



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

Graziele Freitas de Bem

**Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela estreptozotocina e pela dieta hiperlipídica em ratos Wistar**

Rio de Janeiro

2015

Graziele Freitas de Bem

**Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela estreptozotocina e pela dieta hiperlipídica em ratos Wistar**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2015

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

B455 Bem, Grazielle Freitas de.  
Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela estreptozotocina e pela dieta hiperlipídica em ratos Wistar / Grazielle Freitas de Bem. – 2015.  
165 f.

Orientador: Roberto Soares de Moura.  
Coorientadora: Angela de Castro Resende.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Diabetes Mellitus Tipo 2 - Teses. 2. Euterpe - Teses. 3. Exercícios Físicos - Teses. 4. Resistência à insulina - Teses. 5. Dislipidemia - Teses. 6. Açaí - Uso terapêutico - Teses. I. Moura, Roberto Soares de. II. Resende, Angela de Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.379-008.64

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

---

Assinatura

---

Data

Graziele Freitas de Bem

**Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela estreptozotocina e pela dieta hiperlipídica em ratos Wistar**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2015.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Antonio Cláudio Lucas da Nóbrega

Universidade Federal Fluminense

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lúcia Pedrosa

Universidade Federal de Ouro Preto

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliete Bouskela

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

## **DEDICATÓRIA**

À minha querida família, por serem minha força, equilíbrio, porto seguro em todos os momentos de minha vida. Sem vocês, seus sacrifícios, sábios conselhos, amizade e amor eu não chegaria aqui, muito obrigada pelo apoio para a realização do sonho de estudar na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, possibilitando hoje alcançar o título de doutora em Biociências. Tudo que sei e sou devo a vocês, meus maiores tesouros. Obrigada é pouco para exprimir a minha gratidão por tudo, então simplesmente direi que eu amo muito vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me fazer sua imagem e semelhança, amor infinito e perfeito. Alegro-me e espero em ti Senhor, Aquele que sabe de todas as coisas e deu sua vida por mim.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Roberto Soares de Moura pela orientação, amizade, por seu entusiasmo contagiante, incessante busca por saber que nos faz querer investigar cada vez mais, por todo apoio, por suas colocações essenciais para o desenvolvimento desse estudo e pelo aprendizado que me proporcionou durante o doutorado. Muito obrigada por ter aceitado a minha orientação possibilitando a realização desse sonho.

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup>. Angela de Castro Resende pela orientação, amizade, por todo apoio, incansável na melhor execução de nossas atividades no dia-a-dia, sempre pronta a ensinar e a aprimorar nossas habilidades acadêmicas, possibilitando a formação de um olhar crítico sobre nossos projetos, a fim de, aprimorá-los. Muito obrigada por sua dedicação, por todas as oportunidades concedidas proporcionando o meu crescimento acadêmico e científico, enfim, por todo aprendizado que me proporcionou durante o doutorado.

*In memoriam* à Professora Dr<sup>a</sup> Tania Tano, que me orientou durante toda a iniciação científica, fazendo com que eu me apaixonasse pela pesquisa e conhecesse as técnicas e os procedimentos de laboratório, que mais tarde me levariam a fazer mestrado. Nunca me esquecerei da sua alegria contagiante, otimismo, compreensão, aptidão e prontidão para ensinar. Não poderia deixar de lembrá-la e homenageá-la!!!

Agradeço ao Professor Alexandre Fonseca pela indicação para receber bolsa de estudos no pré-vestibular do Colégio e Curso LAF, que possibilitou meu ingresso na UERJ, o primeiro passo para a conquista desse tão almejado título. Sou muito grata por todos os ensinamentos e por sua amizade. Muito obrigada por tudo!!!

Ao meu pai Ariovaldo Lacerda de Bem, um exemplo de vida, forte, determinado, meu tesouro, colocando meus sonhos sempre em primeiro lugar, não medindo esforços para realizá-los, essa conquista só foi possível, pois você acreditou em mim e não me deixou desistir. Muito obrigada por todos os sacrifícios, dedicação, amor. Não posso colocar em palavras a admiração e

a gratidão que tenho. Devo minha vida, meus passos a você. Gordinho mais lindo do universo te amo!!!

À minha mãe Maria de Fátima Freitas de Bem, ninguém me amou mais que ela, me deu a vida. Aquela que com amor e carinho me acalentou em seu colo seguro, aconselhando-me, sempre ao meu lado, me educou, ensinou meus valores, protegeu, compartilhou minhas vitórias e chorou comigo quando eu caí. Mãezinha querida eu te amo e admiro pela grande mulher que és.

Agradeço à minha irmãzinha querida Shirlei Freitas de Bem, sempre ao meu lado, me compreende como ninguém, um olhar vale mais que mil palavras entre nós. Mesmo que distante participa de todos os momentos de minha vida. Muito mais do que uma irmã maravilhosa e dedicada, minha segunda mamãe. Te amo muito e essa vitória também é sua!!!!

Agradeço ao meu cunhado Luíz Francisco de Vasconcelos Duboc (Dudu), por fazer parte de nossa família, pelo carinho, dedicação, preocupação. Muito obrigada por não medir esforços para que me ajudar, te amo!!!

Agradeço ao meu noivo Rafael Bernardes Ávila Duboc, por todo amor, carinho, amizade, cumplicidade e companheirismo compartilhados. Obrigada pela paciência e compreensão durante o desenvolvimento e redação da tese, sempre com uma palavra de estímulo e perseverança, não me permitindo fraquejar, desanimar ou desistir. Não tenho como expressar a alegria que eu sinto por compartilhar a minha vida com você. Eu te amo muito!!!

Agradeço à Madalena Lacerda, pelo carinho, amizade, por toda ajuda ao longo do meu doutorado, você é parte integrante dessa família.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Lúcia Alves, Paola Raquel Braz de Oliveira, Dayane Teixeira Ognibene, Cristiane Aguiar da Costa, Izabelle Barcellos Santos, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Anicet Okinga, Gisele França, Ricardo Andrade, Douglas Val Quitans Nunes, Ana Paula Machado da Rocha, Marcelo Augusto Vieira de Souza, Elisa Bernardes, Renata da Silva e Elaine Soares pela colaboração e apoio durante o doutorado.

Um agradecimento mais que especial às amigas Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, parte integrante para a realização desse trabalho, sempre ao meu lado, mãezona. Lúcia Alves, o que seria de mim sem o seu carinho, preocupação, conselhos e dedicação. Cristiane Aguiar da Costa, muito mais que uma companheira de laboratório e colaboradora fantástica, uma amiga para todas as horas, muito obrigada por sua imprescindível contribuição para essa

realização. Izabelle Barcellos, muito obrigada por sua amizade, toda ajuda, pelos conselhos, pela paciência, pelas boas risadas e pelo apoio durante o doutorado. Amigas queridas vocês arrasam!!!

Agradeço à amiga Ellen Conceição, por sua colaboração, sempre solícita e pronta à ajudar, admiro muito a sua força de vontade e determinação, uma pesquisadora exemplar, muito criteriosa em tudo o que faz. Muito obrigada por tudo!!!

Agradeço aos amigos Mariana Alves de Sá Siqueira, Cristiane Matsuura, Natália Rodrigues Pereira, Marcela Anjos Martins, Ive Machareth Sab, Márcia Ferraz, Wanda Vianna Mury, Daniel Medeiros e a Iara Karise Mendes pela amizade e por todo apoio durante o doutorado.

Agradeço aos professores Julio Daleprane, Mariana Alves de Sá Siqueira e Cristiane Matsuura pela colaboração e solicitude durante o doutorado.

Agradeço aos amigos bioteristas Nelcir Rodrigues, Mariana Magalhães, Sílvia, Márcio e Gilson, que contribuíram muito para o bom andamento desse trabalho.

Um agradecimento especial à amiga Paula Fontoura, por tudo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Te amo!!!

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

Agradeço à FAPERJ, a CAPES e ao CNPQ pelo financiamento do projeto possibilitando sua realização e pela concessão da bolsa de doutorado indispensável para o meu desenvolvimento acadêmico.

**A TODOS**, o meu **MUITO OBRIGADO**, vocês foram essenciais para que eu pudesse alcançar mais uma etapa importante de minha vida.



Buscai em primeiro lugar a Deus e a sua justiça, e Deus dará em acréscimo, todas as coisas. Portanto, não vos preocupeis com o dia de amanhã, pois o dia de amanhã terá suas preocupações. Basta a cada dia a própria dificuldade.

*Mateus 6:33,34*

## RESUMO

BEM, Grazielle Freitas de. *Efeito do extrato de Euterpe oleracea Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela estreptozotocina e pela dieta hiperlipídica em ratos Wistar*. 2015. 165f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é uma das doenças mais prevalentes da atualidade. A condição metabólica central nesta patologia são as alterações glicêmicas e no metabolismo lipídico. Dados da literatura sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra o risco cardiometabólico. Outros estudos mostram que o açaí, fruto da *Euterpe oleracea* Mart., é rico em polifenóis e que o treinamento físico tem recebido crescente reconhecimento como um marco na prevenção e tratamento do DM2. Desta forma, o objetivo deste estudo foi ampliar nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), sobre as alterações fisiológicas, metabólicas, moleculares e morfológicas associadas ao modelo experimental de DM2 e avaliar se o exercício físico potencializa os efeitos do ASE. Dois grupos de ratos Wistar (180-200 g) foram alimentados com dietas experimentais: controle (10% de lipídeos); hiperlipídica (55% de lipídeos) durante cinco semanas. Na terceira semana o grupo hiperlipídico recebeu uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina ( $35 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Após ser constatada a hiperglicemia os animais receberam dieta padrão, o ASE ( $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por gavagem intragástrica e colocados para treinar em esteira rolante por um período de quatro semanas, sendo divididos em oito grupos: controle sedentário e treino (CS e CT), controle ASE sedentário e treino (CAS e CAT), diabético sedentário e treino (DS e DT) e diabético ASE sedentário e treino (DAS e DAT). Avaliou-se a massa corporal, parâmetros da atividade física, glicemia, insulinemia, resistência à insulina, reatividade vascular, citocinas pró-inflamatórias, perfil proteico da cascata de sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal (TAE) e no muscular esquelético, perfil proteico de proteínas associadas com síntese e secreção de lipídeos no fígado, dano oxidativo, atividade antioxidante enzimática, níveis de nitrito, acúmulo lipídico hepático, conteúdo de glicogênio e histologia hepática em animais diabéticos. O tratamento com ASE aumentou a distância percorrida e a duração da atividade física, durante o teste de esforço nos grupos CAT e DAT. A glicemia, insulina, resistência à insulina, os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , expressão da pJNK no TAE, a reatividade de artérias mesentéricas à norepinefrina, a disfunção endotelial, os níveis de MDA e a carbonilação de proteínas, o perfil lipídico sérico e os triglicerídeos e colesterol hepáticos, a expressão da AMPK, FAS, HMG CoA-R, SREBP-1c e MTP no fígado, e a esteatose hepática foram reduzidos pelo tratamento com ASE e o exercício físico em animais diabéticos. O tratamento com ASE e o exercício físico aumentaram a funcionalidade das células beta-pancreáticas (HOMA-B), os níveis de HDL colesterol, a atividade antioxidante enzimática (SOD, CAT e GPx), os níveis de nitrito, a expressão de pIRS-1, GLUT-4 e adiponectina no TAE e de IR no tecido muscular esquelético, o conteúdo de glicogênio hepático e a expressão de pAMPK, pACC e ABCG8 no fígado de animais diabéticos. O tratamento com ASE promoveu efeitos benéficos sobre as alterações ocasionadas pelo DM2. Demonstramos também que a associação do exercício físico ao tratamento potencializou os efeitos do ASE em muitos dos parâmetros estudados. A ação anti-hiperglicêmica, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias induzidas pelo ASE devem contribuir para o potencial terapêutico do extrato.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 2. *Euterpe oleracea* Mart. Exercício Físico. Resistência à Insulina. Dislipidemia.

