alarmantes, considerando a obesidade como uma epidemia e um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo. As projeções para 2030 estimam um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou seja, 57,8% da população adulta mundial terão sobrepeso ou obesidade, um terço desses nos países em desenvolvimento (Knowler *et al.*, 2002).

A origem da obesidade é multifatorial, ou seja, diversos fatores estão envolvidos em sua gênese, incluindo fatores genéticos, metabólicos e ambientais. O baixo gasto energético aliado àsmudanças significativas nos hábitos alimentares, marcadas pelo aumento de lipídios na dieta, contribui significativamente para o aumento da incidência da obesidade (Romero & Zanesco, 2006). O excesso de lipídios acarreta de forma mais precoce este desequilíbrio, levando a um remodelamento adverso do tecido adiposo(Keller & Lemberg, 2003), reforçando a demonstração de outro grupo de que a dieta hiperlipídica está diretamente relacionada com a indução da obesidade(Dindo *et al.*, 2003).

O tecido adiposo não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas pode ser considerado como um órgão endócrino. Como tal, desempenha um papel central no metabolismo de lipídeos e da glicose e produz um grande número de adipocinas, tais como: adiponectina, leptina, resistina, visfatina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), inibidor do ativador de plasminogênio -1 (PAI-1) e angiotensinogênio, que podem influenciar profundamente os processos metabólicos e participam da inflamação e da resposta do sistema imune, além de serem sensores do balanço energético(Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

Grande atenção tem sido dada à adiponectina e leptina na obesidade. A leptina é um peptídeo produzido principalmente pelo tecido adiposo branco e secretada na circulação em níveis proporcionais à massa desse tecido (Reseland *et al.*, 2001). Atua em células neuronais no sistema nervoso central, onde desempenha um papel importante na sinalização entre o hipotálamo e o tecido adiposo, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, com isso, o peso corporal (Hutley & Prins, 2005).

Além da sua ação nas células neuronais do hipotálamo, a leptina possui uma sinalização parácrina e/ou autócrina sobre o adipócito. A leptina estimula a lipólise e inibe a lipogênese, mecanismo esse considerado protetor contra a adipotoxicidade provocada pelo excesso de triglicerídeos (Fruhbeck, 2002).

Na obesidade, observa-se um aumento dos níveis plasmáticos de leptina, a hiperleptinemia. Esse estado pode ser atribuído a alterações no receptor da leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte para o hipotálamo, fenômeno denominado resistência à leptina (Milanski *et al.*, 2009).

Outra adipocina chave que tem sido associada à obesidade é a adiponectina, que é secretada exclusivamente pelos adipócitos (Berg *et al.*, 2001). Essa, em contraste com outras adipocinas, apresenta níveis plasmáticos inversamente proporcionais aos índices de gordura corporal (Shetty *et al.*, 2009). O papel fisiológico da adiponectina não está completamente elucidado, mas sabe-se que ela apresenta-se como potente agente anti-inflamatório e atua de forma favorável sobre a regulação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (Kubota *et al.*, 2007). Estudos têm mostrado que a adiponectina não só aumenta a sensibilidade à insulina, pela ativação da quinase ativada por AMP (AMPK) resultando numa diminuição da glicemia e da produção de glicose pelo fígado, como também aumenta a oxidação lipídica diminuindo a deposição ectópica de gordura (Stefan *et al.*, 2002). Estudos mostram que em adipócitos de ratos, *in vitro*, uma redução de 60% na expressão de adiponectina resultou em um aumento significativo da RI (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

Por conseguinte, a resistência à leptina e a hipoadiponectinemia promovem níveis cronicamente elevados de ácidos graxos circulantes, com aumento da lipogênese, excesso de gordura central e maiores taxas de lipólise no tecido adiposo branco. Esse quadro amplifica diversos efeitos deletérios, como dislipidemias, esteatose hepática, falha na sinalização de insulina, ativação da gliconeogênese e hiperglicemia (van Raalte & Diamant, 2011).

1.1 Insulina e resistência à insulina

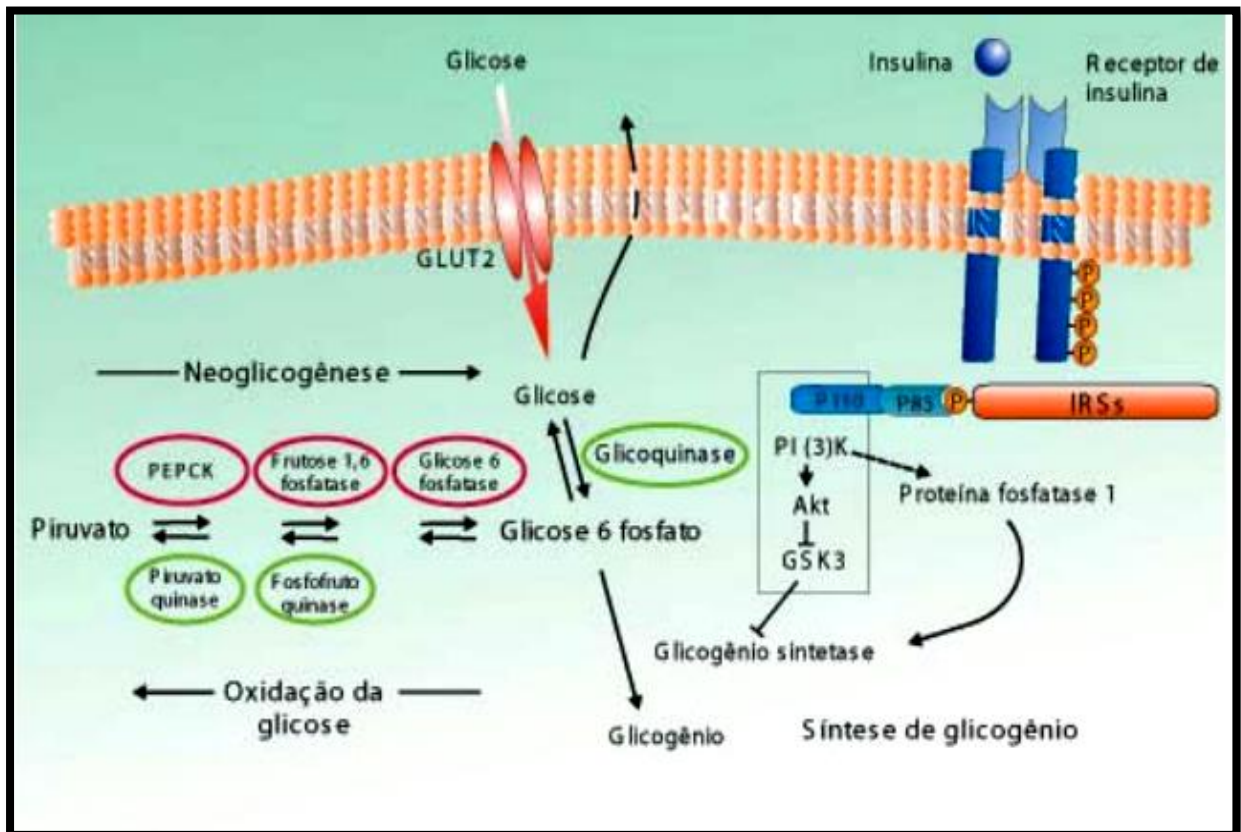
A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico e essencial para a manutenção da homeostase de glicose, agindo em vários tecidos periféricos, tais como, o fígado, o músculo, o coração e o tecido adiposo, promovendo aumento da captação de glicose sanguínea e da síntese proteica. Além disso, reduz a produção hepática de glicose, inibindo a via da gliconeogênese e glicogenólise; reduz a lipólise e a proteólise; estimula a lipogênese nos adipócitos e atua no crescimento e diferenciação celular, entre outros mecanismos (Kahn *et al.*, 2006).

A insulina é secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (Saltiel & Kahn, 2001). A captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo é realizada através do transportador GLUT4 e no fígado e pâncreas pelo transportador GLUT2, que são membros de uma família de proteínas integrais transportadoras de glicose (Thorens *et al.*, 1990). O GLUT2 promove a rápida saída e entrada de glicose no fígado e em células β do pâncreas. Isto se deve a altos valores de K_m , alta capacidade e baixa afinidade, detectando variações de concentração de glicose no sangue. Por isso, esse transportador é chamado de sensor de glicose e exerce importante função no controle das alterações na secreção de insulina estimulada pela glicose (Karim *et al.*, 2012).

Em vista da diversidade de ações e tecidos que a insulina atua, pode-se prever uma rede complexa de vias intracelulares de transmissão de sinais. Contudo, se destaca a via de sinalização PI3-K/AKT, essencial para o metabolismo glicídico regulado pela insulina (Boura-Halfon & Zick, 2009). A ação da insulina nas células é iniciada com a ligação específica ao seu receptor, uma grande lipoproteína de membrana formada por duas subunidades α e duas subunidades β , que formam um heterotetrâmero, denominado receptor de insulina (IR) (Van, 1994). Após a ligação da insulina à subunidade α extracelular, ocorre a fosforilação de uma das subunidades β por um domínio proteína tirosina quinase específico, presente na outra subunidade β do mesmo heterotetrâmero (Taniguchi *et al.*, 2006). A partir de então, ocorre a ativação de substratos proteicos intracelulares, iniciando uma cascata de fosforilação e desfosforilação que regulam sua ação (Saltiel & Kahn, 2001). Se a fosforilação ocorrer no resíduo tirosina, se dá uma ativação positiva, por outro lado, se a fosforilação for em resíduo de serina é de ação inibitória e modula negativamente a sinalização insulínica (Folli *et al.*, 2011).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforilavários substratos proteicos em tirosina, que pertencem à família dos substratos do receptor da insulina, as proteínas IRS-1 a IRS-4. Ossítios fosforilados em tirosinas específicas servem como locais de ancoragem para a subunidade regulatória p85 da proteína citosólica PI3-K, ativando a subunidade catalítica p110, que consequentemente estimula uma proteína serina/treonina quinase conhecida por AKT (Figura 1). Esta proteína estimula a captação de glicose por meio da translocação dos transportadores de glicose (GLUT) para a membrana e estimula a síntese de glicogênio (glicogênio sintasequinase 3 [GSK3]).

Figura 1 - Regulação do metabolismo da glicose no fígado



Nota: A insulina estimula a utilização e armazenamento de glicose como glicogênio e inibe a síntese dessa hexose e sua liberação.

Legenda: A insulina estimula a expressão de genes da via glicolítica (verde), enquanto inibe a aqueles que codificam enzimas da via da gliconeogênese (vermelho). A insulina também estimula a síntese de glicogênio através da inibição da GSK3 e proteína fosfatase 1 (Zecchin *et al.*, 2004).

Em condições anabólicas, a insulina promove o armazenamento de glicose na forma de glicogênio no músculo e fígado, através do aumento do transporte de glicose e da ativação da via de síntese de glicogênio (glicogênese)(Cross *et al.*, 1995). Esta via é regulada pela enzima glicogênio sintetase que permanece no estado inativo quando fosforilada por quinases como GSK3 (figura 1). A insulina torna essa via ativa, inibindo a atividade dessas quinases, e ativando a proteína fosfatase1(Brady *et al.*, 1997). Desta forma, a enzima glicogênio sintetase se mantém na sua forma ativa (desfosforilada), que resulta na produção de glicogênio(Saltiel & Kahn, 2001).Na gliconeogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição do gene que codifica a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle desse processo. O hormônio também diminui a taxa de transcrição do gene que codifica a frutose-1,6-bisfosfatase e a glicose 6fosfatase e aumenta a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicocinase e piruvatoquinase(Sutherland *et al.*, 1996). As vias de sinalização que regulam a transcrição desses genes envolvem a AKT e fatores de transcrição da família *forkhead* (FOXO), o coativador do PPAR γ (Yoon *et al.*, 2001).

A obesidade desempenha um papel central e aumenta a probabilidade de ocorrência de RI, sendo a prevalência de obesidade em portadores de DM2 entre 40 a 70% (Kotronen & Yki-Jarvinen, 2008; Tolman *et al.*, 2004).

A RI é definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina e isso significa uma menor ação da insulina não apenas no metabolismo dos carboidratos, como também seu papel no metabolismo dos lipídeos, sendo a marca da RI a hiperinsulinemia(Meerarani *et al.*, 2006; Nigro *et al.*, 2006). O estado RI pode ter início anos antes do diagnóstico de DM2 (Harris & Eastman, 2000). A hipertrofia das ilhotas e hipersecreção de insulina surge na tentativa de compensar o estado de resistência e promover valores normais de glicemia num primeiro momento. Entretanto, esse trabalho promove a deterioração progressiva das ilhotas de maneira que 50% da função das ilhotas pancreáticas já estão perdidas no momento do diagnóstico de hiperglicemia, momento em que a intolerância oral à glicose já está instalada(Reifsnyder & Leiter, 2002; Yoon *et al.*, 2003).

O aumento dos depósitos de tecido adiposo, um quadro frequentemente encontrado em obesos, faz com que os AGL circulantes sejam desviados e armazenados em órgãos sensíveis à insulina, tais como o fígado, o pâncreas e o músculo esquelético (Unger & Orci, 2000). Esse acúmulo ectópico de lipídios está envolvido na gênese da RI e no comprometimento da função das células beta-pancreáticas e hepáticas, efeito conhecido como lipotoxicidade(Savage *et al.*, 2001; Willner *et al.*, 2001).

A RI hepática está associada à diminuição da glicogênese e aumento da gliconeogênese e glicogenólise e pode desencadear a progressão de simples esteatose para esteato-hepatite ou fibrose por causar aumento na expressão do fator de crescimento conectivo, induzir o estresse oxidativo, estimular a proliferação de células estreladas hepáticas e a secreção de matriz extracelular (Paradis V, 2011).

1.2 Alterações hepáticas associadas à obesidade

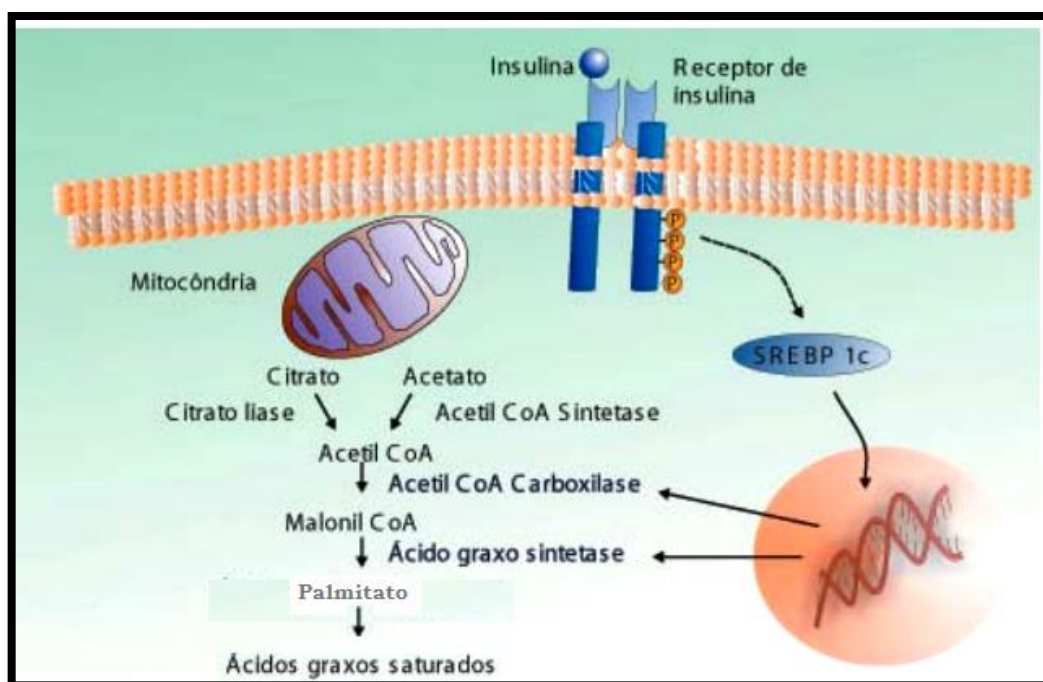
O fígado desempenha um papel central em desordens metabólicas relacionadas à obesidade (Turner *et al.*, 2011). A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida como uma condição clínico-patológica que inclui um amplo espectro de patologias hepáticas, variando desde uma esteatose hepática simples (acúmulo de lipídeos, principalmente TG no interior dos hepatócitos), podendo progredir para sua forma mais grave a esteato-hepatite não alcoólica (HENA) com potencial de evolução para fibrose, cirrose e suas consequentes complicações como o hepatocarcinoma havendo piora na qualidade de vida (Cotrim *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003b; Suzuki *et al.*, 2005). Aproximadamente 10–25% dos indivíduos com esteatose hepática desenvolvem HENA (Day, 2005; Harrison *et al.*, 2003a; Harrison *et al.*, 2003b).

A infiltração gordurosa no fígado que caracteriza a esteatose hepática é umas das alterações hepatocelulares mais frequentes no mundo ocidental (Ratziu *et al.*, 2000). E a sua prevalência aumentou substancialmente nos últimos 20 anos com a elevação nos índices de sobrepeso e obesidade na população em geral (Gogia & Neuschwander-Tetri, 2006).