## ABSTRACT

BEM, Grazielle Freitas de. *Effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extract and exercise training on the changes caused by type 2 diabetes induced by streptozotocin and the high fat diet in Wistar rats*. 2015. 165f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The type 2 diabetes mellitus (DM2) is one of the most prevalent diseases of our time. The central metabolic condition in this disease are disorders in glucose and lipid metabolism. Literature data suggest that a diet rich in polyphenols may be involved in protection against cardiometabolic risk. Other studies show that açai fruit of *Euterpe oleracea* Mart., is rich in polyphenols and that physical training has received increasing recognition as a landmark in the prevention and treatment of DM2. Thus, the aim of this study was to expand our knowledge of the mechanisms involved in the beneficial effects of treatment with hydroalcoholic extract of the seed of açai (ASE) on the physiological, metabolic, molecular and morphological changes associated with experimental model of DM2, and assess whether the physical exercise amplifies the effects of ASE. Two groups of Wistar rats (180-200 g) were fed experimental diets: control (10% fat) and high fat (HF) diet (55% fat) for 5 weeks. In the third week, HF group received an intraperitoneal injection of streptozotocin (35 mg kg<sup>-1</sup>), that increased blood glucose levels to more than 250/100 mL. The animals received control diet, ASE (200 mg/kg-1) by intragastric gavage and training on a treadmill for a period of four weeks, and were divided into eight groups: sedentary control and training (SC and TC) sedentary control and training treated with ASE (SCA and TCA), sedentary diabetic and training (SD and TD) and sedentary diabetic and training treated with ASE (SDA and TDA). We evaluated the body weight, parameters of physical activity, blood glucose, insulin, insulin resistance, vascular reactivity, pro-inflammatory cytokines, protein profile of insulin signaling cascade in epididymal adipose tissue (EAT) and skeletal muscle, protein profile of proteins associated with lipid synthesis and secretion in the liver oxidative damage, antioxidant enzyme activity, levels of nitrite, hepatic lipid accumulation, glycogen content and liver histology in diabetic animals. Treatment with ASE increased the distance traveled and the duration of physical activity during the stress test in TCA and TDA groups. Blood glucose, insulin, insulin resistance, serum levels of TNF- $\alpha$ , pJNK expression in EAT, the reactivity of mesenteric arteries with norepinephrine, endothelial dysfunction, MDA levels and protein carbonylation, serum lipid profile and liver cholesterol and triglycerides, the expression of AMPK, FAS, HMG CoA R, SREBP-1c and MTP in liver, and hepatic steatosis were reduced by treatment with ASE and physical exercise in diabetic animals. Treatment with ASE and exercise training increased the functionality of pancreatic beta cells (HOMA-B), HDL cholesterol levels, enzymatic antioxidant activity (SOD, CAT and GPX), nitrite levels, the expression of pIRS- 1, GLUT-4 and adiponectin in EAT and IR in skeletal muscle tissue, liver glycogen content and the expression of pAMPK, pACC and ABCG8 in the liver of diabetic animals. Treatment with ASE promotes beneficial effects on the changes caused by DM2. They also demonstrate that the association of physical exercise with the treatment amplifies the effects of ASE in many of the parameters studied. The antihyperglycemic action, the antioxidant and anti-inflammatory properties induced by ASE must contribute to the therapeutic potential of the extract.

**Keywords:** Type 2 Diabetes Mellitus. *Euterpe oleracea* Mart. Exercise Training. Insulin Resistance. Dyslipidemia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Link entre dislipidemia, disfunção das células-beta e DM2.....	24
Figura 2 -	Mecanismo de ação da toxicidade da STZ sobre as células-beta pancreáticas de ratos.....	27
Figura 3 -	Representação esquemática da cascata de sinalização da insulina .....	30
Figura 4 -	Esquema demonstrando os mecanismos para a geração de espécies reativas e a atividade das enzimas antioxidante no DM2.....	37
Figura 5 -	Ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos e pelo tecido adiposo mediando a resistência à insulina....	43
Figura 6 -	Esquema simplificado da síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol e excreção de colesterol pela via biliar no fígado .....	46
Figura 7 -	Foto da palmeira contendo o <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (açai).....	49
Figura 8 -	Cromatograma do Extrato hidroalcoólico do caroço do açai, obtido por HPLC.....	50
Figura 9 -	Representação esquemática do protocolo experimental.....	58
Figura 10 -	Foto do treinamento em esteira rolante .....	60
Figura 11 -	Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	65
Figura 12 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o peso corporal ..	73
Figura 13 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo.....	75
Figura 14 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos .....	77
Figura 15 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis insulinêmicos, HOMA-IR e HOMA-BETA .....	79
Figura 16 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil pró-inflamatório .....	81
Figura 17 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina e de adipocinas no tecido adiposo epididimal .....	84

Figura 18 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético.....	87
Figura 19 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da noradrenalina em LAM.....	88
Figura 20 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM.....	89
Figura 21 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM.....	90
Figura 22 -	Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre o TBARS.....	92
Figura 23 -	Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre a carbonilação de proteínas.....	94
Figura 24 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da SOD.....	96
Figura 25 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da GPx.....	98
Figura 26 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da catalase.....	100
Figura 27 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de nitrito.....	102
Figura 28 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico sérico.....	104
Figura 29 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os triglicerídeos hepático.....	106
Figura 30 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o colesterol hepático.....	107
Figura 31 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o conteúdo de glicogênio hepático.....	108
Figura 32 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos	

	graxos e na síntese e excreção de colesterol no fígado.....	111
Figura 33 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a esteatose hepática.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCG5	Transportadores da subfamília G5
ABCG8	Transportadores da subfamília G8
ACC	Acetil CoA carboxilase
ACh	Acetilcolina
ACH09	Extrato da casca da uva
ADA	Associação americana de diabetes
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AGES	Produtos finais da glicação avançada
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Ang II	Angiotensina II
ASE	Extrato hidro-alcóolico do caroço do açaí
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetrahydrobiopterina
CA <sup>2+</sup>	Cálcio
CAS	Controle ase sedentário
CAT	Controle ase treino
CS	Controle sedentário
CT	Controle treino
DAS	Diabético ase sedentário
DAT	Diabético ase treino
DDAH	Arginina dimetilamino-hidrolase

DM	Diabetes mellitus
DM2 -	Diabetes mellitus do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Diabético sedentário
DT	Diabético treino
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EGF	Fator de crescimento epidermal
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
FABP	Proteínas ligantes de ácidos graxos
FAZ	Ácido graxo sintase
GLUT-2	Transportador de glicose 2
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GLUTS	Transportadores de glicose
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSK3	Glicogênio sintase quinase
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMGCoA-r	3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A reductase
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IKK- $\beta$	I $\kappa$ B quinase- $\beta$ serina quinase do inibidor de quinase kappa



IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INPI	Instituto nacional de propriedade industrial
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	Proteína quinase cjun nh2 – terminal
LAM	Leito arterial mesentérico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MTP	Proteína microssomal de transferência de triglicerídeos
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NE	Noradrenalina
NED	N-naftil-etilenodiamina

NFkB	Fator nuclear de cadeia leve kappa potencializador de células B ativadas
NG	Nitroglicerina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização mundial da saúde
pACC	Proteína acetil CoA carboxilase fosforilada
PAI-1	Ativador do plasminogênio-1
PBS	Tampão fosfato
PCT	Patent cooperative treaty
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1	Proteína quinase fosfatidilinositol-dependente
PGC-1A	Peroxissoma proliferador-ativado do receptor gama coativador-1- $\alpha$
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
pIRS-1	Substrato do receptor de insulina 1 fosforilado
pJNK	Proteína quinase cjun nh2 – terminal fosforilada
PKC	Proteína quinase C
PP1	Proteína fosfatase 1
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
SOCS3	Citocina supressora de sinalização
SOD	Superóxido-desmutase
SOD1	Superóxido-desmutase cobre-zinco
SOD2	Superóxido-desmutase manganês
SOD3	Superóxido-desmutase extracelular

SRA	Sistema renina-angiotensina
SREBP-1c	Fator de transcrição lipogênico 1c
SREBP-2	Proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis
STAT3	Sinal transdutor e ativador da transcrição 3
STZ	Estreptozotocina
TAE -	Tecido adiposo epididimal
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VLDL -	Lipoproteínas de muito baixa densidade
VO <sub>2</sub> MAX	Utilização máxima de oxigênio
VSMC	Célula do músculo liso vascular
XOD	Xantina oxidase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1	<b>OBJETIVO</b> .....	54
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	54
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	54
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
2.1	<b>Animais utilizados e modelo experimental</b> .....	56
2.2	<b>Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí</b> .....	59
2.3	<b>Protocolo de treinamento físico</b> .....	60
2.4	<b>Dosagens séricas</b> .....	61
2.4.1	<u>Glicemia</u> .....	61
2.4.2	<u>Insulina</u> .....	61
2.4.3	<u>Análise da sensibilidade à insulina</u> .....	61
2.4.4	<u>Análise funcional das células beta pancreáticas</u> .....	62
2.4.5	<u>Perfil lipídico</u> .....	62
2.4.6	<u>Perfil pró-inflamatório</u> .....	62
2.5	<b>Análise da expressão de proteínas por Western Blotting</b> .....	63
2.6	<b>Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato</b> .....	64
2.7	<b>Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas</b> .....	65
2.8	<b>Ensaio pró-oxidantes</b> .....	66
2.8.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</u> .....	66
2.8.2	<u>Carbonilação de proteínas</u> .....	67
2.9	<b>Atividade das enzimas antioxidantes</b> .....	67
2.9.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u> .....	68
2.9.2	<u>Medida da catalase</u> .....	68
2.9.3	<u>Medida da glutathione peroxidase</u> .....	69
2.10	<b>Medida de nitrito</b> .....	69
2.11	<b>Perfil lipídico hepático</b> .....	70
2.12	<b>Glicogênio hepático</b> .....	70
2.13	<b>Histologia do fígado</b> .....	71

3	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	72
4	<b>RESULTADOS.....</b>	73
4.1	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o peso corporal.....</b>	73
4.2	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo.....</b>	74
4.3	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos.....</b>	76
4.4	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis insulinêmicos, HOMA-IR e HOMA-BETA.....</b>	78
4.5	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil pró-inflamatório.....</b>	80
4.6	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina e de adipocinas no tecido adiposo epididimal.....</b>	82
4.7	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético.....</b>	86
4.8	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da noradrenalina em LAM.....</b>	88
4.9	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM.....</b>	89
4.10	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM.....</b>	90
4.11	<b>Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre os ensaios pró-oxidantes.....</b>	91
4.11.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</u>	91
4.11.2	<u>Carbonilação de proteínas.....</u>	93
4.12	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as enzimas antioxidantes.....</b>	95
4.12.1	<u>Superóxido dismutase (SOD).....</u>	95
4.12.2	<u>Glutationa peroxidase (GPx).....</u>	97

4.12.3	<u>Catalase</u> .....	99
4.13	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de nitrito</b> .....	101
4.14	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico sérico</b> .....	103
4.15	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico hepático</b> .....	106
4.15.1	<u>Triglicerídeos hepáticos</u> .....	106
4.15.2	<u>Colesterol Hepático</u> .....	107
4.16	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o conteúdo de glicogênio hepático</b> .....	108
4.17	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e na síntese e excreção de colesterol no fígado</b> .....	109
4.18	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a esteatose hepática</b> .....	114
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	116
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	138
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	139
	<b>ANEXO – Comitê de Ética</b> .....	165

## INTRODUÇÃO

Uma epidemia de diabetes mellitus (DM) está em curso. Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens, coexistindo com o problema que as doenças infecciosas ainda representam. O número de indivíduos diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014).

No Brasil, no final da década de 1980, estimou-se a prevalência de DM na população adulta em 7,6% (Malerbi e Franco, 1992), dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 13,5% em São Carlos-SP (Bosi *et al.*, 2009) e de 15% em Ribeirão Preto-SP (Moraes *et al.*, 2010).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) baseia-se na etiologia da patologia e inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda há duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (Alberti e Zimmet, 1999; American Diabetes Association, 2013).

Dentro desta classificação tem papel de destaque o DM tipo 1, observado em aproximadamente 5% a 10% dos casos, e se desenvolve devido à destruição auto-imune das células  $\beta$ -pancreáticas, resultando na secreção insuficiente de insulina e o DM tipo 2, representando os outros 90% a 95% dos casos, caracterizado por graus variáveis de resistência à insulina, secreção de insulina prejudicada, apoptose moderada ou grave das células beta e por aumento da produção hepática de glicose (Vivekanadan-Giri *et al.*, 2008, Akkati *et al.*, 2011).

Em 2004, cerca de 3,4 milhões de pessoas morreram em consequência dessa patologia, sendo mais de 80% dos óbitos ocorridos em países de baixa e média renda. A OMS estima que as mortes ocasionadas pelo diabetes devam duplicar entre 2005 e 2030 (WHO, 2011). Dados da literatura também demonstram que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) irá atingir 6,1% da população mundial em 2025, por esse motivo, avanços no tratamento dessa patologia fazem-se necessários (Stumvoll *et al.*, 2005).