Os fatores de risco estabelecidos para esteatose hepática correspondem àqueles da síndrome metabólica, que incluem a obesidade (grande quantidade de gordura abdominal), RI, dislipidemia, apneia obstrutiva do sono, fatores genéticos, deficiência de vitamina D (Targher *et al.*, 2007) e outras deficiências nutricionais (Lazo & Clark, 2008). A gordura visceral está relacionada com a severidade da esteatose hepática, independente da RI. Não há somente aumento de AGL, mas também interferência no acúmulo de gordura hepática e progressão da mesma. A gordura visceral atua como um órgão endócrino, interferindo na RI e secreção de diferentes mediadores moleculares como TNF- α , IL-6, adiponectina, leptina, entre outros (van der Poorten *et al.*, 2008).

Várias evidências sugerem que a insulina é provavelmente o principal fator hormonal que estimula a expressão de genes lipogênicos. A homeostase de lipídeos em células de vertebrados é regulada por uma família de fatores de transcrição denominada SREBP (proteína ligadora ao elemento de regulação dos esteróis)(Postic & Girard, 2008). Estes fatores ativam diretamente a expressão de aproximadamente 30 genes implicados na síntese e capturação de colesterol, AGL, TG e fosfolipídios, assim como de NADPH, um cofator necessário para a síntese dessas moléculas(Foretz *et al.*, 1999). No fígado, a SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes lipogênicos envolvidos na síntese de ácidos graxos, entre eles a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA (substrato derivado principalmente da glicose) em malonil-CoA e a ácido graxo sintetase (FAS), que converte a malonil-CoA em palmitato (Figura 2). Este palmitato pode formar ácidos graxos que podem ser esterificados para TG e excretados na circulação como VLDL ou podem ser oxidados pela mitocôndria para gerar energia(Dulloo, 2009)(Figura 2). Uma ação clássica da insulina é estimular a síntese de ácidos graxos no fígado em períodos de excesso de carboidratos(Dulloo, 2009). Várias evidências sugerem que a esteatose hepática relacionada com a RI é causada pela maior expressão de SREBP-1c, em resposta aos altos níveis circulantes de insulina (Figura 2)(Shimomura *et al.*, 1999).

Figura 2 - Regulação do metabolismo de lipídeos no fígado



Legenda: A insulina via SREBP-1c aumenta a expressão de genes que estimulam a síntese de ácidos graxos, tais como Acetil-CoA carboxilase e Ácido graxo sintetase (Zecchin *et al.*, 2004).

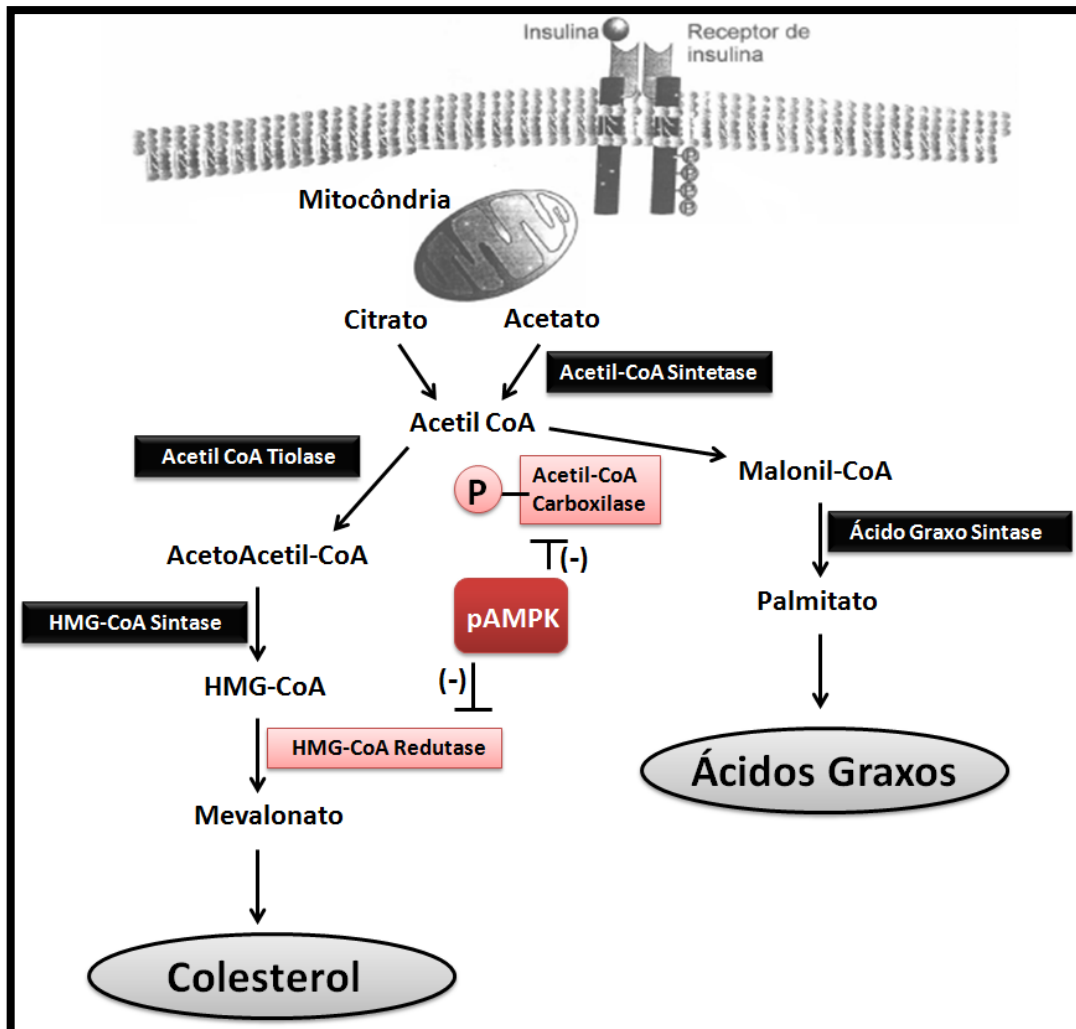
Outro ponto importante é a síntese e excreção do colesterol, pois o metabolismo hepático do colesterol influencia seus níveis no sangue e nos tecidos. A síntese inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, produzindo acetoacetil-CoA. Esta reação é catalisada pela tiolase citossólica. Reação idêntica, catalisada pela tiolase mitocondrial, aparece na β -oxidação de ácidos graxos e na formação de corpos cetônicos. Na etapa seguinte, a acetoacetil-CoA condensa-se com outra molécula de acetil-CoA, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), numa reação catalisada pela hidroximetilglutaria-CoA sintase (HMG-CoA sintase) do retículo endoplasmático. Esta enzima também pode ser encontrada na mitocôndria e, nesta organela, sua função está relacionada à cetogênese. A HMG-CoA é a seguir reduzida a mevalonato, numa reação catalisada pela HMG-CoA redutase. Seguem-se duas fosforilações, que levam à produção de 5-pirofosfomevalonato. A descarboxilação é eliminação da hidroxila do 5-pirofosfomevalonato origina isopentenil-pirofosfato. Este composto de 5 carbonos é isomerizado a dimetilalilpirofosfato, que se condensa em outra molécula de isopentenilpirofosfato, formando geranylpirofosfato, com 10 carbonos. Nova molécula de isopentenilpirofosfato condensa-se com o geranylpirofosfato, produzindo farnesilpirofosfato, de 15 carbonos. Duas moléculas de farnesilpirofosfato reagem, com eliminação de PPI, formando presqualenopirofosfato que reduzido por NADPH, origina o esqualeno, um composto de 30 carbonos. Segue-se uma reação complexa, que envolve O₂ e NADPH, na qual é formado o esqualeno 2,3 óxido. A próxima etapa consiste na completa ciclização do composto, formando-se lanosterol. A partir deste composto cíclico, uma série de reações, compreendendo remoção de grupos metila e migrações de duplas ligações, leva, finalmente, à produção de colesterol (Sabarense *et al.*, 2008).

Por outro lado, o fígado elimina o excesso de colesterol do corpo pela formação de ácidos biliares, através da reação catalisada pela enzima colesterol-7-alfa-hidrolase (CYP7A1), ou excretando diretamente na bile, na forma de colesterol livre, caminho controlado pelos transportadores da sub-família G, ABCG5 e ABCG8 (Yu *et al.*, 2005), expressos exclusivamente na membrana apical dos hepatócitos e no intestino (Graf *et al.*, 2003).

No fígado, a AMPK tem um papel essencial sobre diversas cascatas celulares, estimulando a oxidação de gordura, bloqueando a produção hepática de glicose e inibindo a síntese de ácidos graxos, TG e colesterol (Zang *et al.*, 2004). Observa-se forte associação entre a ativação da proteína AMPK fosforilada (pAMPK) e a inativação da ACC também por fosforilação. Com a inativação da ACC não há concentrações de malonil-CoA suficientes para inibir a carnitina aciltransferase e, portanto, há predominância da β -oxidação sobre a síntese de ácidos graxos, permitindo que a produção de energia prevaleça sobre o gasto. Em suma, a

AMPK atua no fígado diminuindo a síntese de lipídios e estimulando a queima de gordura, além de reduzir a produção hepática de glicose (Zhou *et al.*, 2001) (Figura 3).

Figura 3 - Via da síntese de colesterol e ácidos graxos



Legenda: Proteínas envolvidas na síntese de Colesterol e Ácidos Graxos que são moduladas pela proteína AMPK fosforilada (pAMPK) (Zecchin *et al.*, 2004).

Evidências experimentais demonstram que, uma dieta com alto teor de lipídio oferecida a ratos Wistar adultos promove um significativo ganho de massa corporal e intensa adiposidade, quando comparada com o consumo de dieta balanceada nutricionalmente (Borba *et al.*, 2011). A dieta hiperlipídica também ocasiona esteatose hepática não alcoólica, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, visto que o excesso de colesterol livre proporciona um aumento da formação de ácidos biliares (Al rajabi *et al.*, 2013).

Yao e colaboradores (2011) descreveram que uma dieta hiperlipídica, ou seja, com alto teor de gordura leva ao desenvolvimento de DHGNA, aumento dos níveis do subproduto da peroxidação lipídica, denominado malondialdeído (MDA) e uma diminuição hepática do conteúdo de substratos, como das enzimas antioxidantes, glutatona peroxidase e superóxido

dismutase devido à disfunção mitocondrial. Uma das causas que levam à disfunção mitocondrial é a incapacidade de manutenção de fluidez da membrana mitocondrial, pelo dano provocado por espécies reativas à camada lipídica.

1.3 Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial hepática

O estresse oxidativo é o mecanismo mais importante na gênese do dano celular na esteatose hepática, sendo resultado do desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na defesa antioxidante. As EROs são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou molecular (Halliwell, 1999). Estas são derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas, produzidas em todos os sistemas biológicos e reagem com as moléculas em torno do local de formação. Essas espécies que incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), juntamente com espécies reativas de nitrogênio desempenham um papel importante em processos fisiológicos e patológicos (Roberts & Sindhu, 2009). A mitocôndria, o citocromo P450 e peroxissomos representam importantes fontes de EROs.

Evidências crescentes demonstram que uma dieta com alto teor de lipídeo induz estresse oxidativo, potencialmente através do aumento da expressão de genes envolvidos na produção de EROs, no fígado e tecido adiposo e este evento precede o aparecimento da RI e obesidade induzidas pela dieta hiperlipídica (Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008). O aumento dos AGL e a hiperglicemia derivados de uma dieta com alto teor de gordura podem levar ao aumento da atividade enzimática pro-oxidante e conseqüentemente maior produção de EROs (figura 4), acarretando uma importante modificação na composição lipídica mitocondrial e levando à inibição da oxidação de ácidos graxos (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005; Vial *et al.*, 2011).

A disfunção mitocondrial na esteatose hepática está associada à desregulação da cadeia respiratória mitocondrial, desencadeando a produção de EROs, devido à fosforilação oxidativa. A ativação da enzima 2E1 do citocromo P450 (CYP2E1) aumenta a oxidação mitocondrial de ácidos graxos, mecanismo este que atua na gênese da DHGNA (Begrache *et al.*, 2006).

Há forte associação da gravidade da doença hepática e o grau de estresse oxidativo. O aumento deste na esteatose hepática foi demonstrado pela elevação dos marcadores

sorológicos oxidativos (LDL oxidada, ácido tiobarbitúrico, MDA) (Chalasanani *et al.*, 2012), e uma diminuição de antioxidantes (coenzima Q10, superóxido dismutase, catalase e glutathionperoxidase), sendo que baixos níveis desses marcadores estão correlacionados com a gravidade da doença hepática e RI (Sumida *et al.*, 2013).

O dano oxidativo provocado pelo excesso de EROs pode ser significativamente reduzido, antes que ocorram reações com alvos biológicos, prevenindo reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio e seus produtos altamente reativos (Ratnam *et al.*, 2006).

Antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais que atuam neutralizando ou prevenindo os danos causados pelos radicais livres (Cheng *et al.*, 2001).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Alguns dos antioxidantes são endogenamente produzidos como enzimas, moléculas de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos, muitos são obtidos de fontes dietéticas, sendo encontrados na sua grande maioria nos vegetais, o que explica parte das ações saudáveis que as frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais exercem sobre o organismo. Temos também os polifenóis, um grande grupo que consiste de ácidos fenólicos e flavonóides (Halliwell, 1999).

O sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathionperoxidase (GPx), com a função importante de evitar o acúmulo de O_2^- , e H_2O_2 (Kojo, 2004; Valko *et al.*, 2007) (figura 4).

A SOD é a primeira linha de defesa da célula, apresentando-se sob três isoformas: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-manganês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (EC-SOD, SOD3) (Paravicini & Touyz, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do O_2^- , em H_2O_2 e oxigênio molecular (ROSS & MOLDEUS, 1991) (Figura 3).

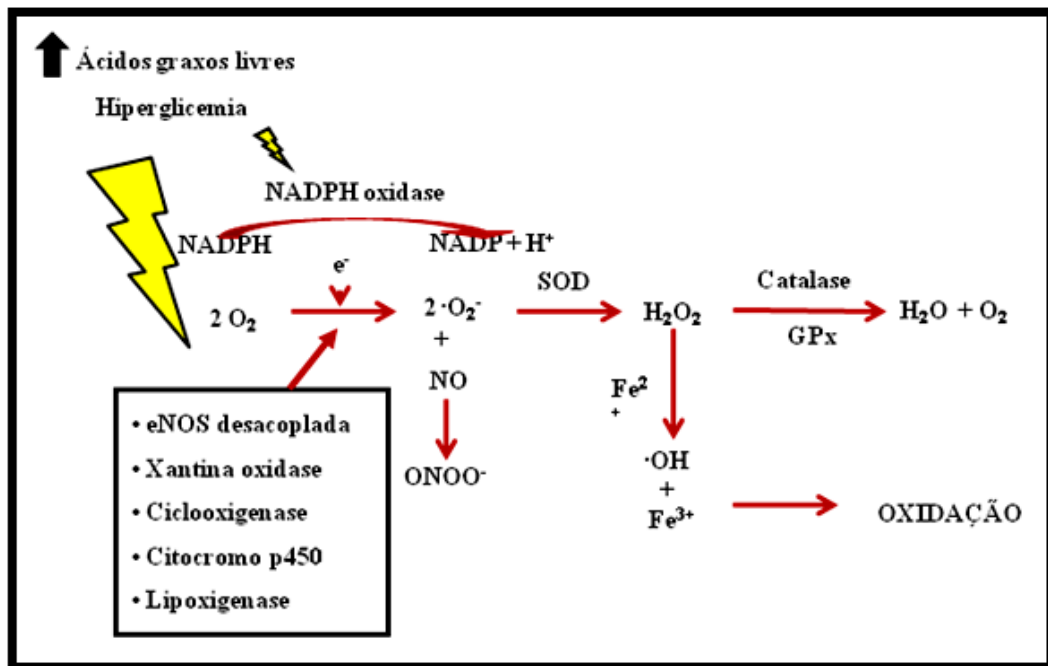
A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos através da utilização da glutathione (GSH), que atua como co-substrato da GPx, com propriedades de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada através da glutathionredutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH (Masella *et al.*, 2005; Paravicini & Touyz, 2008; Valko *et al.*, 2007) (Figura 4).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. A catalase é efetiva em altos níveis de estresse oxidativo e protege as células da produção de

peróxido de hidrogênio, sendo que a suplementação com catalase exógena previne a oxidação da GSH (Ferreira & Matsubara, 1997; Heck *et al.*, 2010).

A atividade das enzimas antioxidantes encontra-se reduzida em humanos e em modelos experimentais de obesidade e síndrome metabólica (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Figura 4 -Diagrama demonstrando como a redução univalente do oxigênio, na presença de um elétron livre, forma O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$



Fonte: (Touyz, 2004).

1.4 Modelo experimental de obesidade

Para o estudo da obesidade, muitos modelos animais experimentais têm sido utilizados atualmente. No entanto, estudos têm demonstrado que o modelo que mais se aproxima da obesidade humana é aquele que utiliza uma dieta alimentar rica em gorduras, as chamadas *high-fat* (HF) ou dieta hiperlipídica (Buettner *et al.*, 2007). Uma dieta hiperlipídica fornecida a roedores resulta em um fenótipo similar ao da obesidade com aumento da massa corporal e RI (Vazquez-Vela *et al.*, 2008).

Muitos dos aspectos da obesidade podem ser induzidos em modelos experimentais, em que os animais apresentam elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de alterações

metabólicas, como os camundongos C57BL/6. A manipulação da dieta oferecida a estes animais pode ser realizada com o intuito de acelerar o desenvolvimento dessas alterações metabólicas. Camundongos C57BL/6 quando alimentados com uma dieta rica em gordura são altamente adequados para identificar alguns dos aspectos relacionados à obesidade, como desordem lipídica (alteração nos níveis dos lipídeos levando à esteatose hepática) e RI (de Oliveira *et al.*, 2010a; Gallou-Kabani *et al.*, 2007). Os estudos demonstram que as características fenotípicas e metabólicas desses animais alimentados com dieta hiperlipídica revelam uma importante utilização deste modelo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na obesidade e progressão para o desenvolvimento de DM2 (Gallou-Kabani & Junien, 2005).

1.5 Polifenóis e o extrato-hidroalcoólico da casca da uva *Vitisvinifera* (ACH09)

Em busca de fármacos que atuem de forma menos deletéria possível, muitos estudos sobre compostos naturais e alimentos ricos em polifenóis têm sido realizados. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo regular de alimentos e bebidas ricos em polifenóis pode estar envolvido na proteção contra o risco cardiovascular (Andriantsitohaina *et al.*, 2012; Bayard *et al.*, 2007; Ghosh & Konishi, 2007; Stoclet *et al.*, 2004). Os benefícios dos polifenóis podem estar relacionados à sua ação antioxidante, que aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), a ação vasodilatadora, anti-hipertensiva e anti-inflamatória (Andriantsitohaina *et al.*, 2012).

Frutas, vegetais e cereais integrais, que são regularmente consumidos na dieta humana, apresentam flavonoides que são um grande grupo de compostos polifenólicos (Davies, 2007; Middleton *et al.*, 2000). Eles são descritos por possuírem efeitos biológicos benéficos como anti-inflamatórios (Gomes *et al.*, 2008), antioxidantes (Butterfield *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008), sequestradores de radicais livres (Galvano *et al.*, 2007), ação antiviral e antibacteriana (Havsteen, 2002), inibição da agregação plaquetária (Curin *et al.*, 2006) e promoção da saúde cardiovascular (Chen *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008). Como exemplo, a rutina, um bioflavonoide conhecido como vitamina P, diminui a fragilidade capilar associada a doenças hemorrágicas, reduz a pressão arterial elevada, diminui a permeabilidade dos vasos, possui um efeito antiedema, reduz o risco de arteriosclerose e tem forte atividade antioxidante (Chang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado uma importante ação benéfica de compostos polifenólicos nas alterações metabólicas associadas à obesidade e DM (Pimentel-Souza *et al.*, 2012; Soares de *et al.*, 2012).

O extrato das sementes da uva *Vitisvinifera* mostrou ter um efeito preventivo contra o desenvolvimento do câncer (Vanzo *et al.*, 2008), e em modelo de camundongo obeso exposto a uma dieta hiperlipídica (Park *et al.*, 2008) foram observados a redução da obesidade, dos níveis de TG e do colesterol total.

Figura 5 -Uva *Vitis vinifera*



Fonte: A autora, 2015

Com base no efeito cardioprotetor dos polifenóis, nosso laboratório vem investigando ao longo dos últimos anos, os efeitos benéficos de um extrato obtido da casca de uva *Vitisvinifera* (figura 5) rico em polifenóis elivre de álcool.

A uva *Vitisvinifera* é o fruto da videira ou vinha, que é largamente utilizada no Brasil para a produção de vinho, e sua classificação na sistemática botânica está descrita no quadro 1. A classificação de acordo com a espécie pode ser mais ampla, destacando-se além da *Vitis Vinífera*, a *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. cinérea*, etc. Cada uma dessas espécies possui muitas variedades, denominadas cepas ou castas.

Quadro 1 - Classificação científica da uva *Vitis vinífera*

Classificação	Científica
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Vitales
Família	Vitaceae
Sub-Família	Ampelidea
Gênero	Vitis
Espécie	vinifera
Nome Binomial	Vitisvinifera

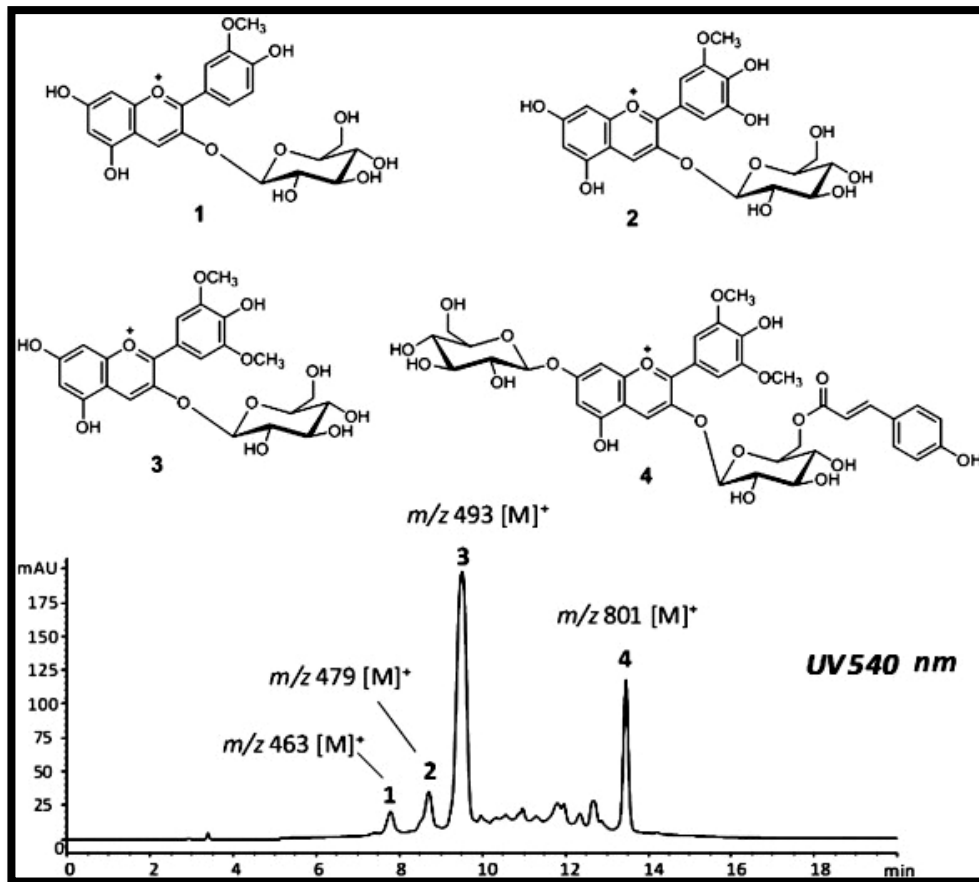
Fonte: A autora, 2015

As uvas que originam os vinhos finos são da espécie *V. vinifera* de origem europeia e que possui inúmeras castas, como a Cabernet Sauvignon, a Merlot, a Chardonnay, etc. As demais espécies são denominadas americanas, sendo adequado à elaboração de vinhos de mesa, vinho colono, vinho de garrafão e suco de uva. Essas espécies também possuem muitas variedades, cujos melhores exemplos no Brasil são a Niágara e a Isabel que até a década de 80 eram as únicas castas utilizadas na elaboração dos vinhos brasileiros.

A concentração total de polifenóis nas uvas viníferas, extraídos pelo método de Follin-Ciocalteu, pode variar entre 1,2 e 4,1 g/kg (Mattivi *et al.*, 2002). Acredita-se, ainda, que as concentrações das substâncias presentes nas uvas variam de acordo com o tipo de uva, solo onde são cultivadas, os métodos de cultivo e condições climáticas como exposição à luz solar (Ryan & Revilla, 2003; Zafrilla *et al.*, 2003).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidro-alcoólico da casca de uva *Vitisvinifera*, denominado ACH09 é rico em antocianinas como a peonidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-(6-O-*trans-p*-cumaril)-5-O-diglicosídeo (Moura *et al.*, 2012) (Figura 5), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a semente (Soares de Moura *et al.*, 2002). Todos estes compostos, já foram previamente descritos em diferentes espécies de *Vitis* spp. (Flamini, 2003; Garcia-Beneytez *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

Figura 6 - Perfil de HPLC a partir de extrato da casca da uva (ACH09)



Legenda: Estruturas das quatro antocianinas identificadas (Emiliano *et al.*, 2011).

Nossos estudos demonstram ainda que o ACH09 produz efeito vasodilatador dependente de endotélio e mediado por NO e GMPc, assim como pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Soares de Moura *et al.*, 2002; Madeira *et al.*, 2005 e 2009). Além disso, demonstramos que o extrato produz efeito anti-hipertensivo em diferentes modelos experimentais de hipertensão, assim como efeito antioxidante (Madeira *et al.*, 2005; Soares de Moura *et al.*, 2002) e de redução da RI, verificada por clampeamento e relação insulina/glicose, quando administrado oralmente em ratas grávidas com pré-eclampsia induzida por L-NAME (de Moura *et al.*, 2007). Observamos ainda que o ACH09 estimula a liberação de NO em células coronárias em cultura (Madeira *et al.*, 2009) e ativa a cascata de sinalização da insulina, reduzindo a hiperglicemia em camundongos diabéticos (Soares de *et al.*, 2012).

Estes achados pré-clínicos em conjunto, demonstram um potencial efeito benéfico do extrato ACH09, no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas. Com o objetivo de

ampliar nossos conhecimentos sobre os efeitos benéficos do ACH09 em distúrbios metabólicos, avaliamos seus efeitos no metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos, em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica, capaz de induzir obesidade. Cabe ressaltar a relevância do estudo, uma vez que a obesidade, pode se apresentar associada a outras comorbidades como a RI e esteatose hepática, também observados neste modelo experimental. O tratamento proposto deve atuar nesse conjunto de fatores, contribuindo para a melhora da crescente incidência de obesidade, DM2 e DHGNA.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração do tratamento preventivo com ACH09 nas alterações do metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica

2.2 Objetivos específicos

- a) Acompanhar a evolução da massa corporal e da ingestão alimentar e estimar a massa de gordura visceral, ao final do período experimental
- b) Avaliar o efeito do tratamento com ACH09 sobre os níveis glicêmicos, insulinêmicos e a RI;
- c) Investigar se o tratamento com ACH09 modifica os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, bem como os níveis de glicogênio hepático;
- d) Analisar o perfil lipídico hepático, a fim de estabelecer uma relação com a esteatose hepática e avaliar o efeito do ACH09;
- e) Determinar a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina em homogenato de fígado, avaliando uma possível interferência do ACH09;
- f) Analisar a expressão de proteínas-chaves envolvidas na homeostase de lipídios em fígado, avaliando uma possível interferência do ACH09 na via biossintética dos AG;
- g) A expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 envolvidos na excreção de colesterol, avaliando uma possível interferência na excreção hepática;
- h) Avaliar o dano oxidativo e a defesa antioxidante em homogenato de fígado;
- i) Analisar as alterações morfológicas e histológicas do fígado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato hidro-alcoólico da casca da uva *Vitis Vinifera*

A uva *Vitisvinifera* foi obtida de plantações selecionadas localizadas no estado do Rio Grande do Sul. O pó seco da casca da uva foi extraído em uma solução aquosa a 100 °C com agitação ocasional durante cerca de 120 minutos. A solução foi então introduzida numa coluna de resina de troca iônica (catiônica) e lavada sequencialmente com etanol, etanol/H₂O (1: 1) e H₂O. A fração de H₂O foi descartada. As frações etanólica e hidroalcoólica foram colocadas juntas e evaporadas sob vácuo a 60°C, seguidas por secagem por pulverização da solução concentrada (temperatura de entrada de 190°C e temperatura de saída de 85°C). O extrato obtido no processo era um pó fino, solúvel em H₂O, com cerca de 30% do total de polifenóis de acordo com o processo de Folin-Ciocalteu (Resende *et al.*, 2013).

3.2 Animais utilizados e modelo experimental

Todas as experiências foram aprovadas pelo Comitê de Ética de Experiências Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo: CEA/025/2010).

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 30 a 40 dias de idade, obtidos no Biotério do Departamento de Farmacologia/ IBRAG/ UERJ, e mantidos nesse mesmo local em temperatura média de 23° C e com ciclo de sono-vigília de 12 horas, com presença de luz a partir das 06h00min da manhã.

Os camundongos foram alimentados com livre acesso à ração e água durante 90 dias com uma dieta controle (dieta padrão para camundongos) e dieta hiperlipídica (dieta experimental rica em banha de porco, fonte de ácidos graxos saturados). Ambas as dietas (quadro 2) experimentais foram elaboradas pela Rhooster[®] (Rhooster, SP, Brasil, www.rhooster.com.br), de acordo com as recomendações padrão para roedores AIN-93M).

Quadro 2 - Composição das dietas padrão e hiperlipídica

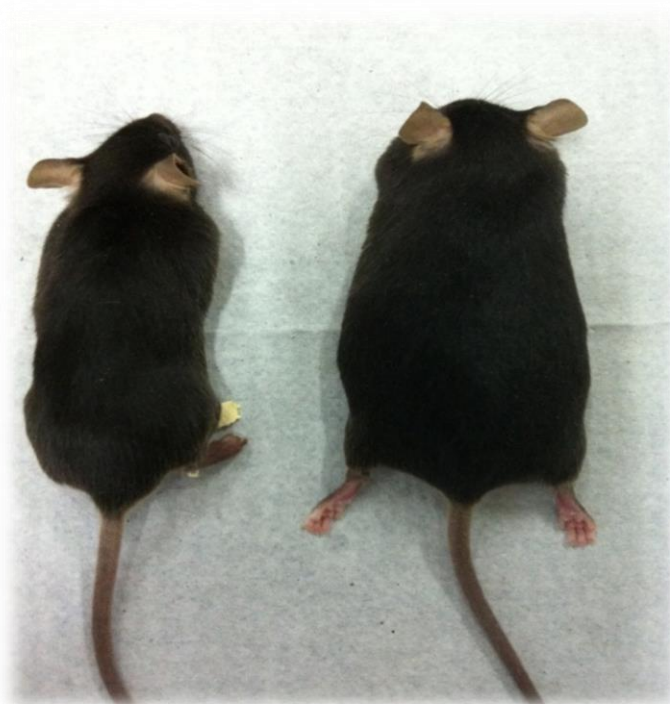
Nutrientes (U/Kg dieta)	Dietas	
	Padrão	Hiperlipídica
Caseína (g)	140	190
Amido de milho (g)	620,7	250,7
Sacarose (g)	100	100
Óleo de soja (g)	40	40
Banha de porco (g)	0	320
Fibras (g)	50	50
Mistura de minerais (g)	35	35
Mistura de vitaminas (g)	10	10
L-cistina (g)	1,8	1,8
Colina (g)	2,5	2,5
Energia (Kcal)	3.800	5.400
Carboidratos (%)	76	26
Proteína (%)	14	14
Lipídeo (%)	10	60
Mistura de vitaminas e minerais seguiram as recomendações para roedores da AIN- 93M		

Fonte: Rhooster, SP, Brasil

Dessa forma os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais:

- a) **Grupo Controle (C):** receberam dieta padrão durante 90 dias(figura 7);
- b) **Grupo ACH09 (ACH09):** receberam dieta padrão durante 90 dias e concomitantemente (200 mg/kg) do ACH09 por gavagemintragástrica;
- c) **Grupo hiperlipídico (HF):** receberam dieta hiperlipídica (60% de gordura) durante 90 dias(figura 7);
- d) **Grupo hiperlipídico + ACH09 (HF+ACH09):** receberam dieta hiperlipídica (60% de gordura) durante 90 dias e concomitantemente (200 mg/kg) do ACH09 por gavagemintragástrica.

Figura 7 - Camundongos Black C57BL/6



Nota: Camundongo C57BL/6 tratado com dieta padrão e dieta hiperlipídica.
Fonte: A autora, 2015

3.3 Ingestão alimentar e massa corporal

A ingestão alimentar dos camundongos foi monitorada a cada 2 dias e a massa corporal foi aferida semanalmente. O consumo de ração diário foi calculado fazendo a diferença da quantidade fornecida pela sobra dividida pelo número de animais (n) vezes dois (referente aos dias), então:

$$\text{Ingestão (g) (ração)} = (\text{Oferta} - \text{sobra})/2n$$

3.4 Medida da massa de gordura visceral

Após o sacrifício o tecido adiposo retroperitoneal e epididimal foram isolados e pesados. O peso dos tecidos foi utilizado para quantificar a adiposidade central.

3.5 Medidas do Peso e Volume do Fígado.

Após o sacrifício o fígado foi isolado e pesado (g) em uma balança analítica e o volume foi aferido por Scherle.

3.6 Análises bioquímicas

3.6.1 Glicemia de jejum

O nível de glicose sérica foi mensurado após um período de 6 horas de jejum, com amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do camundongo e a leitura sendo realizada com o auxílio de um medidor automático (Accu-check), baseado na reação glicose-glicose oxidase. Os valores foram expressos em mg/dL.

3.6.2 Insulina

A dosagem de insulina foi analisada em duplicatas pelo método de radioimunoensaio através do Insulin 125I Ria Kit (MP Biomedicals, LLC- Orangeburg, NY 10962). Os valores foram expressos em μ UI/mL.

3.6.3 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através do índice de HOMA (Homesostasis Model Assessment) calculado pela fórmula: insulina de jejum (μ UI/mL) x glicose de jejum (mmol/L)/22,5.