## **Diabetes mellitus tipo 2**

O DM2 é uma das doenças mais prevalentes da atualidade, sendo responsável por uma acentuada taxa de mortalidade e morbidade na população geral. A maioria dos pacientes com essa patologia apresentam sobrepeso ou obesidade e cetoacidose que raramente se desenvolve de modo espontâneo, ocorrendo apenas quando se associa a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014).

Aproximadamente metade dos portadores de DM2 desconhecem sua condição, uma vez que a doença é pouco sintomática. O diagnóstico precoce do diabetes é importante pois o tratamento evita suas complicações. Quando presentes os sintomas mais comuns são: urinar excessivamente, inclusive acordar várias vezes a noite para urinar, sede exacerbada, aumento do apetite, perda de peso (em pessoas obesas a perda de peso ocorre mesmo comendo de maneira excessiva), cansaço, vista embaçada ou turvação visual, infecções frequentes, sendo as mais comuns, as infecções de pele (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014).

Estudos demonstram que alguns fatores são determinantes para o aumento da incidência e da patogênese do DM2 como a idade, obesidade, sedentarismo, dieta inadequada, fatores genéticos que provavelmente envolvam genes defeituosos relacionados com a sinalização da insulina, bem como a etnia (hispânicos, africanos e aborígenes), hipertensão e estresse (Zhu *et al.*, 2010; Badawi *et al.*, 2010). A condição metabólica central nesta patologia são as alterações glicêmicas e no metabolismo lipídico, resultantes dos efeitos combinados da



resistência à insulina no músculo esquelético, hepático, renal e no tecido adiposo, sendo a hiperglicemia resultante a principal causa das complicações secundárias micro e macrovasculares associadas ao DM2 (Mackenzie e Elliot, 2014), como retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares, que são as maiores causas da morbidade e mortalidade em pacientes com essa patologia (Madonna e De Caterina, 2011).

O fígado é um órgão chave no desenvolvimento das alterações descritas no DM2. O estabelecimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) tem sido associado com a obesidade, resistência à insulina e DM2 (Forcheron *et al.*, 2009). O excesso de gordura intra-abdominal tem um papel chave no aumento da gordura hepática (Chan *et al.*, 2006). Em pacientes com DM2, o aumento do conteúdo lipídico hepático é fortemente associado com os níveis de resistência à insulina e com a diminuição da supressão da produção endógena de glicose hepática pela insulina (Bajaj *et al.*, 2004).

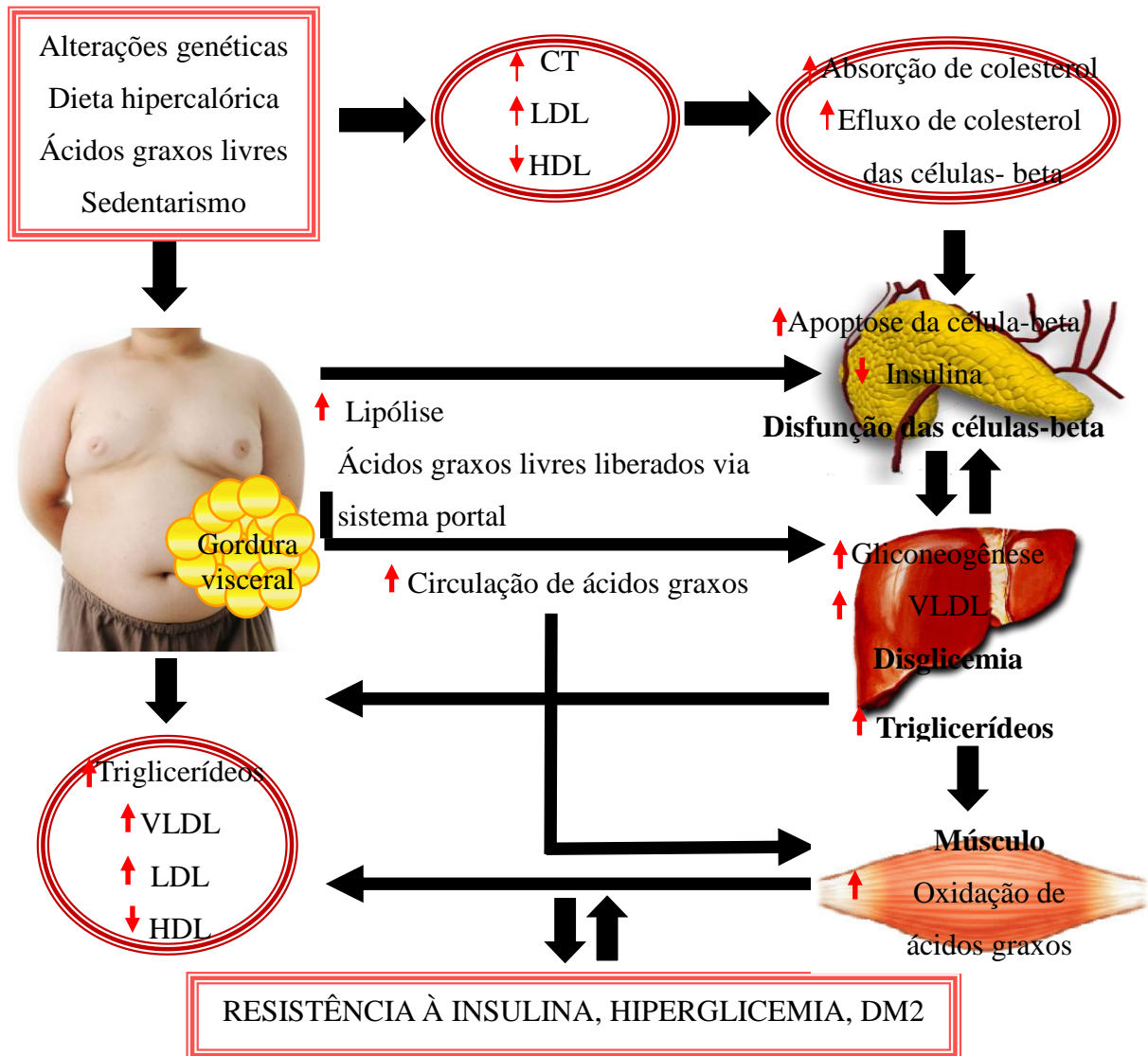
Cronicamente a hiperglicemia presente no DM2, induz um efeito prejudicial, pró-inflamatório e pró-oxidativo, denominado glicotoxicidade, que é o principal fator que leva ao desenvolvimento da disfunção endotelial (Bonora, 2008), enquanto a resistência à insulina tem sido descrita em diversas doenças com um risco cardiovascular aumentado, como diabetes, hipertensão, obesidade, síndrome metabólica e insuficiência cardíaca (Hadi e Suwaidi, 2007).

No DM2 com o estado de glicotoxicidade, a demanda de insulina é constantemente elevada, a geração de espécies reativas é aumentada pela respiração mitocondrial e pela saturação da capacidade de neutralização dos antioxidantes, resultando em estresse oxidativo (Montane *et al.*, 2014). O aumento dos níveis de espécies reativas ativam cascatas de sinalização pró-inflamatórias, ocasionando a transcrição do fator nuclear de cadeia leve-kapa potencializador de células B ativadas (NFkB), de monócitos quimiotáticos, de moléculas de adesão celular, de óxido nítrico (NO), de interleucinas, entre outros fatores (Wellen e Hotamisligil, 2005)

Neste contexto, no estado diabético, condição caracterizada primordialmente por deficiência de insulina e/ ou diminuição da sua ação, a utilização de glicose pelos tecidos periféricos por glicólise, está diminuída e a produção hepática de glicose através dos processos de glicogenólise e gliconeogênese encontram-se acelerados (Velloso *et al.*, 2006). O déficit de insulina intracelular induz à redução da lipogênese e exacerba a lipólise,

promovendo aumento da liberação de ácidos graxos dos triglicerídeos no tecido adiposo (Figura1).

Figura 1 - Link entre dislipidemia, disfunção das células-beta e DM2



Legenda: O colesterol tem um papel chave no desenvolvimento da dislipidemia, diabetes e das complicações vasculares. O estilo de vida pode provocar um acúmulo de gordura visceral associada a uma excessiva liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea. Estes ácidos graxos livres entram na veia porta e viajam para o fígado, onde eles induzem a gliconeogênese hepática e elevam a síntese de VLDL. Além disso, eles contribuem para a redução da absorção de glicose nos músculos e lipotoxicidade das células-beta. Estes mecanismos explicam o aumento de VLDL1 e de LDL e a redução de HDL, observados na resistência à insulina e no DM2.

Fonte: Adaptado de Bardini *et al.*, 2012.

Os ácidos graxos livres são utilizados como combustível e levam à formação de corpos cetônicos. Concomitantemente existe a liberação de outros hormônios como o cortisol, o hormônio do crescimento, as catecolaminas e o glucagon, os quais acarretam uma mobilização ainda maior de ácidos graxos e exacerbam a gliconeogênese. Este quadro máximo de descompensação pode ocasionar cetoacidose diabética (Godoy-Matos, 2005).

O impacto do controle glicêmico na diminuição de riscos para eventos microvasculares já está bem estabelecido (Turner *et al.*, 1999). A insulina exógena e outros medicamentos como a metformina e glitazonas podem controlar vários aspectos do DM2, inúmeras complicações que afetam o sistema vascular, retina, nervos periféricos e pele, mas são extremamente dispendiosos em termos de longevidade e qualidade de vida (Maritim *et al.*, 2003).

Sua natureza crônica, a gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-las tornam o DM uma doença muito onerosa não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde (WHO, 2002). Os custos do DM e suas complicações afetam o indivíduo, a família e a sociedade, porém não são apenas econômicos. Os custos intangíveis como dor, ansiedade, inconveniência e perda de qualidade de vida, também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e seus familiares, o que é difícil de quantificar (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014). Assim, os tratamentos que visam à captação de glicose, reduzindo a gliconeogênese são fundamentais para o controle do DM2.

## **Modelo experimental de DM2**

Dados da literatura, têm demonstrado diferentes modelos de diabetes experimental, incluindo o DM2 em camundongos db/db (Hinder *et al.*, 2013), DM2 em ratos obesos Zucker (Raza *et al.*, 2013), o DM2 com a associação de dieta hiperlipídica e uma baixa dose de estreptozotocina (STZ) (Guo *et al.*, 2013; Posuwan *et al.*, 2013), entre outros.

O modelo experimental que associa dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ, utilizado neste estudo, desenvolve muitas das características do DM2 descritas e observadas em humanos. Desta forma, alguns estudos sugerem que este modelo poderia ser utilizado para

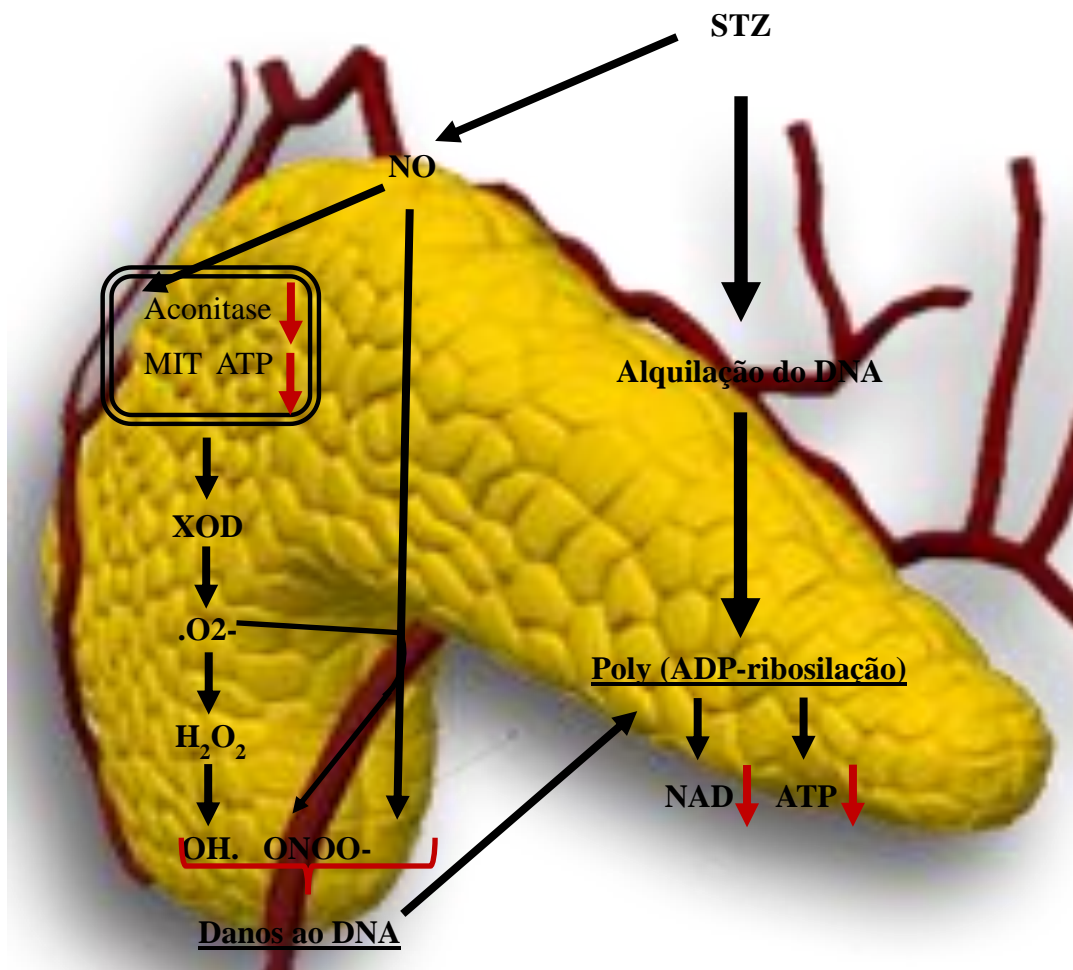
testar agentes antidiabéticos para o tratamento do DM2 (Zhang *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2005; Sugano *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2009).