3.6.4 Perfil lipídico

Os TG e o colesterol total (CT) foram avaliados no plasma através de Kit comercial (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) que se baseia em método colorimétrico. As concentrações plasmáticas foram expressas em mg/dL.

Para a avaliação do conteúdo de TG e CT hepáticos, 50 mg da amostra foram homogeneizados em 1mL de álcool isopropílico. Posteriormente, as amostras foram sonicadas e centrifugadas a 5900 rpm por 10 minutos a 4°C. A análise foi realizada através de Kit comercial (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) que se baseia em método colorimétrico.

3.7 **Medida de glicogênio hepático**

Após os animais serem sacrificados, os fígados foram isolados e pesados para análise do glicogênio hepático. Para 500 mg de fígado foi adicionado 1ml de ácido tricloroacético (TCA 10 %), e em seguida foi feito um homogenato deste fígado. As amostras foram centrífugas a 2.000 rpm por 10 minutos. Foram coletados 600µl do sobrenadante em tubos de ensaio e adicionados 1,6 ml de etanol. As amostras foram deixadas em geladeira overnight e posteriormente foram centrifugadas novamente a 2.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µl de HCL 1N e deixados em Banho-Maria a 100°C por 30 minutos. Finalmente, o glucox foi adicionado e as amostras foram lidas em leitor de Elisa a 510 nm.

3.8 **Ensaio pró-oxidantes**

3.8.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidaçãolipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao

aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. MDA reage com o (ácido tiobarbitúrico) TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por (Draper & Hadley, 1990) e adaptada para medida em fígado.

Foram utilizados 200 µl de homogenato de fígado para 400 µl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro — AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK).

3.8.2 Carbonilação de proteína

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente 22.0000 Molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por (Levine *et al.*, 1990).

Foram utilizados 100µl de fígado e realizadas lavagens com solução de HCL-Acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-Acetato de Etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCL 2M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro (370 nm; Ultrospec 2100 Pro — AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK).

3.9 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas anti-oxidantes SOD, catalase (CAT) e GPx foi realizada em homogenato de fígado preparados com tampão fosfato (PBS).

3.9.1 Medida da superóxido dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo ânion superóxido. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por (Bannister & Calabrese, 1987).

Foram utilizados 5, 15 e 30 µl de cada amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 µl tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20 µl da enzima catalase (1.2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o peróxido de hidrogênio formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro — AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 180 segundos.

3.9.2 Medida da catalase

A catalase é uma heme proteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, formando oxigênio molecular e água. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação.

Foram utilizados 60 µl de amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de PBS e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de H₂O₂ foi avaliada durante 60 segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro — AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 60 segundos (Aebi, 1984).

3.9.3 Medida da glutathionaperoxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H₂O e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 20 µl de amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 µl de PBS, glutathiona reduzida (2mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro — AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por (Flohe & Gunzler, 1984) e adaptada para os tecidos estudados

3.10 **Medida de nitrito**

Como o NO possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical é mensurado pela formação do nitrito (NO₂), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED), formando um composto azo estável de coloração púrpura, lido no comprimento de onda de 540 nm (Green *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 2003).

Solução 1: sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5%.

Solução 2: N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%.

Para a reação, foram adicionados 100 µl da amostra em 50 µl da solução 1. Após um tempo de 10 minutos foram adicionados 50 µl da solução 2. Após a homogeneização, a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro ou leitor de ELISA. O resultado foi dado em µM (ou mMol)/ mg proteína.

3.11 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

O tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado com 2 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel inibidor de proteases, centrifugados (13000 rpm, 4°C for 20 min).

A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico (kit BCA Protein Assay - ThermoScientific Inc., Barrington, IL, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% bromofenol azul) e aquecidas a 95 °C por 5 min. As amostras foram analisadas pelo método SDS-PAGE. Foram pipetados 20 µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (overnight, a 5°C): anti-IR (1:1000); anti-pIRS-1 (1:500); anti-pAKT (1:1000); anti-PI3K (1:1000); anti-GLUT2 (1:1000); anti-SREBP-1c (1:1000); anti-FAS (1:1000); anti-pACC (1:1000); anti- HMG CoA-R (1:1000); anti-pAMPK (1:1000); anti-ABCG8 (1:1000) e anti- ABCG5 (1:1000) e anti-tubulina (1:1000) para o homogenato desse tecido (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:5000) por 1 h (25°C) sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimioluminescência (ECL-plus;

Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Adobe Photoshop Elements 11, versão: 11.0 (Adobe Systems Incorporated).

A proteína β -tubulina foi utilizada como controle interno de todas as amostras.

3.12 Histologia do fígado

Amostras de fígado de 5 camundongos foram fixadas em formalina (1,27 mol/L formaldeído 0,1M tampão fosfato-salina, pH 7.2) e embebidos em parafina para realização de cortes não seriados de 5 μ m. Os cortes foram alocados em lâminas histológicas para a coloração com hematoxilina/eosina a fim de identificar a arquitetura do fígado (Mosley *et al.*, 1990). Foram tiradas 10 fotografias aleatórias por animal para avaliar a esteatose e a arquitetura do fígado. Todas as imagens foram escolhidas ao acaso (formato JPG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) com câmera Olympus DP71 e com Olympus BX60 microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japão). As análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

3.12.1 Análise morfológica do fígado

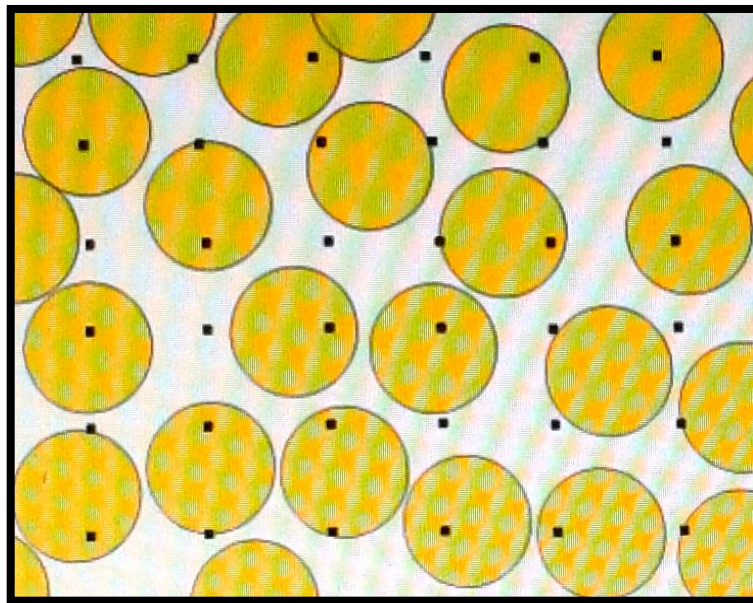
Este parâmetro nos permite através de contagem de pontos a determinação do volume ocupado pelo objeto dentro de um volume teste. É um dado de fácil análise e seus valores são representados em percentual (%).

Densidade de volume (Vv) do fígado – são parâmetros estimados usando o método de contagem de pontos (Weibel, 1979). A grade de pontos é superimposta sobre as imagens de seções do fígado visualizadas no monitor. O canto superior direito de cada cruz é considerado como um ponto. A densidade de volume Vv dos parâmetros favoráveis é obtida usando-se a seguinte fórmula:

$$V_v = \frac{\sum P_p}{\sum P_t}$$

Em que P_p é o somatório do número de pontos que tocam as estruturas analisadas e P_t é o somatório do número de pontos totais do sistema-teste. As análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Figura 8 - Figura esquemática representando a contagem de pontos através do sistema de 36 pontos-teste



Fonte: Weibele *et al.*, 1966.

3.13 Análises estatísticas

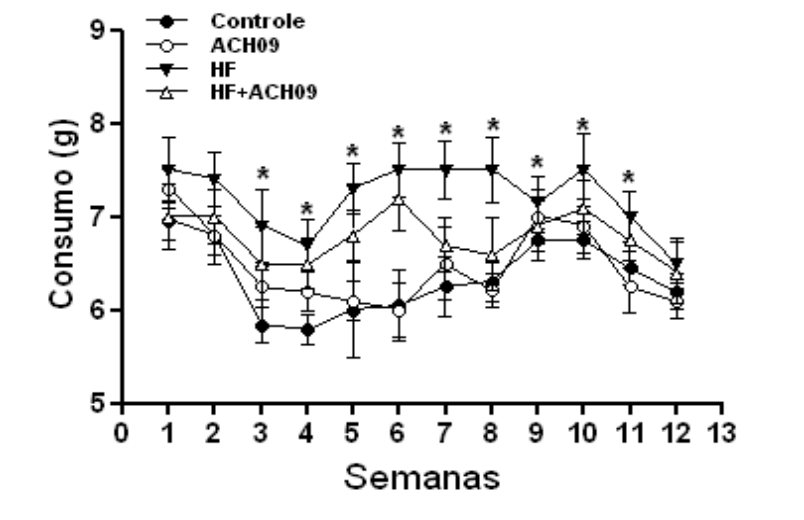
Todos os resultados foram analisados por meio de “Two-way analysis of variance” (ANOVA) utilizada para comparar diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Bonferroni, sendo consideradas significativas, quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar

Durante o fornecimento das dietas, a quantidade de ração (g/dia) consumida pelos animais do grupo HF foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles (Controle e ACH09). O tratamento com ACH09 preveniu o aumento do consumo de ração do grupo HF+ACH09 nas primeiras semanas (Figura 9).

Figura 9 - Ingestão alimentar



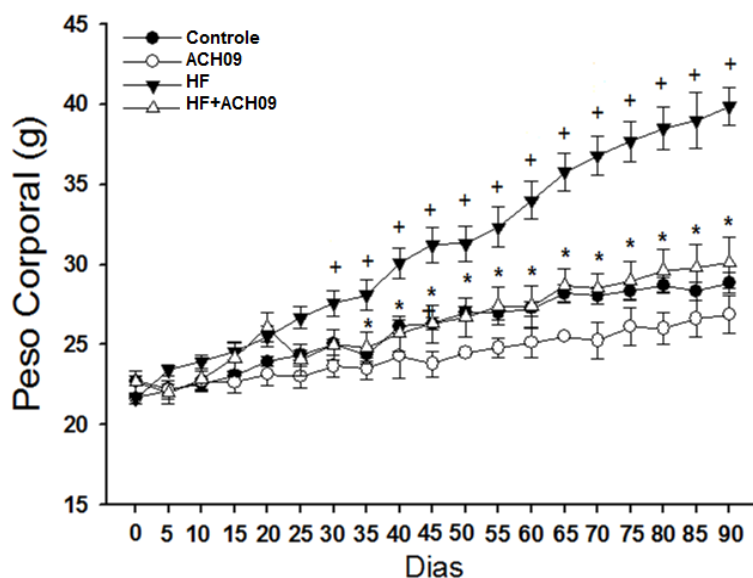
Legenda: Ingestão alimentar dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n= 10$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação aos grupos Controle e ACH09.

Fonte: A autora, 2015

4.2 Peso Corporal

No início do estudo, os animais não apresentaram diferença estatística em seu peso corporal entre os grupos. A partir do 30º dia até o término do período do estudo o peso corporal do grupo que recebeu a dieta hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados) foi significativamente maior ($p < 0,05$) comparada aos Controles. O tratamento com ACH09 promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) no peso corporal dos animais do grupo HF+ACH09 a partir do 30º dia de vida. Desta forma, observamos que o ACH09 apresenta um efeito protetor contra o aumento da massa corporal, quando os animais são submetidos a uma dieta rica em gordura (Figura 10).

Figura 10 - Peso corporal



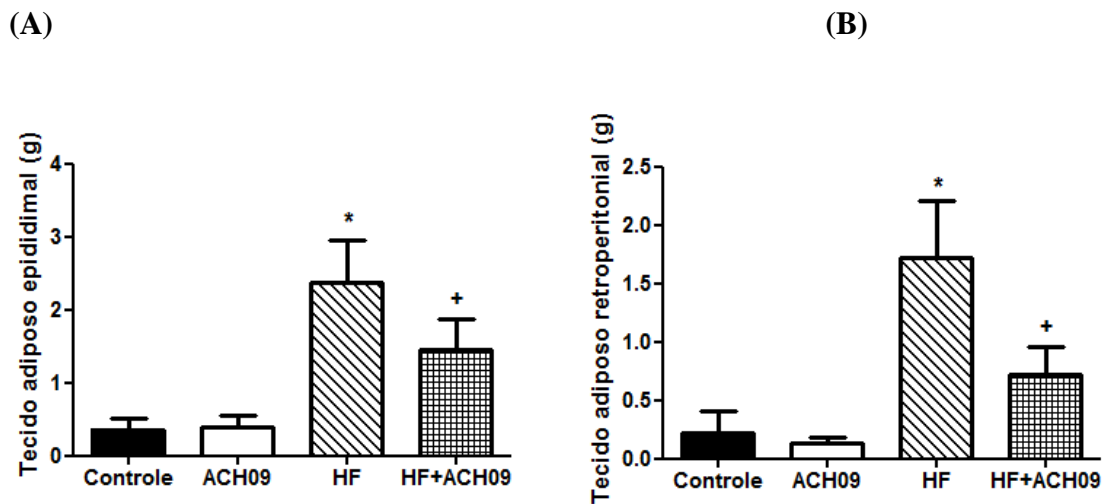
Legenda - Peso corporal dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; † $P < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Fonte. A autora, 2015

4.3 Massa de gordura visceral

A massa de gordura visceral, representada pelo peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foi maior ($p < 0,05$) nos animais do grupo HF quando comparado com os animais dos grupos Controle e ACH09. O tratamento com ACH09 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a massa de gordura visceral nos animais do grupo HF+ACH09 (Figuras 11 A e B).

Figura 11 - Massa de gordura visceral



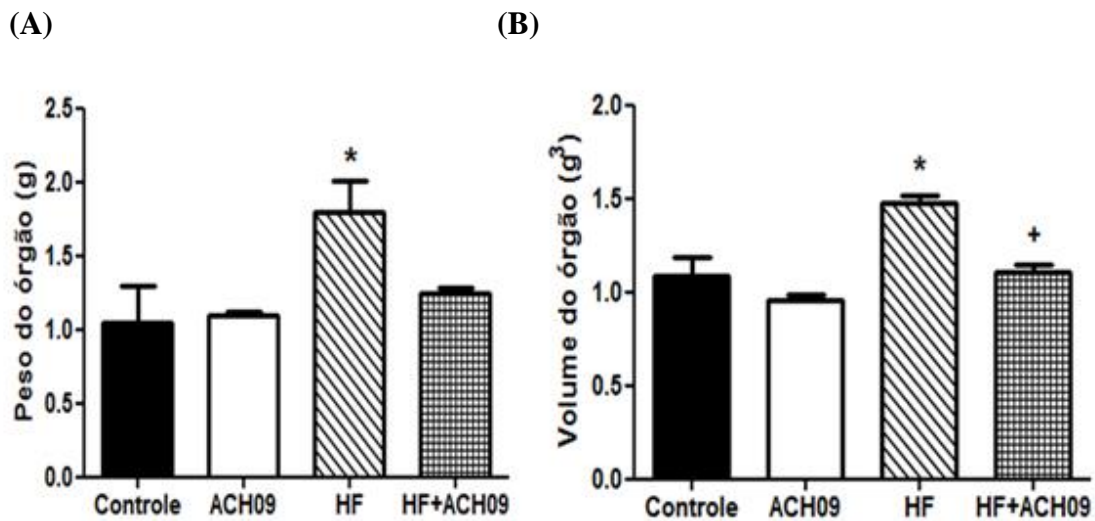
Legenda: Massa de gordura visceral representada pelo peso de tecido epididimal (A) e tecido retroperitoneal (B) dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n=10$ para todos os grupos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; + $P < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

4.4 Peso e Volume do fígado

O grupo HF que recebeu a dieta rica em gordura saturada apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) do peso e volume do órgão (Scherle) comparado ao grupo Controle e ACH09. Além do efeito protetor do ACH09 sobre o aumento do peso corporal do grupo HF+ACH09, o extrato rico em polifenóis promoveu também uma redução significativa do volume do órgão dos animais do grupo HF+ACH09 ($p < 0,05$) em relação ao grupo HF (Figura 12 A e B).

Figura 12 - Peso e volume do fígado



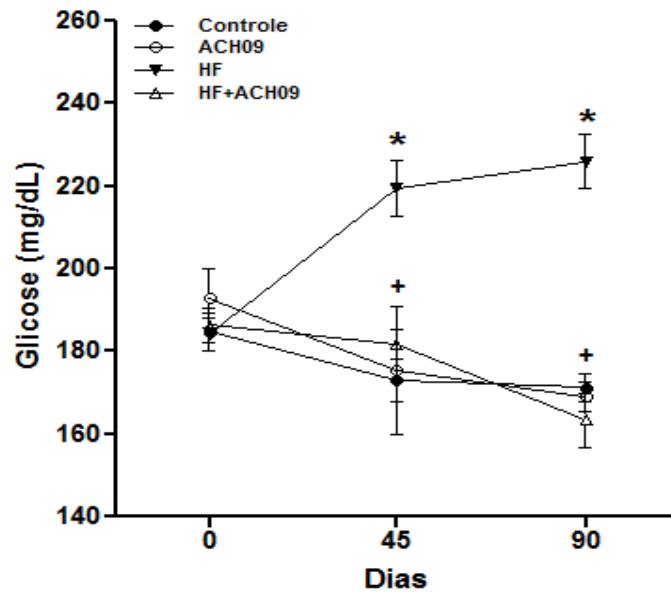
Legenda: Efeito do tratamento com ACH09 sobre o Peso do órgão (A) e Volume do órgão (B) dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n=10$ para todos os grupos. * $P<0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; + $P<0,05$ em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

4.5 Glicemia

Os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente maiores no grupo HF ($p<0,05$) em relação ao grupo Controle e ACH09 a partir do 45º dia de tratamento. O tratamento com ACH09 reduziu significativamente o aumento da glicose no grupo HF+ACH09 ($p<0,05$) em relação ao grupo HF (Figura 13).