Segundo Buettner *et al.* (2007), uma dieta constituída por frações entre 20% e 60% de gordura animal e vegetal é ideal para a indução de desordens metabólicas, elevando-se os níveis de glicose sanguínea, em jejum, acompanhada por moderado aumento nos níveis de insulina plasmática. O excesso de nutrientes se acumula como triglicerídeos no tecido adiposo, resultando em hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, essa expansão do tecido adiposo ocasiona resistência à insulina em roedores e humanos (Abe *et al.*, 2014). Também tem sido relatado que uma dieta rica em lipídeos pode induzir hiperlipidemia e estresse oxidativo (Kägi *et al.*, 1997).

A STZ (Figura 2), é um antibiótico obtido a partir da *Streptomyces achromogenes*. Estruturalmente é um derivado de glicosamina de nitrosoureia (Srinivasan e Ramarao, 2007) sendo utilizado para induzir DM tanto dependente de insulina, quanto independente, podendo ser aplicada através de uma injeção intravenosa ou intraperitoneal (Srinivasan e Ramarao, 2007). Uma única dose intravenosa entre 40 e 60 mg/kg em ratos adultos induz DM tipo 1, entretanto, uma única dose intravenosa ou intraperitoneal menor que 40 mg/kg associada à dieta hiperlipídica promove a indução do DM2 (Xing *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010). Seu efeito diabetogênico pode ser constatado através da hiperglicemia oriunda de seu efeito citotóxico direto sobre as células-beta pancreáticas (Ozturk *et al.*, 1996).

A ação tóxica da STZ requer sua captação pelas células, sendo seletivamente acumulada nas células-beta pancreáticas através do transportador de glicose (GLUT-2) na membrana plasmática. A importância do GLUT-2 neste processo é também mostrada pela observação de que a STZ danifica outros órgãos que expressam este transportador, particularmente os rins e o fígado (Lenzen, 2008). Desta forma, as células produtoras de insulina, que não expressam este transportador de glicose são resistentes à ação desse antibiótico (Schnedl *et al.*, 1994).

Figura 2 - Mecanismo de ação da toxicidade da STZ sobre as células-beta pancreáticas de ratos



Legenda: Abreviações: STZ - estreptozotocina, MIT- mitocôndria, XOD - xantina oxidase e NO.  
 Fonte: Adaptado de Szkudelski, 2001.

Sua toxicidade é dependente da atividade de alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) por seu radical metilnitrosourea (Murata *et al.*, 1999), especialmente na posição O<sup>6</sup> da guanina (Szkudelski, 2001). A transferência do grupo metila para a molécula de DNA provoca danos, que ao longo de uma cadeia de eventos definidos, resulta na fragmentação do mesmo (Pieper *et al.*, 1999). A glicosilação de proteínas pode ser um fator prejudicial adicional (Konrad e Kudlow, 2002).

A STZ possui um grupo nitroso e pode liberar NO (Lenzen, 2008). Tem sido demonstrado que esta molécula possui um importante papel na destruição das ilhotas pancreáticas, através de sua contribuição para a geração de espécies reativas, bem como para a fragmentação do DNA (Szkudelski, 2001).

Este composto pode ainda, atuar sobre as mitocôndrias e aumentar a atividade da enzima xantina oxidase (XOD), ocasionando a produção de ânion superóxido. Inibe o ciclo de Krebs reduzindo substancialmente o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Este efeito limita fortemente a produção mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP) promovendo a depleção desse nucleotídeo nas células-beta (Sofue *et al.*, 1991). A restrição da geração do ATP mitocondrial é parcialmente mediada pelo NO, através da inibição da atividade da enzima aconitase, que promove a estereoisomerização do citrato a isocitrato no ciclo de Krebs (Welsh e Sandler, 1994). A exacerbada desfosforilação do ATP aumenta o fornecimento de substrato para a XOD (as células-beta possuem uma elevada atividade desta enzima) e aumenta a produção de ácido úrico produto final da degradação de ATP. A XOD catalisa a reação de formação de ânion superóxido, formando secundariamente peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (Nukatsuka *et al.*, 1990a).

Ademais, as reações sinérgicas do NO e das espécies reativas de oxigênio podem também contribuir para a fragmentação do DNA e outras alterações deletérias ocasionadas pela STZ, através da formação de peroxinitrito. Antioxidantes intracelulares e NO *scavengers* atenuam a toxicidade deste composto (Szkudelski, 2001).

Os danos ao DNA ocasionam a ativação da poli-ADP ribosilação. Este processo leva a depleção celular do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado (NAD<sup>+</sup>), contribuindo para a redução de ATP e subsequentemente inibindo a síntese e secreção de insulina (Nukatsuka *et al.*, 1990b).

Desta forma a associação da dieta hiperlipídica com uma baixa dose de STZ oferece um bom modelo para o estudo das alterações patológicas descritas no DM2.

## **Resistência à insulina e DM2**

Vários são os mecanismos envolvidos na manutenção do equilíbrio metabólico de carboidratos, lipídeos e proteínas. Entretanto a secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas representa o efeito hormonal mais determinante neste processo (Godoy-Matos, 2005).

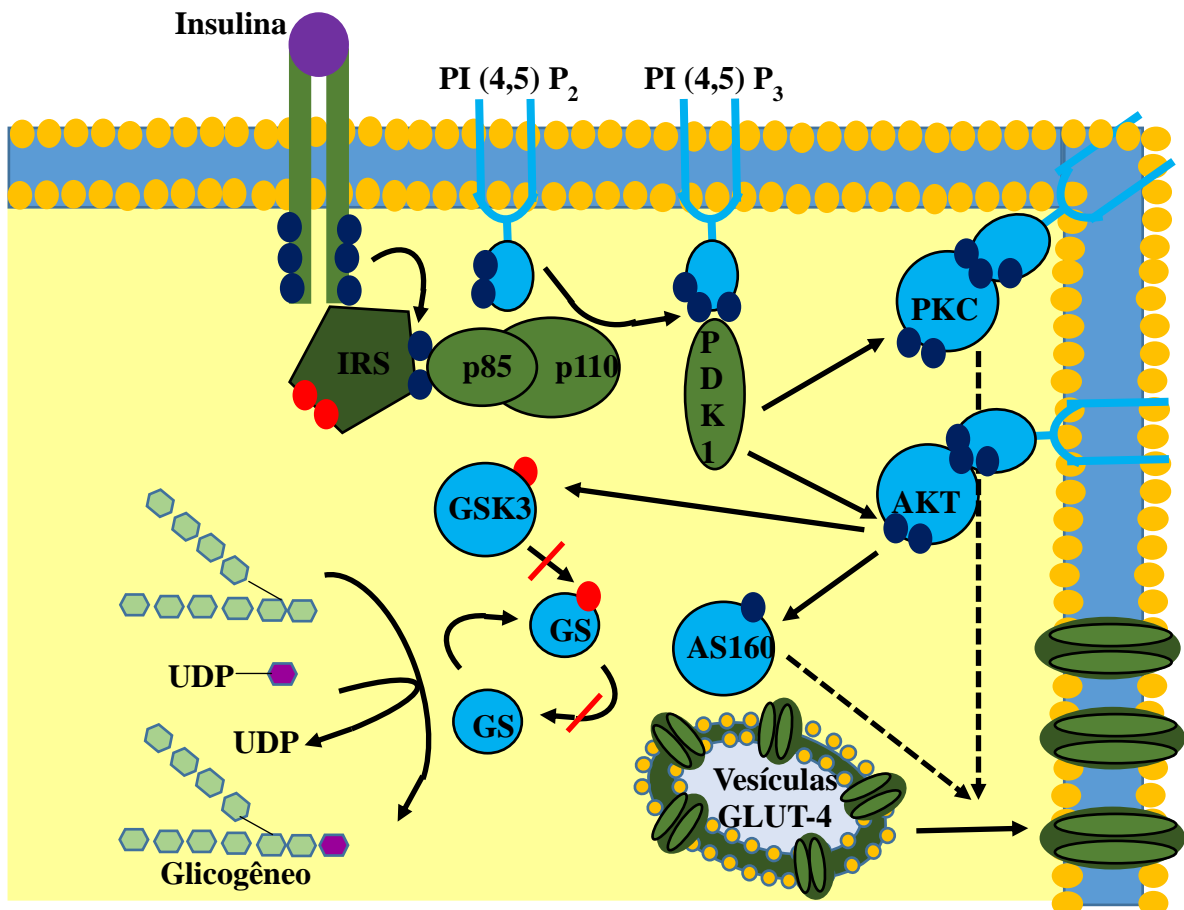
Desde a descoberta da insulina em 1921, muitos têm se dedicado ao entendimento do mecanismo molecular desse hormônio. Em síntese, a insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos. Após as refeições, a insulina age 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 de diminuir a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, e por reduzir a lipólise e a proteólise (Saltiel e Kahn, 2001).

A insulina possui uma diversidade de ações e atua sobre vários tecidos, através de uma rede complexa de vias intracelulares. Entretanto, se destaca a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT), uma das principais responsáveis por suas ações no metabolismo da glicose, descrita abaixo e esquematizada (Figura 3).

Este hormônio proteico desencadeia seus efeitos biológicos mediante a fosforilação de proteínas. Sua ação celular se inicia através da interação da mesma com o seu receptor. O receptor de insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica, que possui atividade tirosina quinase intrínseca (Ramalingam *et al.*, 2013). Essa proteína é composta por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares, as quais contêm o sítio de ligação para a insulina; e duas subunidades  $\beta$  transmembranares. Na porção intracelular, encontram-se os domínios tirosina quinase. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  provoca uma alteração conformacional que resulta na autofosforilação da subunidade  $\beta$  do receptor (Watson e Pessin, 2001), ativando os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS) (Kanzanki *et al.*, 2004). A porção tirosinaquinase fosforila o IRS1/2 recrutando, desta forma, a proteína PI3K para a membrana plasmática, onde irá produzir um segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato (PIP3), que por sua vez ativa uma cascata de fosforilação serina/treonina (Alessi e Downes, 1998). Os alvos da proteína PIP3 incluem as proteínas quinase fosfatidilinositol-dependente (PDK1), a AKT e as atípicas proteínas quinases C (PKC) as isoformas  $\zeta$  e  $\lambda$  (Powell, 2007). Mecanicamente a PDK1, AKT e as PKCs, são recrutadas para a membrana plasmática ligando-se à PIP3. Após essa ligação a PDK1 fosforila a AKT e as PKCs, promovendo sua ativação (Goodyear *et al.*, 1995). Os principais alvos da AKT ativada são as proteínas glicogênio sintase quinase (GSK3) e as AS160 (uma subunidade da AKT) (Cross *et al.*, 1995; Kane *et al.*, 2002). Desta forma a GSK3 é fosforilada sendo inativada (Cross *et al.*, 1995). Este processo ocorre paralelamente à ativação da proteína fosfatase 1 (PP1), promovendo a desfosforilação da

glicogênio fosforilase e da glicogênio sintase b, conduzindo à inativação da degradação de glicogênio e a ativação da síntese do mesmo (Brady *et al.*, 1998).

Figura 3 - Representação esquemática da cascata de sinalização da insulina



Legenda: no tecido adiposo, cujas alterações têm sido estudadas em indivíduos diabéticos do tipo 2 e resistentes à insulina.

Fonte: Adaptado de Fröjdö *et al.*, 2009.

A AKT também regula a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática (Saltiel e Kahn, 2001). Diferentes tecidos expressam diferentes subtipos de GLUT. O fígado e o pâncreas expressam o GLUT-2, enquanto o tecido adiposo e a musculatura esquelética expressam o GLUT-4 (Thorens *et al.*, 1990), para o qual serão fornecidos maiores detalhes, por estar em foco neste estudo. Sua regulação é efetuada pela AKT, através da fosforilação de uma proteína reguladora da atividade de GTPases da família Rab, conhecida como AS160. Esta proteína mantém algumas GTPases Rab no seu estado



inativo, promovendo a retenção citoplasmática de vesículas de armazenamento contendo o transportador de glicose GLUT-4. Após a fosforilação, a proteína AS160 é inativada, o que permite a translocação destas vesículas contendo GLUT-4 para a membrana plasmática, conduzindo a um aumento correspondente da captação de glicose pelas células (Sano *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que alterações no mecanismo molecular da via de sinalização da insulina, desempenham um papel crítico no desenvolvimento da resistência à insulina. São encontrados índices mais elevados de resistência à insulina na obesidade, na hipertensão arterial sistêmica, no DM2, nas dislipidemias, no tabagismo, no sedentarismo, entre outras condições (Bugianesi *et al.*, 2005).

A resistência à insulina 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 um mecanismo compensatório da resistência à insulina a hiperinsulinemia (Meerarani *et al.*, 2006; Nigro *et al.*, 2006). Nesse quadro, ocorre uma disfunção na secreção e atividade fisiológica da insulina, geralmente acompanhada pela deficiência nos sinais de transdução via seus receptores, uma disfunção tanto na fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI3K, quanto na AKT e vias subjacentes (Carvalho *et al.*, 1997).

A resistência à insulina é uma anormalidade metabólica crucialmente importante no DM2, no qual a doença cardiovascular é a causa mais importante de morbidade e mortalidade (Wheatcroft *et al.*, 2003). A aterosclerose acelerada no diabetes é multifatorial: a hiperglicemia, dislipidemia, e o stress oxidativo têm sido demonstrados por serem importantes no desenvolvimento dessa patologia. Evidências crescentes sugerem que a progressão da resistência à insulina para o DM2 é paralela à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose, estando também intimamente associada à adiposidade visceral, sendo essa associação atribuída aos ácidos graxos livres (Boden e Shulman, 2002).

## Endotélio e disfunção vascular e DM2

O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo com a sua força de cisalhamento *shear stress*, atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que conduzem a produção de NO, pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Bahia *et al.*, 2006).

Acreditou-se durante anos que o endotélio era apenas uma barreira mecânica entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular, porém hoje já se sabe que ele apresenta diversas atividades metabólicas. A importância do endotélio no processo de vasodilatação foi descrita por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a remoção mecânica ou química do endotélio impedia a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) em artérias isoladas de coelho, concluindo que o endotélio produzia uma substância vasodilatadora, denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos posteriores, realizados com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF (Ignarro *et al.*, 1987) constataram que tal fator se tratava do NO.

O NO é produzido pelo endotélio pela ação da eNOS que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP<sup>+</sup> e do complexo cálcio/calmodulina (Malinski, 2005). O relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pelo NO é mediado principalmente pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel muscular, que por sua vez, transforma guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPC). O aumento dos níveis de GMPC no interior das células musculares lisas, estimula o recrutamento de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) citosólico para os estoques intracelulares, causando assim, redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> e consequente relaxamento vascular (Rapoport e Murad, 1983).

Sua função é regular o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e de inibição da atividade plaquetária, agregação de leucócitos e proliferação das células musculares lisas da parede vascular (Ramachandran *et al.*, 2002) sendo fundamental na modulação da pressão arterial (Flammer e Lüscher, 2010).

Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras, como a prostaglandina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, assim como substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II (Ang II) e endotelina. Quando a função do endotélio

é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência a vasodilatação (Bahia *et al.*, 2006; Flammer e Lüscher, 2010).

Vários estudos demonstram que a remoção do endotélio aumenta a resposta a uma variedade de agentes vasoconstritores, tanto em preparações vasculares de animais normotensos como hipertensos, indicando que estas células exercem um papel inibitório sobre a função contrátil do músculo liso vascular (Callera *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (Bahia *et al.*, 2006).

Em contra partida, evidências crescentes sugerem que a hiperglicemia é o principal fator que ocasiona a disfunção endotelial, caracterizada por um impedimento do relaxamento vascular dependente do endotélio, no diabetes. Uma série de fatores predispõe o desenvolvimento da disfunção endotelial no DM2, dentre eles o aumento da produção de ânion superóxido e de prostanoídes constritores, bem como, a redução da biodisponibilidade de NO (Stanley *et al.*, 2013). Dentre os principais fatores que contribuem para a etiologia da disfunção endotelial, grande destaque tem sido dado ao estresse oxidativo (Wheatcroft *et al.*, 2003), demonstrado a importância do desbalanço entre a produção de espécies reativas e de NO, para a manutenção da função endotelial.

## **Estresse oxidativo e DM2**

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Em condições patológicas, o estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (Touyz, 2004; Duracková, 2010).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, superprodução de agentes oxidantes que sobrecarregam a capacidade antioxidante (Grossman, 2008). Promove a oxidação de macromoléculas

biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos, ocorrendo quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (Cai e Harrison, 2000).

Os radicais livres são derivados do metabolismo do oxigênio, que pela sua configuração eletrônica, tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos encontrados no ambiente e em todos os sistemas biológicos (Touyz e Shiffrin, 1999; Loukides *et al.*, 2011). No sistema cardiovascular, as espécies reativas exercem um papel fisiológico essencial, mantendo a integridade cardíaca e vascular. No entanto, as espécies reativas também possuem um papel fisiopatológico na disfunção cardiovascular associado a condições como aterosclerose, hipertensão e DM2 (Landmesser e Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Duracková, 2010). As principais espécies reativas nestes processos são: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil e a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito.

Em concentrações fisiológicas as espécies reativas funcionam como moléculas de sinalização regulando a contração-relaxamento da célula do músculo liso vascular (VSMC) (Rao e Berk, 1992; Zafari *et al.*, 1998; Touyz, 2005) sendo indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo a sinalização intracelular, diferenciação celular, apoptose e defesa contra microorganismos (Duracková, 2010).

Em condições patológicas, ocorre um aumento da produção dessas espécies e ou uma redução da capacidade dos agentes antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo, levando à disfunção endotelial, contratilidade aumentada, crescimento da VSMC, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, deposição aumentada de proteínas da matriz extracelular, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (Rao e Berk, 1992; Harrison, 1997; Landmesser e Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Touyz e Briones, 2011).

Vários tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos residentes, células do músculo liso e células endoteliais produzem espécies reativas. Dentro da célula endotelial as fontes produtoras dessas espécies são: a NAD(P)H oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenases, lipoxigenases e XOD. Presentes também na vasculatura as enzimas do citocromo P450, são fontes significativas de estresse oxidativo (Figura 4). Entretanto, a contribuição dessas enzimas para a geração de radicais livres é relativamente menor quando comparadas com a NAD(P)H oxidase (Touyz, 2004). A NAD(P)H oxidase é regulada por agentes vasoativos (Ang II, endotelina-1, trombina, serotonina), por citocinas interleucina-1

(IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF) e por forças mecânicas. Dos fatores vasoativos que estimulam a NAD(P)H oxidase, a Ang II parece ser um dos mais importantes (Touyz e Briones, 2011) (Figura 4).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para a formação de radicais livres no DM2, dentre eles, destaca-se a oxidação da glicose como a principal fonte de espécies reativas, a glicose é oxidada à radical ânion enediol que é convertido em cetoaldeídos reativos e em radical ânion superóxido. O superóxido, por sua vez, pode sofrer uma reação de dismutação formando peróxido de hidrogênio que na presença de metais de transição, pode gerar a produção de um intermediário extremamente reativo o radical hidroxil (Wolff e Dean, 1987; Jiang *et al.*, 1990). O ânion superóxido também pode reagir com o NO e formar peroxinitrito (Hadi e Suwaidi, 2007). Outras importantes fontes de espécies reativas no diabetes são a ativação da NADPH oxidase (Wei *et al.*, 2006), a produção mitocondrial de agentes oxidantes (Stone e Yang, 2006), o estresse do retículo endoplasmático (Montane *et al.*, 2014) e a interação da glicose com proteínas que conduzem à formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs). Através do aumento intracelular do estresse oxidativo AGEs ativam o fator de transcrição NF $\kappa$ B, acredita-se esse que seja o mediador de danos celulares às ilhotas pancreáticas (Maritim *et al.*, 2003).

Evidências sugerem que as células-beta pancreáticas são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, quando comparadas à outros tipos celulares, provavelmente devido a sua baixa capacidade antioxidante. As células-beta possuem menor expressão de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase, tornando essas células mais vulneráveis aos danos ocasionados por agentes oxidantes, quando expostas ao estresse oxidativo (Tiedge *et al.*, 1997). Na presença de níveis elevados de glicose, as células-beta mostram-se mais eficientes em sua captação, devido à expressão do GLUT-2. As ilhotas de ratos expostos, a altas concentrações de glicose, resultam em aumento da produção intracelular de espécies reativas (Montane *et al.*, 2014). O aumento de agentes oxidantes na célula-beta prejudica a secreção de insulina, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina observada no DM2 (Houstis *et al.*, 2006).

## Sistema de defesa antioxidante

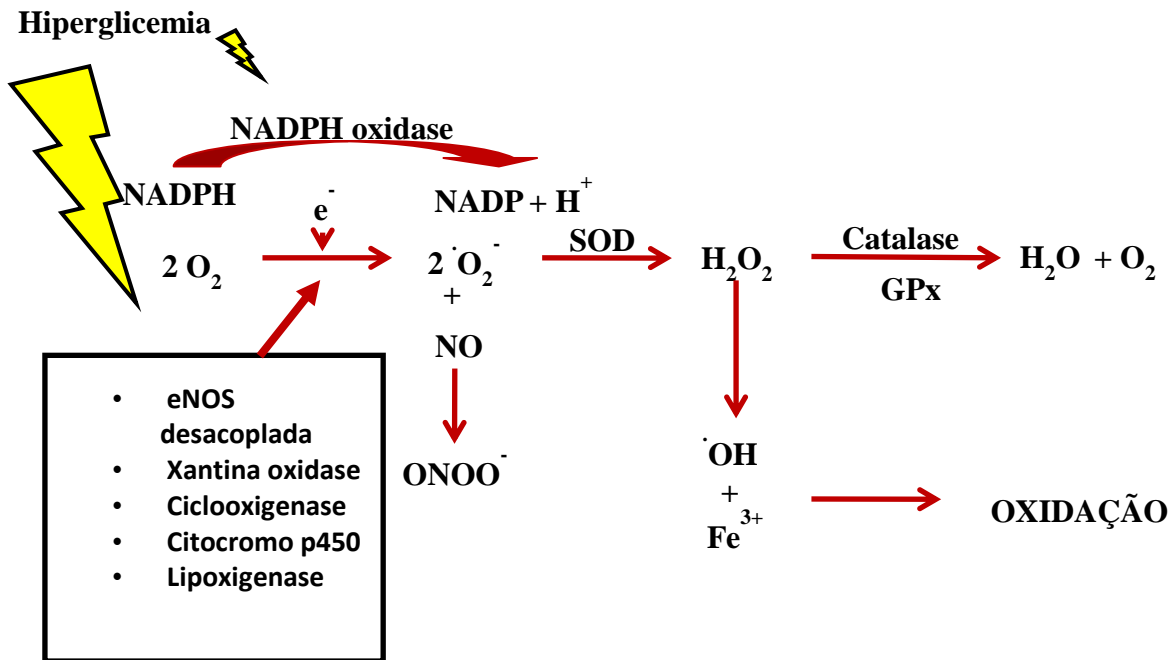
Para se proteger e evitar os danos causados pelas espécies reativas, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, potenciais, de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos conforme sua estrutura. A maior parte dos antioxidantes não enzimáticos é exógena. Os principais são vitaminas lipossolúveis (Vitamina A, E e betacarotenos); hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido desmutase (SOD), catalase e GPx, que é o primeiro sistema a agir, evitando o acúmulo de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Os agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana (Kojo, 2004; Valko *et al.*, 2007)

A SOD é a primeira linha de defesa da célula vascular. Em mamíferos existem três isoformas: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-mangânês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (ECSOD, SOD3) (Paravicini e Touyz, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Ross e Moldeus, 1991) (Figura 4).