Figura 13 - Glicemia



Legenda: Níveis de glicose inicial e final dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, n= 10 para todos os grupos. *P<0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09; +P<0,05 em relação ao grupo HF.

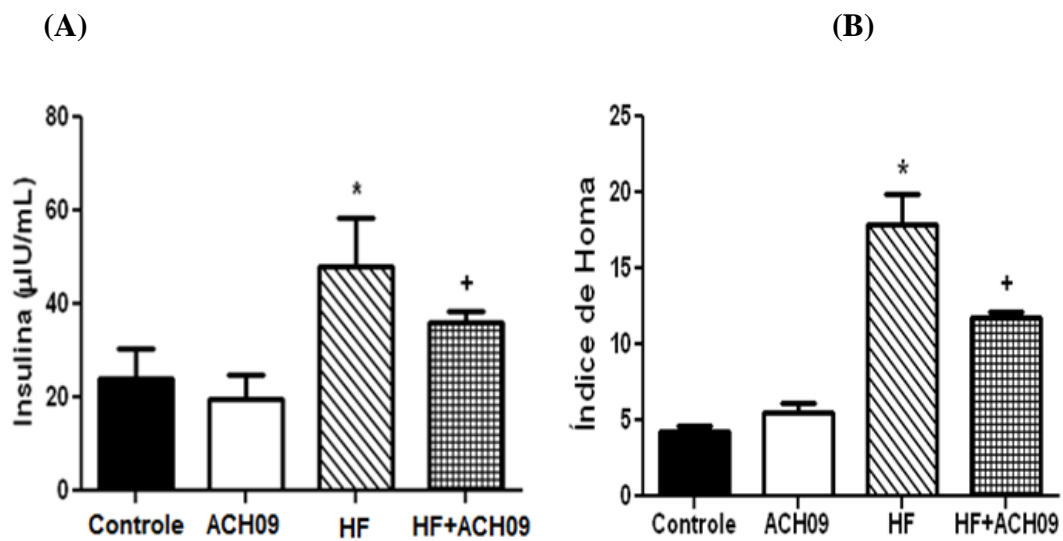
Fonte: A autora, 2015

4.6 Resistência à insulina

Os níveis séricos de insulina foram maiores ($p < 0,05$) no grupo HF, quando comparados ao grupo Controle e ACH09. O tratamento com ACH09 promoveu uma redução desses níveis no grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF. (Figura 14A).

O índice HOMA-IR é um parâmetro indicador de RI que foi maior nos animais do grupo HF ($p < 0,05$) quando comparados aos Controles. O tratamento com ACH09 diminuiu ($p < 0,05$) a RI no grupo HF+ACH09 quando comparado ao grupo HF (Figura 14).

Figura 14 - Resistência à insulina



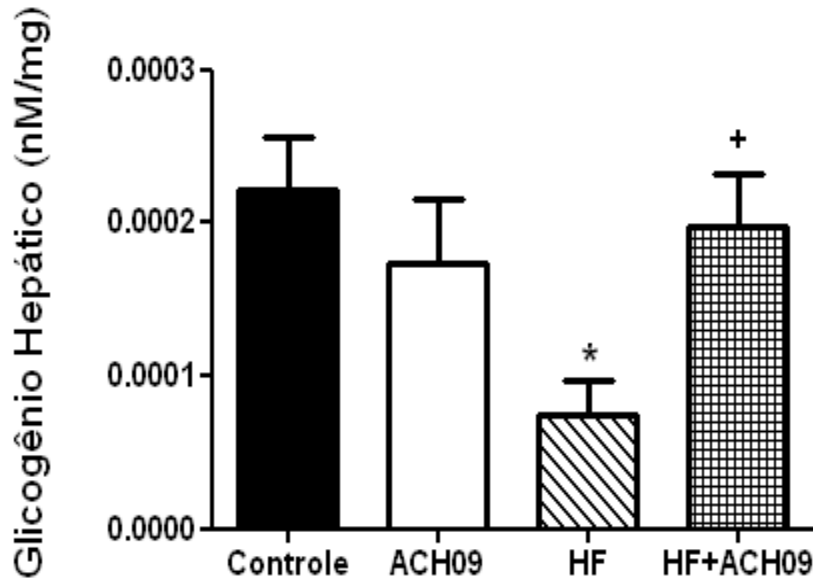
Legenda: Níveis plasmáticos de insulina (A) e Índice de HOMA (B) dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, n= 10 para todos os grupos. *P<0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09; + P<0,05em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

4.7 Conteúdo de glicôgênio hepático

O conteúdo de glicôgênio hepático foi menor ($p < 0,05$) nos animais do grupo HF quando comparados ao grupo Controle e ACH09. O tratamento com ACH09 promoveu um aumento ($p < 0,05$) do conteúdo do glicôgênio nos animais do grupo HF+ACH09 quando comparados aos animais do grupo HF (Figura 15).

Figura 15 - Conteúdo de glicogênio hepático



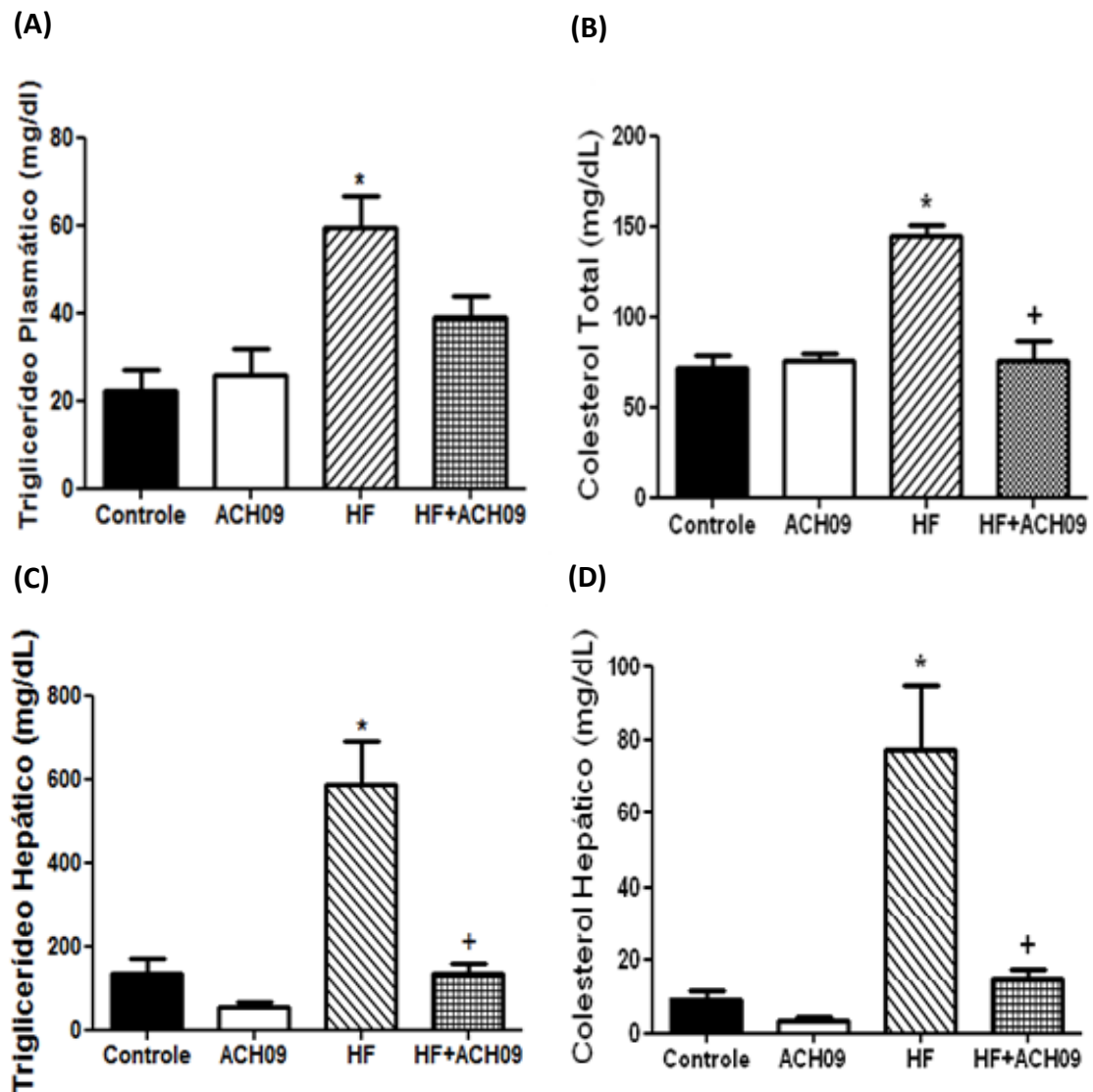
Legenda: Níveis de glicogênio hepático dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, n= 10 para todos os grupos. *P<0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09; †P<0,05 em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

4.8 Perfil lipídico plasmático e hepático

Os níveis dos triglicerídeos e colesterol plasmáticos ($p < 0,05$) foram maiores nos animais do grupo HF quando comparados ao grupo Controle e ACH09. O tratamento com ACH09 promoveu uma redução ($p < 0,05$) do nível de CT dos animais do grupo HF+ACH09, quando comparado ao grupo HF (Figura 15 A e B). O mesmo padrão de resposta foi observado no perfil lipídico hepático (Figura 16C e D).

Figura 16 - Perfil lipídico e hepático



Legenda: Níveis de triglicerídeo e colesterol plasmáticos (A e B) e hepáticos (C e D) dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n=10$ para todos os grupos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; + $P < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015.

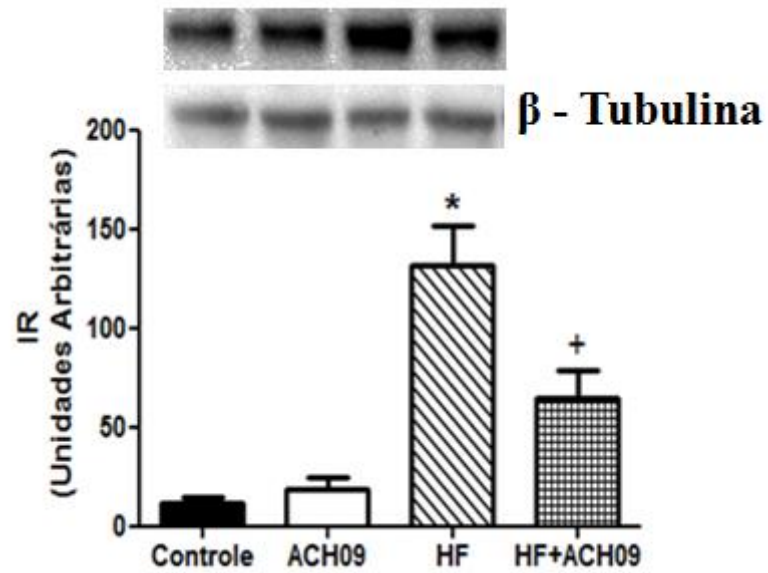
4.9 Expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido hepático

O grupo HF mostrou valores superiores ($p < 0,05$) de expressão de IR quando comparado ao grupo Controle e ACH09 (Figura 17A). O tratamento com ACH09 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a expressão dessa proteína no grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF.

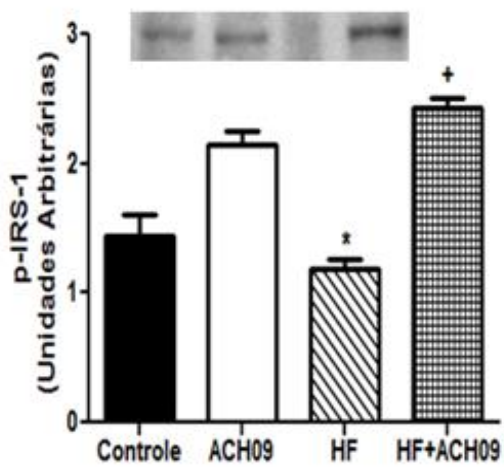
A expressão das proteínas da via de sinalização da insulina, pIRS1, PI3K e pAKT foi significativamente ($p < 0,05$) menor em homogenato de fígado do grupo HF, quando comparada aos Controles. O tratamento com ACH09 aumentou ($p < 0,05$) as expressões dessas proteínas no grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF. A glicose produzida pela via da gliconeogênese é liberada pelo hepatócito através do GLUT2, cuja expressão foi aumentada ($p < 0,05$) no grupo HF+ACH09 quando comparada ao HF, assim como, no grupo ACH09 comparado ao grupo Controle (Figura 17B, C, D e E)

Figura 17 - Expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido hepático
(Continua)

(A)



(B)



(C)

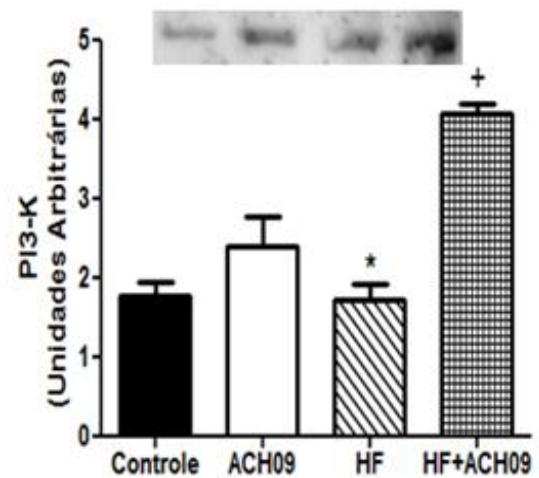
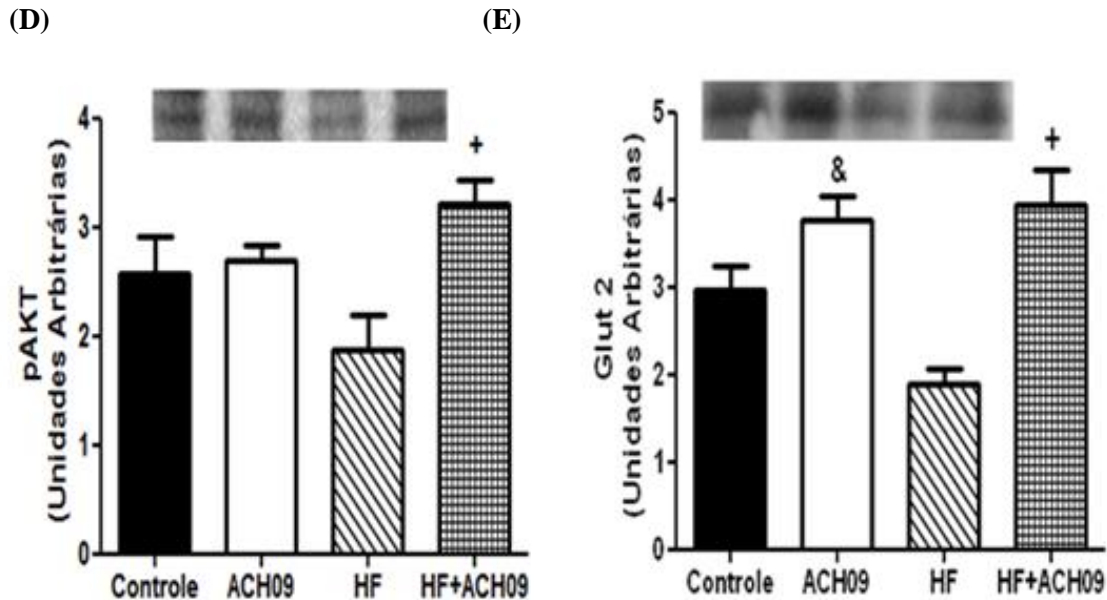


Figura 17 - Expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido hepático (Conclusão)



Legenda: Expressão de IR (A), pIRS-1 (B), PI3-K (C), pAKT (D) e GLUT2 (E) em amostras de fígado dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 3 para cada grupo por western blot) . *P<0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09; ⁺P<0,05 em relação ao grupo HF e [&]P<0,05 em relação ao grupo Controle.