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

A catalase é uma heme proteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular (Figura 4). 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 e Matsubara, 1997; Heck *et al.*, 2010).

Figura 4 - Esquema demonstrando os mecanismos para a geração de espécies reativas e a atividade das enzimas antioxidante no DM2



Fonte: Cristiane Aguiar da Costa, professora adjunta de Farmacologia, do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais, da UERJ.

A atividade das enzimas antioxidantes encontra-se reduzida em humanos e em modelos experimentais de DM2 (Zhang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010).

### Tecido adiposo e DM2

Ao longo do corpo o tecido adiposo é distribuído, se alojando em depósitos localizados principalmente na região subcutânea (gordura subcutânea) ou no tórax e na cavidade abdominal (gordura visceral). A divisão clássica do tecido é em adipócitos brancos e marrons, com funções e morfologia distintas, porém existe ainda um outro adipócito distinto o termogênico induzível (Masoodi *et al.*, 2014). O tecido adiposo branco é o órgão com maior plasticidade entre os tecidos metabolicamente relevantes, podendo representar de 5-60% do peso corporal total (Lee *et al.*, 2013).

O tecido adiposo é o principal local para o armazenamento da energia em excesso, sob a forma de triglicerídeos, contém vários tipos celulares, incluindo principalmente adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais e do sistema imune. Durante o equilíbrio de energia positivo, o tecido em questão estoca o excesso de energia como triglicerídeos nas gotículas lipídicas dos adipócitos, através de um aumento no número de adipócitos (hiperplasia) ou um alargamento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) (Hausman *et al.*, 2001). Em contraste a este estado, quando a energia é necessária entre as refeições ou durante o exercício físico, os triglicerídeos armazenados nos adipócitos podem ser mobilizados, através da lipólise, para liberação de ácidos graxos livres na circulação, sendo os mesmos transportados para outros tecidos, como fonte de energia. Estudos demonstram que os ácidos graxos, produtos da lipólise, possuem um papel crítico no desenvolvimento de desordens metabólicas relacionadas com a obesidade e o DM2. No fígado a entrada e acúmulo dos mesmos, se dão através da circulação portal, induzindo o aumento da síntese de lipídeos, da gliconeogênese e a manutenção da resistência à insulina hepática (Boden, 1997).

Este tecido tem como função não apenas armazenar energia, pois o mesmo é claramente um órgão endócrino ativo com grande impacto sobre o metabolismo energético (Frigolet *et al.*, 2013). O tecido em questão e a sua unidade morfofuncional, o adipócito, estão ativamente envolvidos em processos metabólicos, tais como, adipogênese, angiogênese, dissolução e reformulação da matriz extracelular, lipogênese, produção de fatores de crescimento, metabolismo da glicose, produção de hormônios, resposta imune, produção de enzimas, metabolismo dos esteroides e na produção de fatores associados com o sistema renina-angiotensina (Bays *et al.*, 2008).

O tecido adiposo, através de sua função endócrina, secreta várias adipocinas, incluindo quimiocinas, citocinas e hormônios (Skurk *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado que a produção de adipocinas está alterada na obesidade, síndrome metabólica e DM2. Esta observação foi principalmente evidenciada para a síntese de leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6) e resistina (Bastard *et al.*, 2006).

### Adipocinas

A leptina é um dos hormônios mais freqüentemente estudados, desde o momento em que foi clonada em 1994 (Unger, 2003). É um produto do gen *ob*, abundantemente expressa



no tecido adiposo, especificamente nos adipócitos e está envolvida na regulação da homeostase energética. Ela inibe o apetite e a ingestão de alimentos e estimula o gasto energético (Friedman *et al.*, 1998). No entanto, os níveis circulantes de leptina e a expressão de seu mRNA no tecido adiposo estão aumentados em indivíduos obesos, provavelmente devido à existência de resistência à leptina (Kouidhi *et al.*, 2010). Esta adipocina desempenha um papel importante na regulação da homeostase da glicose, na melhora da sensibilidade à insulina no fígado e no músculo esquelético, assim como, regula a função das células  $\beta$  do pâncreas (Marroquí *et al.*, 2012). Porém, também tem sido sugeridos seus efeitos pró-inflamatórios, pois a leptina ocasiona a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e inibe a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 (Lord *et al.*, 1998). Concomitantemente são aumentados os níveis circulantes e a expressão dessa adipocina no tecido adiposo em resposta à citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e à endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) (Grunfeld *et al.*, 1996). Desta forma, a leptina desempenha um papel relevante na inflamação associada ao DM2.

A adiponectina é uma das adipocinas mais intensamente estudadas, no que diz respeito à sensibilidade à insulina, sendo produzida exclusivamente por células do tecido adiposo (Lihn *et al.*, 2005). A expressão do RNAm da mesma é menor no tecido adiposo visceral e maior no subcutâneo (Lihn *et al.*, 2004). Os níveis circulantes dessa adipocina estão reduzidos na obesidade e em pacientes com doenças cardíacas coronarianas e DM2. Dados da literatura também demonstraram que há uma forte correlação positiva entre os níveis de adiponectina e a sensibilidade à insulina, bem como, uma correlação inversa entre esses níveis e a obesidade (Bastard *et al.*, 2006). Esta adipocina estimula a oxidação de ácidos graxos e a utilização de glicose, através da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no fígado e no músculo esquelético (Yamauchi *et al.*, 2002). Também induz a ativação da lipase lipoprotéica (LPL), ocasionando assim o clearance de VLDL e a redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Berneis e Krauss, 2002). Além disso, a adiponectina pode modular a resposta inflamatória induzida pelo TNF- $\alpha$ , através da redução dos níveis dessa citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos. Este efeito pode explicar em parte as propriedades anti-inflamatórias e anti-aterogênicas da adiponectina (Bastard *et al.*, 2006).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, mas principalmente por macrófagos e linfócitos, sendo também sintetizada no tecido adiposo pelos adipócitos (Arner *et al.*, 2005). Já foi descrito que esta citocina possui um papel relevante na

fisiopatologia da resistência à insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993), através da fosforilação de um resíduo de serina ao IRS-1 impedindo a ativação da tirosina promovida pela insulina (Gray e Kim, 2011). Além disso, o TNF- $\alpha$  ocasiona a estimulação da lipólise dos adipócitos, aumentando os níveis circulantes de ácidos graxos livres, bem como, aumenta a produção de IL-6 e inibe a síntese de adiponectina, alterando a ação da insulina e o metabolismo da glicose (Arner *et al.*, 2005). Estudos demonstraram níveis circulantes aumentados dessa citocina pró-inflamatória na obesidade e no diabetes (Miyazaki *et al.*, 2003).

A IL-6 é uma citocina produzida por muitos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, monócitos, assim como, por vários tecidos incluindo o adiposo (Bastard *et al.*, 2006). Estudos realizados em humanos sugerem que a IL-6 é produzida por células de gordura e células do estroma do tecido adiposo (Fried *et al.*, 1998). Este tecido é uma das principais fontes de produção dessa citocina, sendo responsável por cerca de 30% dos níveis circulantes da mesma em humanos (Path *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a expressão do RNAm e a secreção dessa adipocina são maiores no tecido adiposo visceral do que no subcutâneo (Friedman e Halaas, 1998). A IL-6 tem efeitos diretos sobre a sinalização da insulina nos adipócitos (Rotter *et al.*, 2003) e hepatócitos (Senn *et al.*, 2003), por induzir uma menor ativação do IRS-1 (Gray e Kim, 2011). Esta citocina também pode ter efeitos indiretos sobre a ação da insulina, como através da estimulação da lipólise (Mattacks e Pond, 1999). Em indivíduos com DM2, os níveis dessa citocina se associam ao grau de intensidade de intolerância à glicose e de inflamação (Pradhan *et al.*, 2001).

A resistina foi descoberta em pré-adipócitos durante o processo de diferenciação em adipócitos, sendo originalmente descrita como uma adipocina por ter sido isolada deste tipo celular. Segundo dados da literatura, o papel da resistina na regulação da insulina é controverso (Wolf, 2004). Foi demonstrado que ratos obesos possuem níveis circulantes de resistina aumentados, correlacionando-os com a resistência à insulina (Qi *et al.*, 2006). Outros dados apontaram que a falta de resistina poderia ocasionar a ativação da AMPK e consequentemente a redução da expressão de genes envolvidos na gliconeogênese no fígado, sugerindo que a mesma poderia exercer efeitos opostos aos da adiponectina (Bastard *et al.*, 2006). Além disso, esta adipocina inibe várias etapas envolvidas na sinalização da insulina em adipócitos da linhagem 3T3-L1 e induz a expressão da citocina supressora de sinalização (SOCS3), um conhecido inibidor da sinalização da insulina em adipócitos de roedores (Steppan *et al.*, 2005). Vários estudos relataram uma estreita relação entre os níveis de

resistina e obesidade, resistência à insulina ou DM2 (Vidal-Puig e O’Rahilly, 2001; Osawa *et al.*, 2004). No entanto, outros estudos demonstraram que os níveis circulantes e a expressão dessa adipocina no adipócito não estão associados com a resistência à insulina em humanos (Kielstein *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que outras importantes adipocinas são liberadas pelo tecido adiposo e possuem papel relevante nas alterações associadas ao DM2, como a visfatina, o inibidor do plasminogênio-1 (PAI-1) e estudos recentes demonstraram que o tecido adiposo de seres humanos e de roedores contém todos os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) (Frigolet *et al.*, 2013). Porém, essas adipocinas não serão descritas com detalhes.

### **Tecido adiposo, inflamação e DM2**

Na última década, uma hipótese foi proposta para explicar a patogênese do DM2, ligando a doença a um estado de inflamação crônica (Pickup e Crook, 1998). A inflamação é uma resposta adaptativa de curto prazo do corpo, tendo como componente principal a reparação dos tecidos para lidar com as lesões e infecções microbianas (King, 2008). Esta resposta também está elevada em condições crônicas como neuropatia periférica, doença renal crônica e fígado gordo. Uma vez que, a influência da toxicidade lipídica é bem conhecida por seu papel na resposta inflamatória, estudos sugerem que os níveis anormais de quimiocinas liberadas pelo tecido adiposo em expansão na obesidade, ativam monócitos e aumentam a secreção de adipocinas pró-inflamatórias. Tais citocinas, por sua vez, aumentam a resistência à insulina no tecido adiposo e em outros tecidos, contribuindo para o risco aumentado da ocorrência de DM2 (Badawi *et al.*, 2010).