Fonte: A autora, 2015

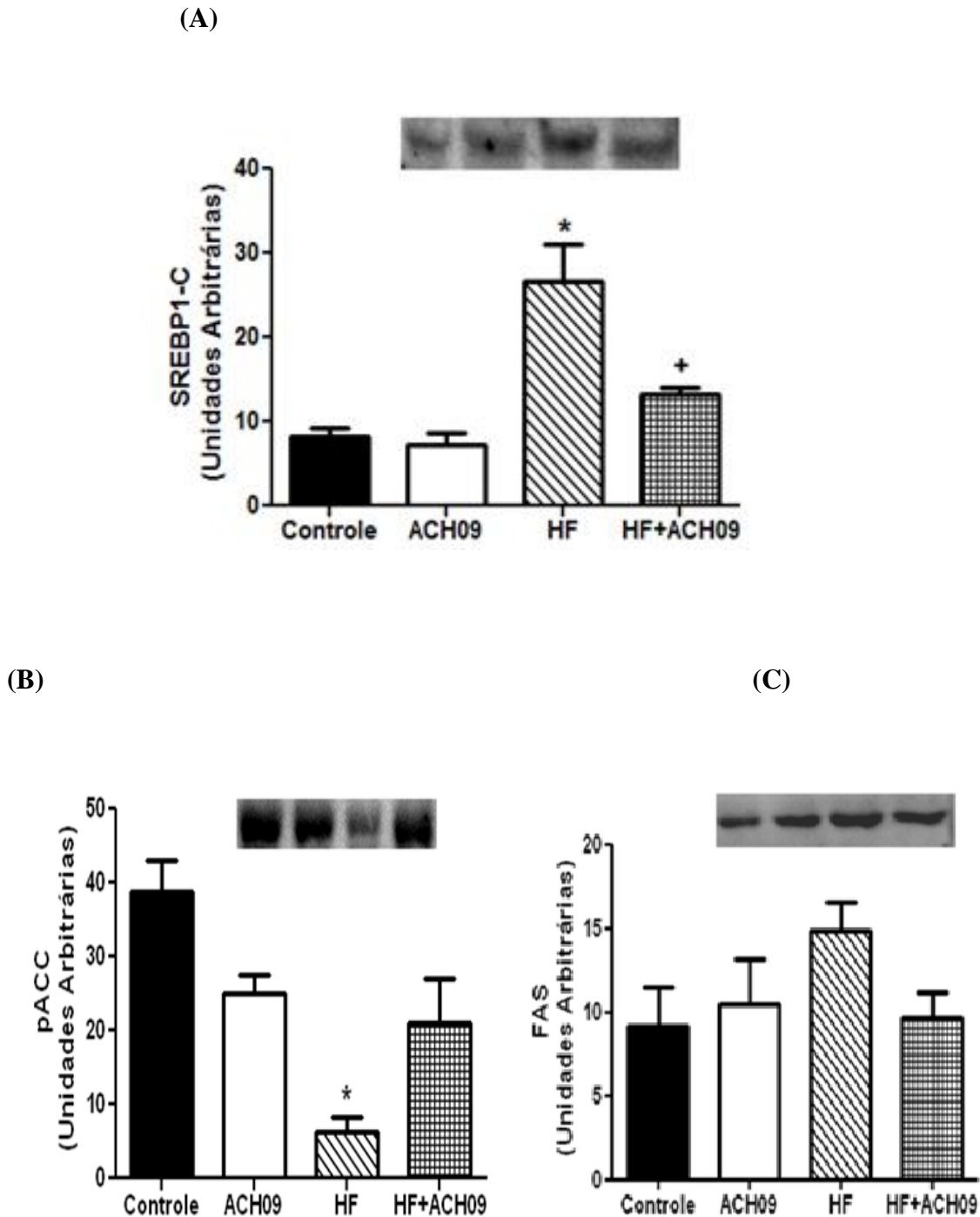
4.10 Expressão das proteínas SREBP1-c, pACC, FAS no tecido hepático

A expressão da proteína SREBP-1c (Figura 18A)(lipogênese) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em homogenato de fígado do grupo HF, enquanto a expressão da proteína pACC foi significativamente menor no grupo HF ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo Controle e ACH09 (Figura 18B.).

Não houve diferença significativa na expressão da proteína FAS regulada pela SREBP-1c, no grupo HF quando comparada aos grupos Controles (Figura 18C).

O tratamento preventivo com ACH09 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a expressão da proteína SREBP-1c do grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF, mas não alterou de forma significativa a expressão das proteínas pACC e FAS (Figura 18A, B e C).

Figura 18- Expressão das proteínas SREBP1-c, pACC, FAS no tecido hepático



Legenda: Efeito de ACH09 na expressão das proteínas SREBP-1c (A), pACC (B) e FAS (C). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 3$ para cada grupo por western blot). * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; $^+ P < 0,05$ em relação ao grupo HF.

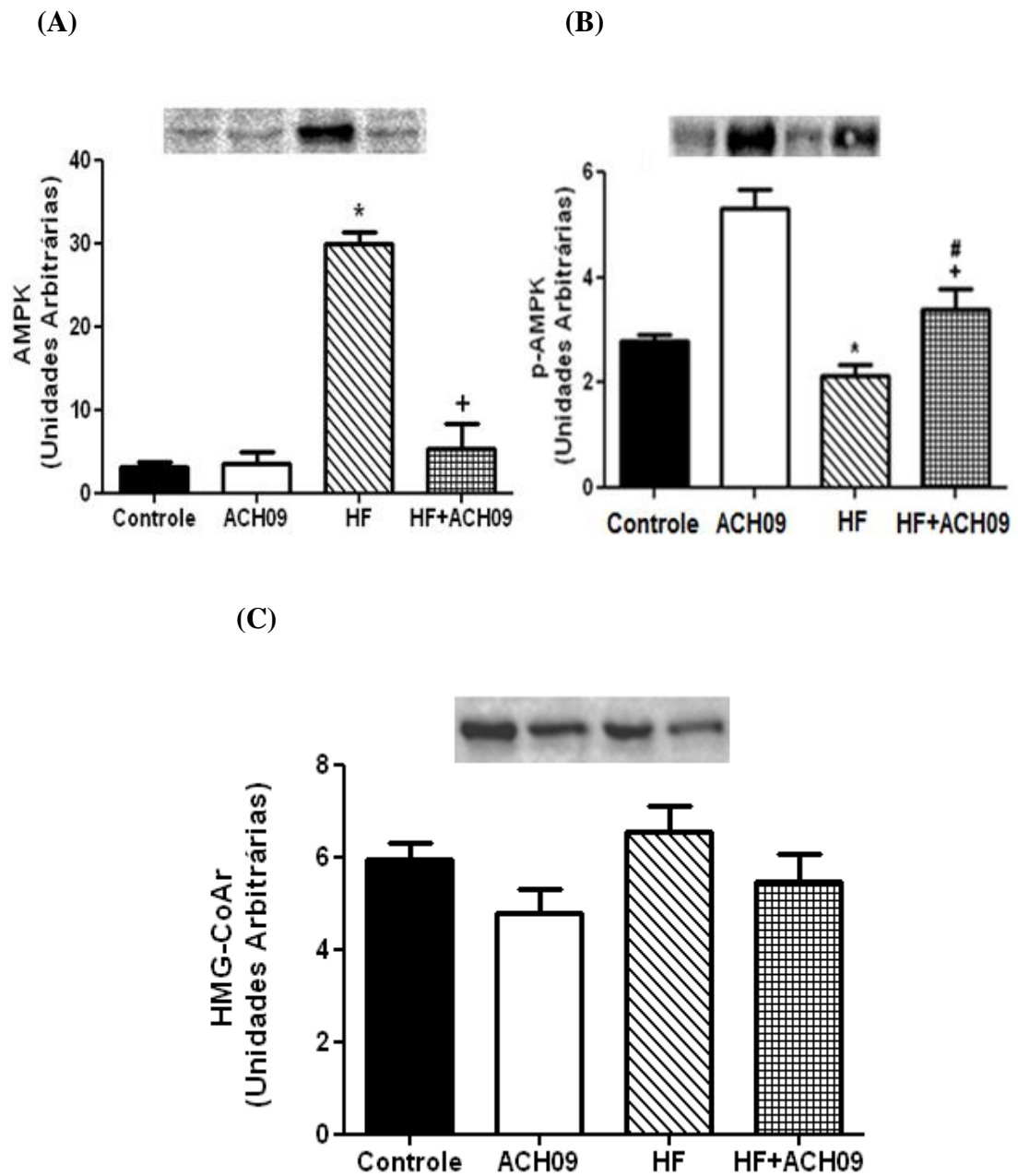
Fonte: A autora, 2015

4.11 Expressão das proteínas AMPK, pAMPK e HMG-CoAr no tecido hepático

Os animais HF apresentaram maior ($p < 0,05$) conteúdo proteico de AMPK, proteína que atuainibindo a síntese de colesterol quando comparados aos grupos Controles. O tratamento com ACH09 reduziu a expressão dessa proteína ($p < 0,05$) no grupo HF+ACH09 comparado ao grupo HF (Figura 19A). A expressão da proteína pAMPK encontrou-se reduzida ($p < 0,05$) nos animais HF quando comparada ao grupo Controle e ACH09 (Figura 19B). O tratamento com ACH09 aumentou ($p < 0,05$) o conteúdo dessa proteína no grupo HF+ACH09 quando comparado aos grupos HF e Controle (Figura 19B).

Não houve diferença significativa na expressão da proteína HMG-CoAr, envolvida na síntese de colesterol (Figura 19C).

Figura 19 - Expressão das proteínas AMPK, pAMPK e HMG-CoAr no tecido hepático



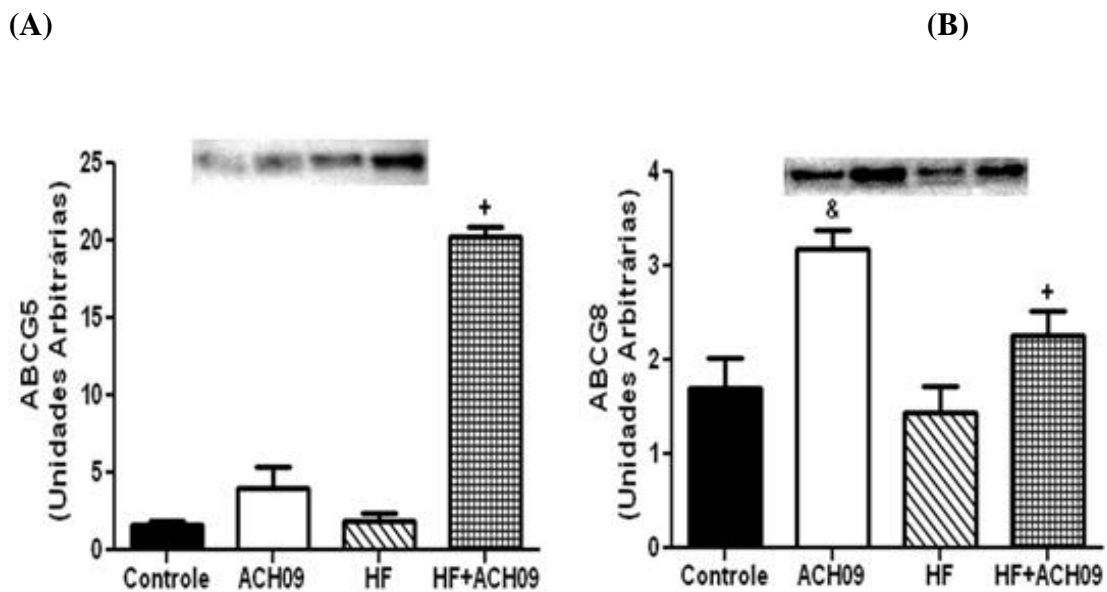
Legendo: Efeito de ACH09 na expressão das proteínas AMPK (A), pAMPK (B), HMG – CoAr (C). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 3 para cada grupo por western blot).
 *P<0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09; + P <0,05 em relação ao grupo HF;
 #P<0,05 em relação ao grupo Controle.

Fonte: A autora, 2015

4.12 Expressão das proteínas envolvidas na excreção de colesterol no tecido hepático

A dieta hiperlipídica não modificou a expressão de ABCG5 e ABCG8 quando comparada aos controles. Entretanto, o tratamento com o ACH09 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a expressão das proteínas ABCG5 e ABCG8 no grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF e houve também um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão da proteína ABCG8 no grupo ACH09 em relação ao grupo Controle (Figura 20 A e B).

Figura 20 - Expressão das proteínas envolvidas na excreção de colesterol no tecido hepático



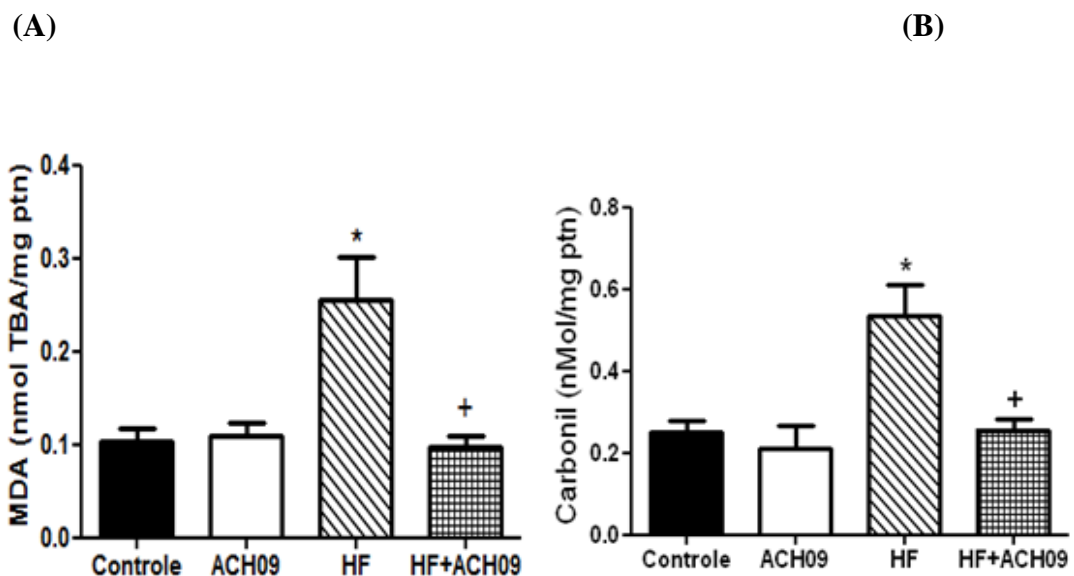
Legenda: Expressão de ABCG5 (A) e ABCG8 (B) em amostras de fígado dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 3$ para cada grupo por western blot). * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09; + $P < 0,05$ em relação ao grupo HF e & $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

Fonte: A autora, 2015

4.13 Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no tecido hepático

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na formação de subprodutos da peroxidação lipídica, o MDA e na carbonilação de proteínas em amostras de fígado do grupo HF, quando comparados com os animais do grupo Controle e ACH09. O tratamento com ACH09 reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de MDA e de carbonilação de proteínas no grupo HF+ACH09 quando comparado ao grupo HF (Figura 21 A e B).

Figura 21 - Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no tecido hepático



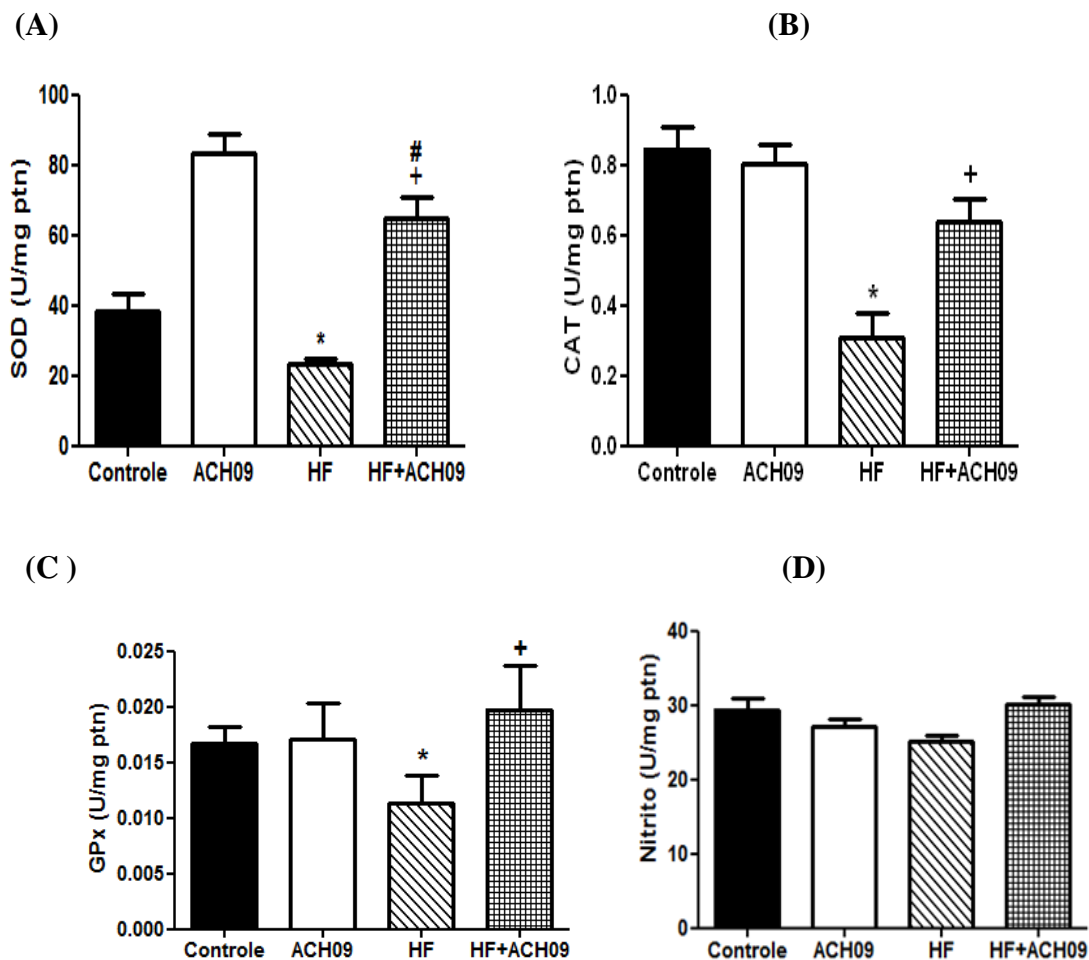
Legenda: Níveis de MDA (A) e carbonilação de proteínas (B) em amostras de fígado dos grupos Controle, ACH09, HF e HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n=10$ animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09 e $^+P < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

4.14 Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e os níveis de nitrito no tecido hepático

As atividades da SOD, CAT e GPx foram ($p < 0,05$) menores em amostras de fígado do grupo HF quando comparadas ao grupo Controle e ACH09. O tratamento preventivo com ACH09 aumentou significativamente ($p < 0,05$) as atividades destas enzimas no grupo HF+ACH09 em relação ao grupo HF e em relação ao grupo Controle (Figura 22A, B e C). Não houve diferença significativa nos níveis de nitrito entre os grupos (figura 22D).

Figura 22 - Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e os níveis de nitrito no tecido hepático



Legenda: Atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) e níveis de nitrito (D) em homogenato de fígado dos grupos Controle, ACH09, HF E HF+ACH09. Valores estão expressos como média \pm erro padrão, $n=3$ animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle e ACH09, + $P < 0,05$ em relação ao grupo HF e # $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

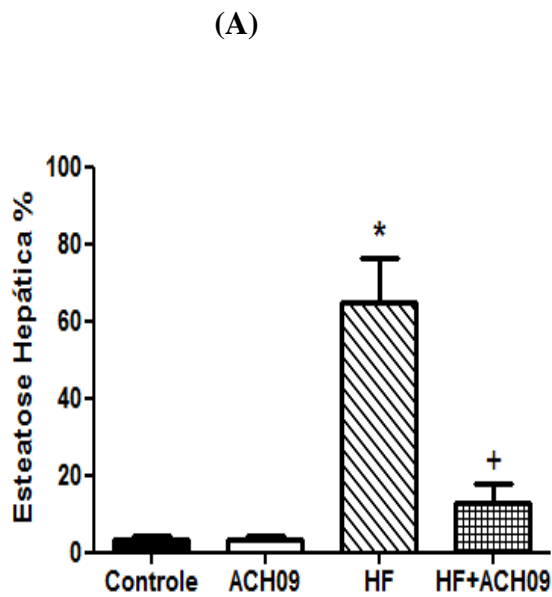
Fonte: A autora, 2015

4.15 Efeito do tratamento com ACH09 sobre a esteatose hepática

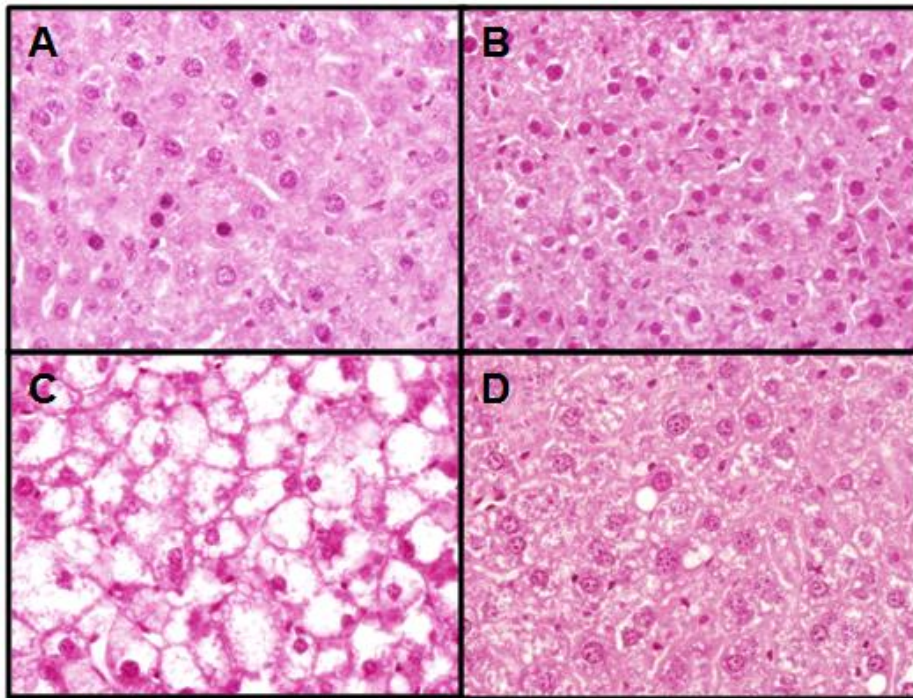
O consumo de dieta hiperlipídica durante 90 dias, determinou um aumento significativo (65,05%, $p < 0,05$) do volume de gordura hepática do grupo HF em relação ao grupo Controle (3,38%) e ACH09 (3,33%). O tratamento com o ACH09 reduziu significativamente (12,83%, $p < 0,05$) este parâmetro no grupo HF+ACH09 comparado ao grupo HF (Figura 23A).

Como verificado na (Figura 23B), a análise histológica do fígado pelo método de hematoxilina/eosina, evidenciou maior quantidade de gotículas de lipídios nos hepatócitos do grupo HF quando comparado aos Controles. Caracterizando um quadro de esteatose hepática. O tratamento preventivo com ACH09 reduz o conteúdo lipídico dos hepatócitos dos grupos HF+ACH09.

Figura 23- Efeito do tratamento com ACH09 sobre a esteatose hepática



(B)



Legenda: Análise quantitativa em % da Esteatose hepática (A). Cortes representativos do fígado corados com hematoxilina e eosina (B) Mesma ampliação em todas as imagens. Em (A) grupo Controle, (B) ACH09, (C) HF, (D) HF+ACH09. *P <0,05 em relação ao grupo Controle e ACH09 e ⁺P<0,05em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2015

5 DISCUSSÃO

Estudos prévios realizados pelo nosso laboratório demonstraram que o ACH09, um extrato hidro-alcoólico obtido da cascata de uva *vitis vinifera* e rico em polifenóis, possui atividade vasodilatadora dependente de endotélio e efeito anti-hipertensivo (Madeira *et al.*, 2009; Madeira *et al.*, 2005; Soares de Moura *et al.*, 2002). Em virtude do aumento da prevalência da obesidade e fatores de risco associados, como a RI e dislipidemia (Putnam *et al.*, 2012), e resolvemos investigar essas alterações e suas graves consequências para o fígado, como a esteatose hepática, em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica e o efeito do ACH09 sobre estas alterações.

Nos animais do grupo HF, o consumo de alto teor de gordura da dieta hiperlipídica conferiu aos camundongos obesidade (balanço energético positivo), pois a partir do 30^o dia de tratamento houve um aumento significativo do peso corporal desse grupo em relação ao grupo Controle. Nossos resultados demonstram ainda que o grupo hiperlipídico, durante o fornecimento da dieta, consumiu maior quantidade de ração e recebeu uma grande quantidade de energia e, conseqüentemente, apresentou, não só um peso maior após o término do período de estudo, como também um aumento da massa de gordura visceral. Estes dados corroboram estudos anteriores que observaram a suscetibilidade do camundongo C57BL/6 alimentado com uma dieta com 60% de gordura em desenvolver obesidade (de Oliveira *et al.*, 2010b; Gallou-Kabani & Junien, 2005), assim como, outros modelos animais de desordens metabólicas utilizando dietas ricas em gordura (Buettner *et al.*, 2007). No presente estudo demonstramos que o tratamento preventivo com o ACH09 reduziu significativamente o peso corporal e a massa de gordura visceral do grupo HF+ACH09 comparado ao HF, o que confirma os achados de (Park *et al.*, 2008), que ao estudarem o extrato da semente da uva, mostraram um efeito protetor no ganho de peso de animais submetidos a dietas hiperlipídicas e a utilização de ácidos graxos saturados como fonte predominante de lipídeos, sendo associada não somente à obesidade, mas também ao desenvolvimento de RI, intolerância a glicose e desordens no metabolismo de lipoproteínas (Lima *et al.*, 2000).

No quadro de hiperlipidemia ocorre um acúmulo de lipídeos no fígado, a partir da diminuição da beta-oxidação hepática. Os TG são sintetizados principalmente, a partir dos ácidos graxos dietéticos. No entanto, os ácidos graxos da lipólise dos depósitos de TG do tecido adiposo são liberados para o fígado, sendo captados pelos hepatócitos e convertidos em TG, configurando o processo de lipogênese hepática (Jou *et al.*, 2008). Por isso, corroborando

com os dados da literatura, foi demonstrado neste estudo que os animais HF, apresentaram hepatomegalia com um aumento significativo do peso e volume do tecido.

No presente estudo demonstramos que os animais HF desenvolveram hiperglicemia, hiperinsulinemia, diminuição da sensibilidade à insulina, e elevado HOMA-IR, o que está de acordo com trabalhos previamente publicados (Buettner *et al.*, 2007; Gallou-Kabani & Junien, 2005; Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2009), demonstrando que uma dieta com alto teor de gordura é capaz de induzir hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI. A intolerância à glicose vista no grupo HF pode ser desencadeada por um aumento na secreção de insulina para compensar a hiperglicemia. Porém, a concentração plasmática de glicose continua a subir, pela diminuição da captação por tecidos periféricos e pelo aumento da produção de glicose hepática (Velloso *et al.*, 2008).

Além disso, observamos alteração na sinalização da insulina no fígado, confirmada pela redução do conteúdo de pIRS1, PI3K, e pAKT. De modo semelhante, Araújo e colaboradores em 2007, observaram alterações em todas as etapas da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Nos animais obesos, verificamos que há um aumento da expressão do IR que pode estar relacionado aos elevados níveis de insulina circulantes, sugerindo que essa possa ser uma tentativa de ligação ao hormônio em questão para que o mesmo possa exercer seus efeitos biológicos. Apesar de haver aumento do número de receptores IR, os dados indicam não ocorrer a ativação da cascata de sinalização de insulina culminando com a redução da translocação do GLUT2 para a membrana, promovendo a hiperglicemia encontrada neste estudo.

O tratamento preventivo com o ACH09 aumentou significativamente a expressão das proteínas envolvidas na cascata de sinalização de insulina (pAKT, pIRS-1, PI3-K e GLUT-2). Portanto, o efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperinsulinêmico do ACH09 deve-se em grande parte ao aumento da expressão das proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina no fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, proporcionando uma melhora da sensibilidade à insulina. Esta hipótese é reforçada por estudos recentes de nosso laboratório, que comprovaram que o ACH09, atua sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização de insulina em músculo esquelético de animais com diabetes induzida por aloxano (Soares de *et al.*, 2012) e em modelo de programação metabólica com dieta hiperlipídica durante a lactação (Resende *et al.*, 2013).

Além disso, a insulina é um hormônio que exerce efeito antioxidante pela supressão da geração de EROs. Entretanto, com o prejuízo na ação da insulina, provocado pela resistência a este hormônio, quadro frequentemente encontrado em obesos, pode ocorrer aumento das

EROs(Dandona *et al.*, 2005). Esse quadro foi observado no presente estudo, em que houve, não só o aumento significativo nos níveis de MDA em amostras de fígado do grupo hiperlipídico, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica, como também o aumento da carbonilação de proteínas, processo em que as proteínas sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EROs, e que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais(Yu, 1994).Outro aspecto que corrobora esse achado é a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, observada no fígado dos camundongos que receberam dieta hiperlipídica. Há evidências que sugerem que o estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo precede o aparecimento da RI e obesidade induzidas pela dieta hipelipídica(Kadowaki *et al.*, 2006).

O aumento de EROs pode ocasionar a ativação da cascata da insulina via fosforilação em serina e inibir em tirosina. As formas do substrato de insulina (IRS) fosforilada em serina/treonina são menos capazes de se associar ao receptor de insulina e as proteínas subsequentes na cascata de sinalização, como a PI3-K, resultando em prejuízo na ação da insulina, incluindo a ativação da AKT e captação de glicose(Evans, 2007). Esse prejuízo pode levar a ativação da Glicogênio-sintase-quinase3 (GSK3), e uma menor atividade da enzima glicogênio sintase, diminuindo assim, a quantidade de glicogênio hepático, observado no grupo hiperlipídico do presente estudo.

O efeito antioxidante do ACH09 observado neste estudo, pela redução do dano oxidativo e aumento da atividade enzimática antioxidante no tecido hepático, deve contribuir para a redução da RI nos animais obesos.Sabe-se que os polifenóis podem melhorar a RI aumentando a biodisponibilidade de NO e diminuindo a formação de EROs(Grassi *et al.*, 2008). (Hogan *et al.*, 2010) demonstraram que o extrato de uva apresenta atividades antioxidantes e anti-hiperglicêmica proporcionada por compostos bioativos podendo contribuir para o tratamento de alterações metabólicas, onde se observou a melhora do quadro de hiperglicemia.

Foi observado no presente estudo que os animais HF apresentaram acúmulo de TG, CT e hepático significativamente maior que nos animais do grupo Controle, confirmando resultados anteriores obtidos no mesmo modelo experimental (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Hoffler *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2009). A explicação convencional para esse quadro é que a obesidade e a RI alteram a síntese e o transporte de TG, além de aumentar a taxa de lipólise no tecido adiposo e o transporte de AGL para dentro do fígado(Milanski *et al.*, 2009).

Em nosso estudo demonstramos que o tratamento preventivo com o ACH09 reduziu significativamente os níveis de TG, CT e hepático do grupo HF+ACH09 comparado ao

HF. Provavelmente esse efeito se deve aos polifenóis (antocianinas) presentes no extrato, uma vez que protegem a prole adulta de ratas submetidas à dieta com alto teor de gordura durante a lactação, reduzindo os níveis de TG na fase adulta (Emiliano *et al.*, 2011).

A remoção do excesso de colesterol do corpo é imprescindível para a manutenção da sua homeostase. Os transportadores ABCG5 e ABCG8 são responsáveis pelo efluxo do colesterol na bile (de Souza *et al.*, 2012). No presente estudo verificamos que apesar de não haver uma correlação entre a expressão dos transportadores e o conteúdo de colesterol hepático no grupo hiperlipídico, o tratamento com ACH09 aumentou a expressão de ambos os transportadores, sugerindo que o extrato possa interferir com o transporte de colesterol no fígado.

Também foi demonstrado no presente estudo que os animais do grupo HF apresentaram hepatomegalia e esteatose hepática associadas ao acúmulo de TG. A explicação convencional para esse quadro é que a obesidade e a RI alteram a síntese e o transporte de TG, além de aumentar a taxa de lipólise no tecido adiposo e o transporte de AGL para dentro do fígado (Milanski *et al.*, 2012).

É amplamente aceito que o excesso nutricional, principalmente através do consumo de uma dieta rica em gordura saturada, pode ocasionar danos ao fígado pelo acúmulo de colesterol e TG hepáticos (Hawley *et al.*, 2002). A enzima HMGCoA redutase é o principal ponto de regulação na via de síntese do colesterol (Nelson & Cox, 2006). A atividade dessa enzima pode ser regulada pela proteína AMPK, que em seu estado fosforilado e ativo, promove inativação da enzima HMGCoA-redutase (Hardie *et al.*, 2006). Um estudo recente, realizado em camundongos alimentados com uma dieta com 60% de gordura durante 5 semanas, demonstrou um aumento significativo da expressão e da atividade da enzima HMGCoA redutase, que pode desempenhar um importante papel no acúmulo de colesterol no fígado (Tao *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 1999).

No fígado, a AMPK tem um papel essencial sobre diversas cascatas celulares. No presente estudo, a ingestão de dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo da expressão da proteína AMPK não fosforilada e uma menor expressão da AMPK fosforilada no grupo HF em relação ao grupo Controle. De acordo com a literatura, na obesidade a proteína AMPK se encontra na sua forma desfosforilada, ou seja, inativa resultando na ativação de enzimas metabólicas como a ACC e a HMG CoA-R, levando a um aumento da lipogênese hepática (Rosen & Spiegelman, 2001). O tratamento preventivo com o ACH09 reduziu significativamente a expressão da AMPK e aumentou a expressão da forma fosforilada no grupo HF+ACH09 em relação ao HF. Estes dados sugerem que em animais obesos ocorre

uma redução da regulação negativa exercida pela pAMPK sobre a síntese de colesterol, resultando no aumento significativo do colesterol hepático, que é corrigida pelo ACH09.

A AMPK controla dois dos mais importantes reguladores metabólicos celulares. Essa proteína fosforila e inibe a atividade da ACC, limitando dessa forma a enzima que atua na síntese de ácidos graxos (Carling *et al.*, 2008) e promove a ativação do peroxissoma proliferador-ativado do receptor gama coativador-1- α (PGC-1 α), que controla a expressão de genes relacionados com a oxidação de lipídeos e com a biogênese mitocondrial (Wu *et al.*, 1999). Desta forma, ocorre redução da produção de TG e aumentada oxidação de ácidos graxos, ocasionando a redução do conteúdo lipídico do fígado. Esses achados corroboram com os resultados do presente estudo, pois observamos uma redução significativa na expressão da proteína pACC no grupo HF comparado ao Controle.