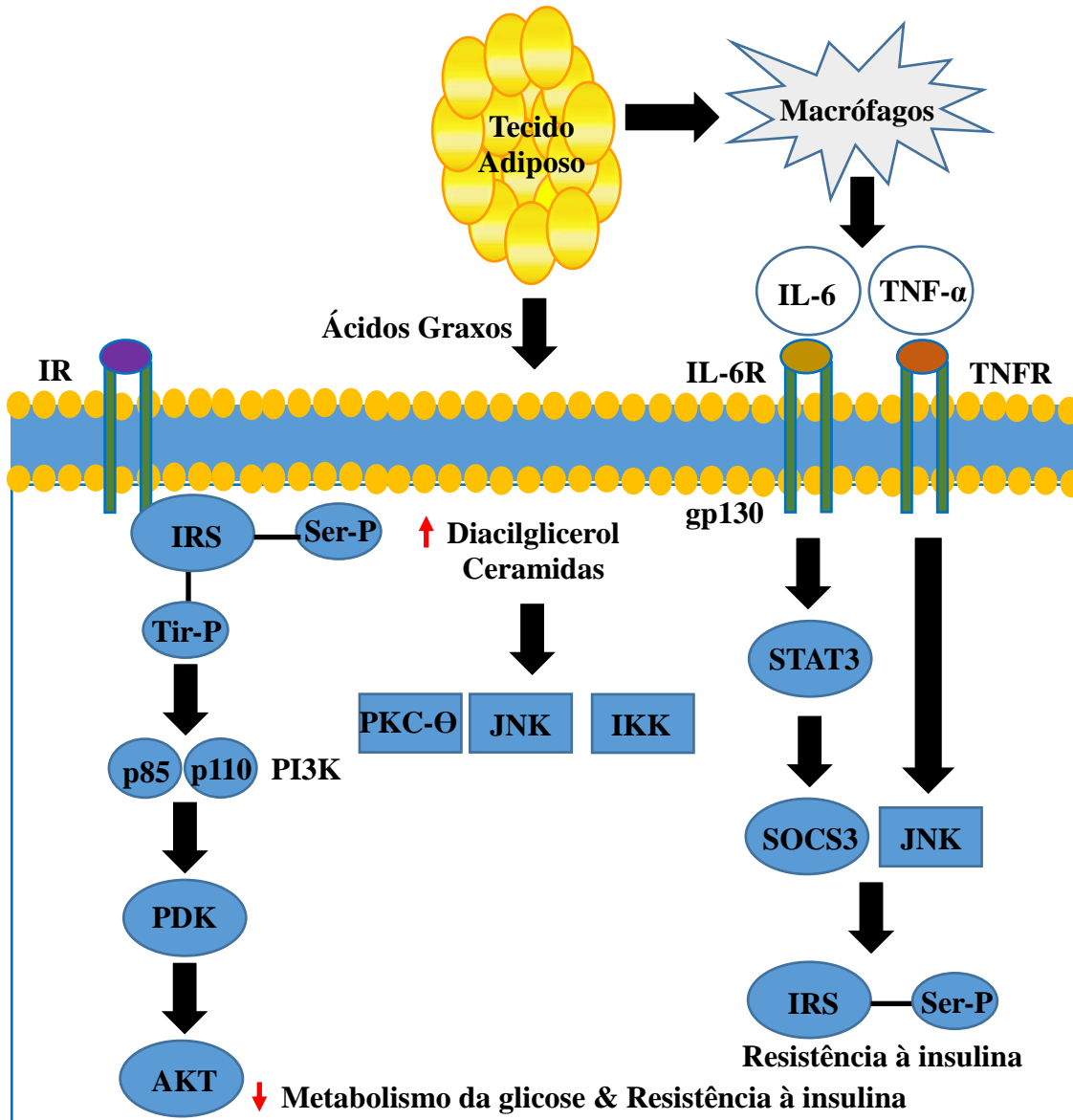
O tecido adiposo secreta produtos e mediadores inflamatórios. Alguns deles são secretados na corrente sanguínea, como a IL-6, a leptina e a adiponectina, enquanto outros, como o TNF- $\alpha$ , parecem exercer seus efeitos de forma autócrina ou parácrina. Novos produtos do tecido adiposo continuam sendo descritos, como o componente 3 do complemento, a proteína estimuladora da acilação, o fator transformador do crescimento  $\beta$ , o fator de crescimento semelhante à insulina, a proteína amiloide A sérica e o PAI-1 importantes na imunidade inata (Jung e Choi, 2014). Na obesidade a liberação desses fatores

pelos adipócitos está comprometida, destacando-se o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , resistência à leptina, redução da adiponectina, aumento de visfatina e resistina relacionados ao ganho de peso e a resistência à insulina respectivamente (Godoy-Matos, 2005).

Estudos realizados em populações humanas têm relatado a relação entre obesidade, inflamação e DM2. O aumento da adiposidade representa um sinal para o recrutamento de células do sistema imune. Esses tipos celulares incluem: linfócitos T CD8, IFN $\gamma$ , células Th1, células B, mastócitos, neutrófilos e macrófagos. Os macrófagos podem ser divididos em classicamente ativados M1 que secretam citocinas pró-inflamatórias e alternativamente ativados M2 que secretam citocinas anti-inflamatórias (Iyer *et al.*, 2010). Muitos estudos têm demonstrado que uma dieta rica em lipídeos pode promover alterações no fenótipo dos macrófagos no tecido adiposo de M2 para M1 o que pode estar contribuindo para acelerar o processo inflamatório neste tecido (Tahergorabi e Khazaei, 2013).

No tecido adiposo ocorrem alterações na população de células T durante a propagação do ciclo inflamatório. As células T reg estão reduzidas e ocorre o aparecimento das células TCD8<sup>+</sup> efectoras responsáveis pela infiltração de macrófagos pró-inflamatórios, podendo ocasionar o rompimento na homeostase do adipócito e ocasionar uma resposta imune com recrutamento de macrófagos pró-inflamatórios da circulação (Lumeng *et al.*, 2009). Este recrutamento pode ser estimulado através do sinal emitido pela ativação dos macrófagos, por quimioatração, pelas quimiocinas CCL2 e pela indução da expressão e liberação de citocinas e moléculas de adesão (Medzhitov, 2008). As células TCD4<sup>+</sup> também presentes na obesidade, liberam IFN- $\gamma$  que promove o recrutamento e ativação de macrófagos pró-inflamatórios (Iyer *et al.*, 2010).

Figura 5 - Ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos e pelo tecido adiposo mediando a resistência à insulina



Fonte: Adaptado de Gray e Kim, 2011.

Os macrófagos presentes no tecido adiposo liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  (Bastard *et al.*, 2006). Em adição, a lipólise encontra-se desregulada promovendo aumento dos níveis de ácidos graxos livres e de outros metabólitos lipídicos como diacilglicerol e ceramidas, ocasionando o desenvolvimento de hiperlipidemia e hiperglicemia promovendo estresse do retículo endoplasmático (Ozawa *et al.*, 2005) e

elevação da fosforilação oxidativa mitocondrial (Brownlee, 2001), culminando com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lin *et al.*, 2005). Todos esses fatores promovem a ativação das proteínas serinas quinase C delta (PKC- $\Theta$ ), quinase cJun NH<sub>2</sub> – terminal (JNK) e I $\kappa$ B quinase- $\beta$  (IKK- $\beta$ ). Essas proteínas são responsáveis pela ativação no núcleo de fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B e da família das proteínas AP-1, ativando a transcrição de genes pró-inflamatórios, sendo responsáveis também pela fosforilação de um resíduo de serina ao IRS-1/2 inibindo a cascata de sinalização da insulina ocasionando resistência à insulina (Ozcan *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004). As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABP), ativadas pelo aumento de ácidos graxos (Figura 5), também promovem a ativação das proteínas JNK e IKK (Wellen e Hotamisligil, 2005).

As citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  liberadas pelos macrófagos também podem ocasionar a ativação do sinal transdutor e ativador da transcrição 3 (STAT3) resultando em aumento da expressão da SOCS3 que atua sobre as proteínas IRS promovendo sua degradação. Essas citocinas também ativam as proteínas serinas JNK ocasionando a fosforilação de um resíduo de serina no IRS conduzindo ao desenvolvimento da resistência à insulina (Gray e Kim, 2011). Figura 5.

## **Alterações hepáticas e DM2**

O fígado é um órgão que desempenha importante papel no metabolismo energético. Entre outras funções, é responsável pelo armazenamento de substratos energéticos que são mobilizados em resposta a curtos períodos de jejum e estresse (Raddatz e Ramadori, 2007). O fígado é o principal reservatório de glicose para os outros tecidos.

Em situações patológicas, quando ocorre um desequilíbrio metabólico o fígado é afetado desenvolvendo uma série de alterações. A NAFLD é atualmente a forma mais comum de doença hepática crônica (Angulo, 2002), sua incidência tem aumentado em paralelo ao exacerbado desenvolvimento da obesidade (Starley *et al.*, 2010). A esteatose hepática é caracterizada por duas fases: acúmulo de triglicerídeos no fígado (esteatose hepática) e inflamação com subsequente fibrose (esteato-hepatite não alcoólica, NASH) (Tarantino *et al.*, 2010). Uma série de fatores complexos está envolvida na progressão da esteatose para a

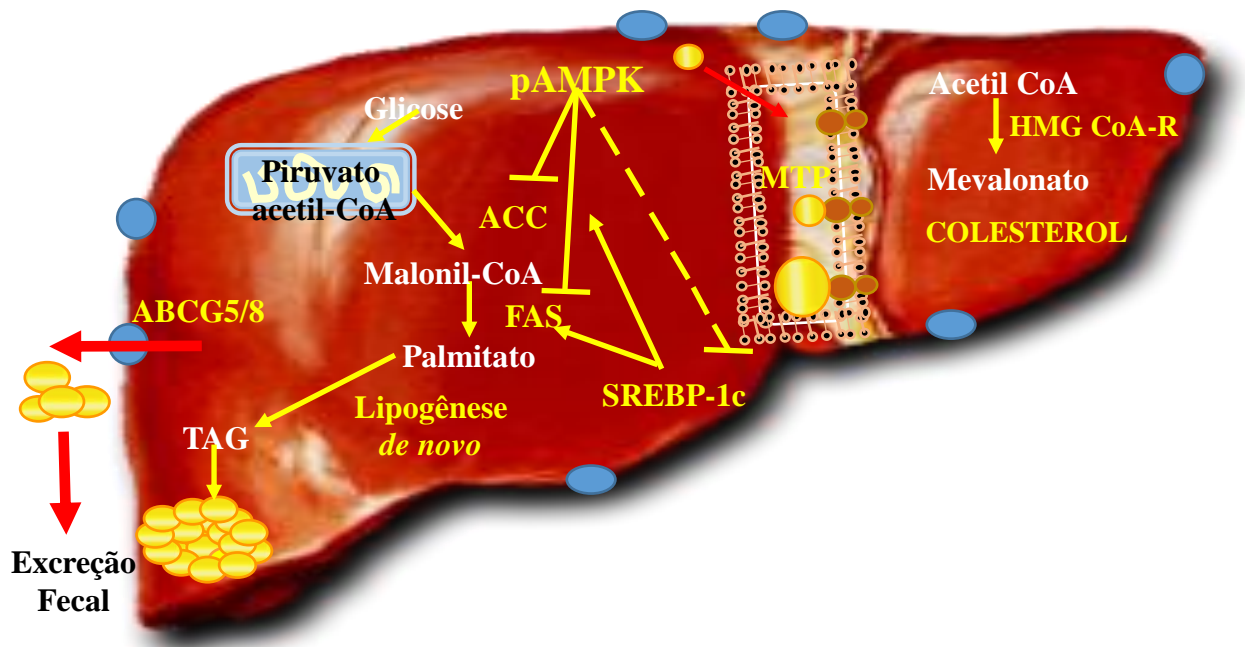
NASH como, a desregulação dos lipídeos, o desequilíbrio de adipocinas, a inflamação adiposa, o estresse oxidativo e a resistência à insulina, sendo considerados os fatores de iniciação o desequilibrado metabolismo lipídico e a resistência à insulina (Polyzos *et al.*, 2012).

Dentro deste contexto, uma importante característica da sinalização da insulina hepática é que o controle da gliconeogênese e da lipogênese é diferencialmente afetado sob condições patológicas de resistência à insulina associadas ao DM2. Sob tais condições, a insulina não consegue suprimir a produção de glicose pelo fígado, enquanto que a indução da lipogênese hepática é sustentada, contribuindo deste modo para os estados hiperglicêmicos e hiperlipidêmicos (Brown e Goldstein, 2008). Em adição, a hiperinsulinemia, ocasionada pela resistência à insulina, resulta em esteatose hepática, aumento da lipogênese via *de novo* (síntese de lipídeos a partir de carbonos fornecidos pela glicose) (Postic *et al.*, 2004) e da lipólise, assim como, em diminuição da oxidação de ácidos graxos livres e da secreção de VLDL hepático (Jung e Choi, 2014).

O acúmulo excessivo de lipídios no fígado geralmente ocorre quando o fluxo de lipídios via aumento da importação de ácidos graxos ou da síntese *de novo*, excede a capacidade de depuração lipídica hepática por oxidação de ácidos graxos ou exportação de triglicerídeos (Bradbury e Berk, 2004), promovendo o aumento da produção de glicose e da síntese de triglicerídeos (Kahn e Flier, 2000).

A expressão de genes lipogênicos é estimulada pela insulina, visto que, a mesma aumenta os níveis de RNAm da proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis (SREBP-1c), resultando no aumento paralelo de genes lipogênicos alvos. Este controle é diferencialmente afetado em condições patológicas de resistência à insulina associada ao DM2 (Yecies *et al.*, 2011). Os membros da família SREBP são sintetizados como moléculas precursoras no retículo endoplasmático e clivados proteoliticamente no complexo de Golgi liberando fatores de transcrição amino-terminais ativos que translocam para o núcleo (Horton, 2002). A SREBP-1c modula a ativação transcricional de genes lipogênicos (Figura 6), tais como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) (Postic e Girard, 2008).