Portanto, muitos indivíduos com obesidade e RI apresentam esteatose hepática, que pode ser causada pelo acúmulo de SREBP-1c, em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. De maneira semelhante, os níveis de SREBP-1c estão elevados no fígado de camundongos *ob/ob* (Edwards *et al.*, 2000). Corroborando com esses dados da literatura, há um aumento na expressão dessa proteína e redução da expressão da enzima pACC (forma inativa de ACC), no grupo HF. Portanto, conclui-se que o aumento dos níveis de insulina aumenta a ativação de SREBP-1c e a redução da pAMPK leve a redução da pACC. Conseqüentemente, o aumento da atividade da ACC não fosforilada (forma ativa) resulta no aumento da lipogênese. Apesar de não ter sido observado aumento da enzima FAS no grupo HF, estudos demonstram que a dieta rica em lipídios saturados ocasiona uma maior expressão de enzimas lipogênicas. (Soyet *et al.*, 2014).

O tratamento preventivo com o ACH09 reduziu significativamente a expressão da SREBP-1c nos animais obesos. Bose e colaboradores (2008) demonstraram que a catequina extraída do chá verde diminuiu de forma significativa os triglicerídeos hepáticos em camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta hiperlipídica sugerindo que a catequina apresenta um efeito benéfico contra o acúmulo de lipídios nos hepatócitos.

Diversos estudos têm buscado identificar compostos antioxidantes naturais como os presentes em alimentos e plantas medicinais, segundo o formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Anvisa, 2011).

Outro ponto importante da regulação do metabolismo lipídico no fígado é a função oxidativa da mitocôndria. Vários estudos em modelos animais apontam para uma importante relação entre acúmulo de triglicerídeos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Perez-Carreras *et al.*, 2003). Acredita-se que a hiperglicemia e elevados níveis de ácidos graxos

saturados podem promover maior ativação da enzima pro-oxidante, NADPH oxidase e consequentemente maior geração de EROs (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005). As mitocôndrias continuamente expostas a altos níveis de EROS podem sofrer consequências deletérias, como dano na cadeia respiratória, no genoma mitocondrial e nos lipídios e proteínas de membrana (Ricci *et al.*, 2008). Essas alterações estruturais e funcionais nas mitocôndrias podem contribuir para a redução das atividades realizadas por essa organela como a beta oxidação levando a um maior acúmulo de AGL (Rector *et al.*, 2010). Associado a este processo há uma menor formação de enzimas antioxidantes (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005) levando a um desequilíbrio entre formação de EROS e proteção antioxidante caracterizando o estresse oxidativo.

O dano oxidativo e a menor atividade das enzimas antioxidantes observados no presente estudo podem estar relacionados à disfunção mitocondrial contribuindo significativamente para o acúmulo de gordura no fígado do grupo de camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005).

O efeito do ACH09 na redução dos níveis de TG parece envolver sua ação antioxidante. As EROs afetam o metabolismo da insulina resultando em RI e consequentemente desencadeiam uma série de anormalidades, como maior expressão de genes lipogênicos levando a maior síntese de ácidos graxos (Shimomura *et al.*, 1999). O tratamento com ACH09 foi capaz de melhorar o sistema de defesa antioxidante e de reduzir o dano oxidativo de forma expressiva, como demonstrado anteriormente em modelo de programação metabólica (Emiliano *et al.*, 2011), o que provavelmente levou a uma melhora na sensibilidade insulínica. Estes dados corroboram com um estudo anterior que avaliou o efeito do polifenol extraído da lichia sobre o estresse oxidativo e metabolismo lipídico em um modelo de DM2, onde foi observada uma redução significativa da peroxidação lipídica, tanto no plasma quanto no fígado, assim como, do conteúdo lipídico hepático e da expressão da enzima SREBP-1c (Dulloo, 2009).

Em 2008, Park *et al.*, investigaram a influência do extrato da casca de uva rico em polifenóis (GSE) sobre a esteatose hepática em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e constataram que a suplementação com GSE reduziu significativamente os lipídeos hepáticos e inverteu as alterações induzidas pela dieta hiperlipídica na expressão de genes envolvidos na lipogênese e na β -oxidação no fígado.

O tratamento com antioxidantes tem sido uma forma relevante de prevenir ou tratar as complicações geradas pela obesidade e dentre os mais utilizados são os flavonoides, pois são

capazes de inibir a formação de EROs, eliminar as espécies reativas excedentes, e aumentar ou proteger as fontes de defesas antioxidantes (Halliwell B., 2007).

CONCLUSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito do ACH09 nas alterações hepáticas, em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Pode-se concluir que o tratamento com ACH09 foi eficaz em reduzir a massa corporal, sensibilidade à insulina, acúmulo de colesterol e triglicérideo hepático.

Assim, o estudo sugere que o ACH09 atenua o remodelamento adverso no fígado de camundongos obesos com esteatose hepática e RI induzidas por dieta.

Os principais mecanismos propostos para os efeitos benéficos decorrentes do tratamento com ACH09 são os seguintes: resulta em redução no ganho de massa corporal – balanço energético negativo; restauração da sinalização da insulina (via IRS-1/PI3-K/pAkt) no fígado; redução da lipogênese (redução da expressão de SERBP-1c e maior expressão de pAMPK); aumento da excreção de colesterol pelos transportadores ABCG5 e ABCG8 e efeito antioxidante.

Portanto, o ACH09 pode modular a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina, assim como, as envolvidas na via da lipogênese, e na homeostase do colesterol. O aumento da sensibilidade à insulina e a ação antioxidante devem exercer um papel central nos efeitos do ACH09. Este estudo abre uma possibilidade para a utilização do ACH09, na prevenção e tratamento das alterações metabólicas associadas à obesidade.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
- Al rajabi A, Castro GSF, da Silva RP, *et al.* Supplementation Protects against Liver Damage by Normalizing Cholesterol Metabolism in Pemt/Ldlr Knockout Mice Fed a High-Fat Diet. *J Nutr* 2013.
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, *et al.* Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 2012; 108 (9):1532-49.
- Anvisa. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 126p. Anvisa 2011.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987; 32:279-312.
- Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *Int J Med Sci* 2007; 4 (1):53-8.
- Begrache K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6 (1):1-28.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7 (8):947-53.
- Borba AJ, Rocha MGM, Silva MF, *et al.* Low-carbohydrate diet used for weight loss induces obesity in rats. *Rev Nutr* 2011; Vol 24.
- Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296 (4):E581-E591.
- Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem* 1997; 272 (47):29698-703.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15 (4):798-808.
- Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, *et al.* Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2002; 13 (8):444.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296 (5573):1655-7.
- Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32 Suppl 4:S55-S59.

Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 2005; 19 (1):136-8.

Cataneo C, Carvalho AMP, Galindo MC. Obesity and psychological aspects: emotional and cognitive development, self concept, locus of control and anxiety. *Psic : Refl Crít* 2005; 18(1):39-46.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55 (6):2005-23.

Chang CP, Huang WT, Cheng BC, Hsu CC, Lin MT. The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke. *Neuropharmacology* 2007; 52 (3):1024-33.

Chen ZY, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (19):8761-73.

Cheng T, Zhu Z, Masuda S, Morcos NC. Effects of multivitamin supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *J Nutr Biochem* 2001; 12 (7):388-95.

Cotrim HP, Parana R, Braga E, Lyra L. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history? *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (10):3018-9.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378 (6559):785-9.

Curin Y, Ritz MF, Andriantsitohaina R. Cellular mechanisms of the protective effect of polyphenols on the neurovascular unit in strokes. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006; 4 (4):277-88.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111 (11):1448-54.

Davies KM. Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutat Res* 2007; 622 (1-2):122-37.

Day CP. Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis. *Gastroenterology* 2005; 129 (1):375-8.

de Moura RS, Resende AC, Moura AS, Maradei MF. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertens Pregnancy* 2007; 26 (1):89-100.

de Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, *et al.* Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010a; 56 (6):619-26.

- de Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, *et al.* Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010b; 56 (6):619-26.
- de Souza MO, Souza E Silva, de Brito Magalhaes CL, *et al.* The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res* 2012; 32 (12):976-84.
- Dindo D, Muller MK, Weber M, Clavien PA. Obesity in general elective surgery. *Lancet* 2003; 361 (9374):2032-5.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.
- Dulloo AG. Adipose tissue plasticity in catch-up-growth trajectories to metabolic syndrome: hyperplastic versus hypertrophic catch-up fat. *Diabetes* 2009; 58 (5):1037-9.
- Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529 (1-3):103-13.
- Emiliano AF, de Cavalho LC, da Silva CC, V, *et al.* Metabolic disorders and oxidative stress programming in offspring of rats fed a high-fat diet during lactation: effects of a vinifera grape skin (ACH09) extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 58 (3):319-28.
- Evans JL. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? *Indian J Med Res* 2007; 125 (3):355-72.
- FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. In: 1997.
- Flamini R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. *Mass Spectrom Rev* 2003; 22 (4):218-50.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105:114-21.
- Folli F, Okada T, Perego C, *et al.* Altered insulin receptor signalling and beta-cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6 (11):e28050.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50 (2):216-29.
- Foretz M, Pacot C, Dugail I, *et al.* ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (5):3760-8.
- Fruhbeck G. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr Rev* 2002; 60 (10 Pt 2):S47-S55.
- Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005; 54 (7):1899-906.

- Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15 (8):1996-2005.
- Galvano F, La FL, Vitaglione P, *et al.* Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43 (4):382-93.
- Garcia-Beneytez E, Cabello F, Revilla E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (19):5622-9.
- Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 (2):200-8.
- Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Unexplained CK elevations in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26 (7):899-900.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL, Mira L, Corvo ML. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Curr Med Chem* 2008; 15 (16):1586-605.
- Graf GA, Yu L, Li WP, *et al.* ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 2003; 278 (48):48275-82.
- Grassi D, Aggio A, Onori L, *et al.* Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *J Nutr* 2008; 138 (8):1554S-60S.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126 (1):131-8.
- Halliwell B. *GJMC. Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, 2007.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31 (4):261-72.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006; 574 (Pt 1):7-15.
- Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16 (4):230-6.
- Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003a; 4 (2):51-61.
- Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003b; 98 (9):2042-7.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96 (2-3):67-202.

- Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 2002; 51 (8):2420-5.
- Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1203:120-5.
- Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, *et al.* Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine* 2009; 36 (2):311-25.
- Hogan S, Zhang L, Li J, *et al.* Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7:71.
- Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330 (6):280-9.
- Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28 (4):370-9.
- Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014; 15 (4):6184-223.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116 (7):1784-92.
- Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, *et al.* Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355 (23):2427-43.
- Karim S, Adams DH, Lalor PF. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (46):6771-81.
- Keller KB, Lemberg L. Obesity and the metabolic syndrome. *Am J Crit Care* 2003; 12 (2):167-70.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346 (6):393-403.
- Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11 (8):1041-64.
- Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28 (1):27-38.
- Kubota N, Yano W, Kubota T, *et al.* Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; 6 (1):55-68.
- Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28 (4):339-50.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-78.

Lima FEL, Menezes TN, Tavares MP, Szarfacs SC, Fisberg RM. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev Nutr* 2000; Vol 13.

Lin LY, Peng CC, Yang YL, Peng RY. Optimization of bioactive compounds in buckwheat sprouts and their effect on blood cholesterol in hamsters. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (4):1216-23.

Liu CL, Chen YS, Yang JH, Chiang BH. Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* moench) buckwheat sprouts. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (1):173-8.

Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14 (4):840-60.

Madeira SV, Auger C, Anselm E, *et al.* eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. *J Vasc Res* 2009; 46 (5):406-16.

Madeira SV, de Castro RA, Ognibene DT, de Sousa MA, Soares de MR. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. *Pharmacol Res* 2005; 52 (4):321-7.

Masella R, Di BR, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16 (10):577-86.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, *et al.* Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 2008; 57 (8):1071-7.

Mattivi F, Zulian C, Nicolini G, Valenti L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957:37-56.

Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med* 2006; 6 (5):501-14.

Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52 (4):673-751.

Milanski M, Arruda AP, Coope A, *et al.* Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 2012; 61 (6):1455-62.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009; 29 (2):359-70.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde - Brasília. In: -136, 2013.

- Mosley JW, Aach RD, Hollinger FB, *et al.* Non-A, non-B hepatitis and antibody to hepatitis C virus. *JAMA* 1990; 263 (1):77-8.
- Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, *et al.* Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine* 2012; 19 (3-4):262-9.
- Nelson DL, Cox MM. Biossíntese do colesterol, dos esteróides e dos isoprenóides. In: Lehninger, Ed. *Princípios de Bioquímica*. 2006.
- Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev* 2006; 27 (3):242-59.
- NUNES, E. P. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Aquisição alimentar domiciliar per capita Brasil e Grandes Regiões. In: -282, 2010.
- Paradis V PGBFDDPBVMeal. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001 34:738-44. *Hepatology* 2011; Vol 34.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2:S170-S180.
- Park SH, Park TS, Cha YS. Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Nutr Res Pract* 2008; 2 (4):227-33.
- Perez-Carreras M, Del HP, Martin MA, *et al.* Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38 (4):999-1007.
- Pimentel-Souza JDR, Souza DS, Gualberto NC, *et al.* Qualidade funcional da infusão do chá verde comercial. *Rev Nutr* 2012; Vol 25.
- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118 (3):829-38.
- Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302 (6):H1219-H1230.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113 (3):189-207.
- Ratzliff V, Giral P, Charlotte F, *et al.* Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118 (6):1117-23.
- Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, *et al.* Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol* 2010; 52 (5):727-36.
- Reifsnyder PC, Leiter EH. Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice. *Diabetes* 2002; 51 (3):825-32.

- Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, *et al.* Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2):240-5.
- Resende AC, Emiliano AF, Cordeiro VS, *et al.* Grape skin extract protects against programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal high-fat diet during lactation. *J Nutr Biochem* 2013; 24 (12):2119-26.
- Ricci C, Pastukh V, Leonard J, *et al.* Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294 (2):C413-C422.
- Romero CEM, Zanesco A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev Nutr* 2006; 19:85-91.
- Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001; 276 (41):37731-4.
- ROSS D, MOLDEUS P. Antioxidants defense system and oxidative stress. Membrane lipid oxidation 1991.
- Ryan JM, Revilla E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (11):3372-8.
- Sabarense CMS, Peluzio MCGLICNMB, Peluzio MCG. Nutrição básica e metabolismo. Ed UFV 2008:155-81.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414 (6865):799-806.
- Sartorelli DS, Franco LJ. Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition. *Cad Saude Publica* 2003; 19 Suppl 1:S29-S36.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, *et al.* Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001; 50 (10):2199-202.
- Shetty S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30 (5):234-9.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, *et al.* Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (24):13656-61.
- Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, *et al.* Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54 (11):1515-20.
- Soares de MR, da Costa GF, Moreira AS, *et al.* Vitis vinifera L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64 (2):268-76.
- Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, *et al.* Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration

- precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2002; 51 (6):1884-8.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, *et al.* Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004; 500 (1-3):299-313.
- Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res* 2013; 47 (11):869-80.
- Sun j, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 2003; 3:276-84.
- Sun T, Powers JR, Tang J. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. *J Food Sci* 2007; 72 (4):S267-S271.
- Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351 (1336):191-9.
- Suzuki A, Lindor K, St SJ, *et al.* Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2005; 43 (6):1060-6.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7 (2):85-96.
- Tao R, Ye F, He Y, *et al.* Improvement of high-fat-diet-induced metabolic syndrome by a compound from *Balanophora polyandra* Griff in mice. *Eur J Pharmacol* 2009; 616 (1-3):328-33.
- Targher G, Bertolini L, Scala L, *et al.* Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17 (7):517-24.
- Thorens B, Charron MJ, Lodish HF. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 1990; 13 (3):209-18.
- Tolman KG, Fonseca V, Tan MH, Dalpiaz A. Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141 (12):946-56.
- Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37 (8):1263-73.
- Turner R, Lozoya O, Wang Y, *et al.* Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 2011; 53 (3):1035-45.
- Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4:S28-S32.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 (1):44-84.

- van der Poorten D, Milner KL, Hui J, *et al.* Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008; 48 (2):449-57.
- van Raalte DH, Diamant M. Glucolipototoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93 Suppl 1:S37-S46.
- Van OE. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* 1994; 37 Suppl 2:S125-S134.
- Vanzo A, Terdoslavich M, Brandoni A, *et al.* Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52 (10):1106-16.
- Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 2008; 39 (8):715-28.
- Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15 (3):189-93.
- Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, *et al.* Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J Hepatol* 2011; 54 (2):348-56.
- Wang H, Race EJ, Shrikhande AJ. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (7):1839-44.
- Weibel ER. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1979; 15 (5):999-1013.
- WHO. World Health Organization. In: 2003.
- Willner IR, Waters B, Patil SR, *et al.* Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (10):2957-61.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98 (1):115-24.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, *et al.* Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413 (6852):131-8.
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH, *et al.* Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (5):2300-8.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74 (1):139-62.
- Yu L, Gupta S, Xu F, *et al.* Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2005; 280 (10):8742-7.
- Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, *et al.* Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (16):4694-700.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, *et al.* AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 2004; 279 (46):47898-905.

ZECCHIN HG, CARVALHEIRA JBC, SAAD MJA. Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica. *Rev. Soc. Cardiol Estado de São Paulo* v.14, p.574-89, 2004. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2004; Vol 14.

Zhang Z, Li Q, Liu F, Sun Y, Zhang J. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPARalpha, orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010; 42 (3):202-8.

Zhou G, Myers R, Li Y, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108 (8):1167-74.