Figura 6 - Esquema simplificado da síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol e excreção de colesterol pela via biliar no fígado



Legenda: Demonstrando o mecanismo das principais proteínas envolvidas nesses processos. Siglas: transportadores da sub-família G (ABCG5 e ABCG8), proteína acetil CoA carboxilase (ACC), proteína ácido graxo sintase (FAS), enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA-R), proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP), proteína quinase ativada por AMP fosforilada (pAMPK) e proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis (SREBP-1c).

Fonte: Adaptado de Postic e Girard, 2008.

A principal fonte de substratos para a síntese de ácidos graxos no fígado é a glicose, mas frutose, galactose, lactato, piruvato e aminoácidos também contribuem para a síntese de acetil-CoA neste órgão. Esta coenzima deve ser exportada, a partir da mitocôndria, como citrato sendo novamente convertida em acetil-CoA. No citosol a ACC realiza a conversão da acetil-CoA em malonil-CoA, fonte de carbonos para a síntese de ácidos graxos (Figura 6). Esta etapa é o principal ponto de regulação da lipogênese *de novo*. A ACC é ativada alostericamente pelo citrato, enquanto simultaneamente inibe o fluxo através da glicólise, mas também pode ser inibida pelos produtos finais da síntese de ácidos graxos como o palmitoil-CoA ou pela proteína AMPK (Hillgartner *et al.*, 1995). Os carbonos fornecidos pela malonil-CoA são unidos e reduzidos pela ação da FAS (Figura 6), formando palmitato, sendo este, o principal produto da lipogênese *de novo*, que também pode servir como substrato para



elongases e dessaturases, para a geração de cadeias mais longas e de ácidos graxos insaturados. No fígado, a maior parte dos ácidos graxos está ligada a um esqueleto de glicerol por aciltransferases, a fim de, produzir triglicerídeos para armazenamento e o acúmulo de malonil-CoA retarda a  $\beta$ -oxidação, inibindo a degradação de ácidos graxos (Leavens e Birnbaum, 2011).

A AMPK é uma proteína que possui um amplo espectro de ações biológicas, sendo responsável dentre outras funções, por regular a síntese e oxidação lipídicas (Figura 6). Neste contexto, a AMPK ocasiona inativação de enzimas envolvidas na lipogênese como a ACC e a FAS, bem como, promove a redução da expressão da SREBP-1c (Viollet *et al.*, 2006), Figura 6. Estudos demonstraram que a atividade da AMPK encontra-se reduzida no DM2, possuindo um importante papel no aumento da lipogênese *de novo* nesta condição (Vergès, 2010).

Em 1960 um importante sítio enzimático de regulação da síntese de colesterol foi identificado no retículo endoplasmático, a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA-R), responsável pela conversão da HMG CoA em mevalonato (Figura 6); o mesmo é posteriormente convertido a pirofosfato de isopentenil, que é polimerizado e modificado para formar colesterol (Brown e Goldstein, 1997). A atuação da enzima HMG CoA-R é um ponto limitante da síntese de colesterol (Yamane *et al.*, 2011).

O VLDL colesterol também é uma lipoproteína produzida e secretada pelo fígado, sendo constituída por um núcleo de lípidos neutros (principalmente triglicerídeos) rodeados por uma monocamada de lípidos anfipáticos (fosfolipídeos, colesterol não esterificado), cuja superfície está ligada a uma proteína estrutural, apolipoproteína B (ApoB 100). O primeiro passo da montagem do VLDL ocorre no retículo endoplasmático rugoso, onde a ApoB, que está associada com a membrana do retículo, é co e pós-traduzida pela ação da proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP), ocasionando a formação de um pré-VLDL (Olofsson *et al.*, 2000; Shelness e Ledford, 2005), Figura 6. Esta proteína desempenha um papel crítico na montagem do VLDL (Di Leo *et al.*, 2005) e segundo dados da literatura sua expressão é aumentada com a ocorrência de resistência à insulina e DM2, sendo os níveis de RNAm da MTP positivamente regulados pela insulina, nessas alterações patológicas (Kuriyama *et al.*, 1998; Bartels *et al.*, 2002).

A homeostase do colesterol no organismo é mantida principalmente pela lipogênese *de novo*, absorção intestinal do mesmo, bem como, por sua excreção biliar e fecal. Os transportadores da subfamília G (ABCG5 e ABCG8) ocasionam a inibição da absorção de

colesterol e esteróis vegetais da dieta, por mediar o efluxo destes esteróis a partir de enterócitos em volta do lúmen intestinal e por promover a secreção eficiente de colesterol e esteróis vegetais a partir dos hepatócitos pela via biliar (Yu *et al.*, 2014), Figura 6. Esses transportadores atuam removendo o excesso do colesterol corporal. Estudos utilizando o modelo experimental de diabetes induzido por STZ demonstraram uma redução desses transportadores de colesterol intestinais e hepáticos (Berg *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005). Outros dados apontaram que indivíduos portadores de DM2 também possuem uma diminuição da expressão do RNAm desses transportadores (Lally *et al.*, 2006).

No desenvolvimento da esteatose hepática muitos fatores estão envolvidos, as proteínas anteriormente citadas, desempenham um papel chave neste processo.

### **Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)**

A planta *Euterpe oleracea* Mart., popularmente conhecida como açaizeiro (Figura 7), uma *Palmácea* da família *Aracaceae* é amplamente encontrada na região Amazônica principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá.

A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces, sendo amplamente consumida no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso gelado são consumidas no Brasil e 1.000 toneladas são exportadas para muitos países como Japão, Estados Unidos e Itália (Embrapa, 2004). Relatos populares indicam os efeitos benéficos do suco de açaí, de uso medicinal, principalmente entre pessoas da região norte e nordeste, sendo utilizado em casos de febre, dor e gripe (Matheus *et al.*, 2006).

Figura 7 - Foto da palmeira contendo o *Euterpe oleracea* Mart. (açai)



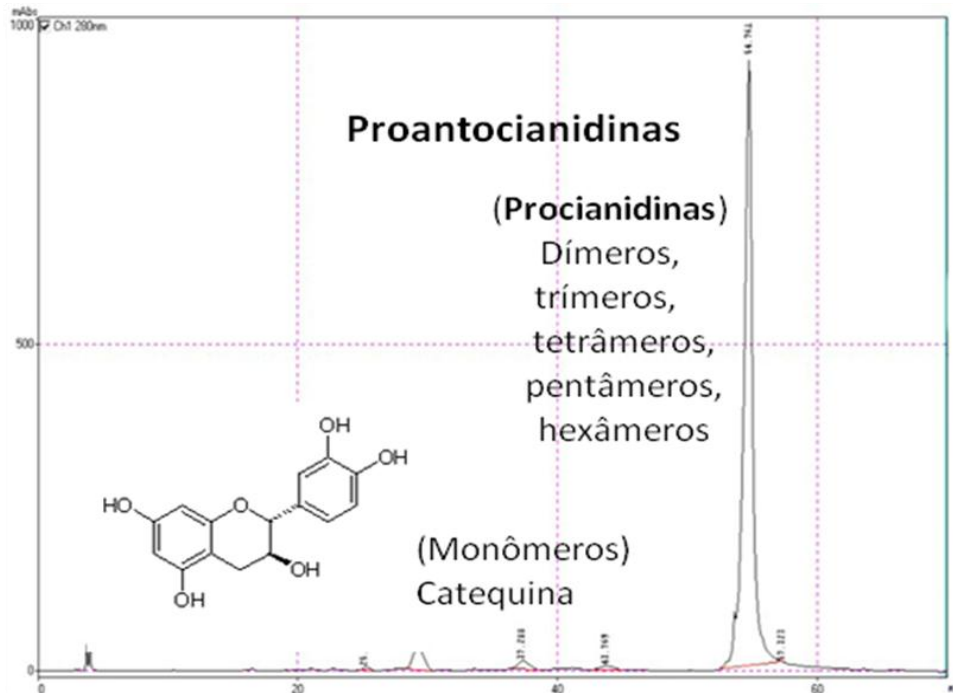
Fonte: Disponível em: <http://www.acaidoforte.com.br/curiosidades-sobre-o-acai/> Acesso em 5 fev. 2015.

Estudos químicos têm mostrado que o açai é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio *et al.*, 2000; Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Gallori *et al.*, 2004). Estudo recente realizado pelo nosso grupo demonstrou que o extrato hidro-alcóolico do caroço do açai (ASE) obtido do fruto é rico em catequinas e proantocianidinas poliméricas (Moura *et al.*, 2012), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa (Figura 8). Estes dados reforçam a maior potência do extrato do caroço em produzir efeito vasodilatador comparada a da polpa do fruto (Rocha *et al.*, 2007).

Evidências crescentes sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra o risco cardiovascular (Stoclet *et al.*, 2004), pois estudos epidemiológicos mostram que a ingestão de polifenóis é inversamente correlacionada com a incidência de doenças cardiovasculares (Manach *et al.*, 2005). Este efeito benéfico dos polifenóis pode ser devido a diferentes propriedades como antioxidantes (Frankel *et al.*, 1993), vasodilatadores, através do aumento da biodisponibilidade de NO, (Fitzpatrick *et al.*, 2000) e/ou anti-hipertensivas (Soares de Moura *et al.*, 2002; 2004). Dados da literatura também sugerem que

estes compostos possam estar envolvidos na proteção contra o risco cardiometabólico (Stoclet *et al.*, 2004, Emiliano *et al.*, 2011; Soares de Moura *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2013).

Figura 8 - Cromatograma do Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí, obtido por HPLC



Legenda: O perfil de eluição observado por HPLC é fortemente indicativo da presença de proantocianidinas. O pico a 37.2min corresponde a catequina, como confirmado por coinjeção de um padrão e por comparação do espectro de absorção no ultravioleta. A eluição tardia (TR 54.7min) e espectro de UV do pico principal são consistentes com a presença de proantocianidinas poliméricas. Mais evidências sobre a estrutura dos compostos presentes no ASE foram fornecidos por espectrometria de massas positiva com ionização por electrospray. O eixo X representa o tempo (min) e no eixo Y está representada a intensidade a 280 nm.

Fonte: Moura *et al.*, 2012.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ASE, cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha *et al.*, 2007, de Oliveira *et al.*, 2010; da Costa *et al.*, 2012; de Bem *et al.*, 2014) e anti-hipertensivo (Rocha *et al.*, 2008, da Costa *et al.*, 2012; de Bem *et al.*, 2014). Demonstramos ainda que o ASE reduz o dano oxidativo (Rocha, *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2012, de Oliveira *et al.*, 2010; da Costa *et al.*, 2012, de Bem *et al.*, 2014) e que possui propriedades anti-inflamatórias (Moura *et al.*, 2012). Estes achados demonstram os efeitos

benéficos do ASE, apresentando importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares.

Em estudos pré-clínicos recentes demonstramos que o ASE apresenta um potencial efeito em reduzir os níveis plasmáticos de renina em ratos espontaneamente hipertensos (dados não publicados), na hipertensão renovascular (da Costa *et al.*, 2012) e em modelo de programação metabólica (de Bem *et al.*, 2014), bem como a prevenção do desenvolvimento da disfunção renal (de Bem *et al.*, 2014). A renina é um componente chave do SRA e alvo de bloqueio farmacológico, portanto, estes achados sugerem que o ASE pode exercer alguma interferência sobre o SRA, que possivelmente poderia contribuir para seu efeito benéfico.

Destacamos ainda, que o tratamento preventivo com ASE reduziu o peso corporal, a gordura abdominal, os níveis glicêmicos, a insulina e a resistência à insulina em camundongos C57BL/6J que consumiram dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) (de Oliveira *et al.*, 2010).

Estes achados como um todo sugerem um importante potencial do ASE, como uma planta medicinal, com propriedades farmacológicas úteis para um possível uso terapêutico no tratamento de doenças cardiometabólicas. Entretanto, não conhecemos os possíveis efeitos do ASE sobre as alterações ocasionadas pelo DM2, e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na potencial proteção metabólica e hepática no diabetes. Sulfoniluréias, biguanidas, tiazolidinediona e  $\alpha$ -glucosidase são fármacos utilizados no controle da hiperglicemia, hiperlipidemia e da resistência à insulina no DM2, mas estas drogas não alteram significativamente o curso das complicações diabéticas e tem limitado uso por causa dos efeitos colaterais indesejáveis e das altas taxas de falhas secundárias (Xing *et al.*, 2009). Por esse motivo, muitos estudos têm sido realizados com compostos polifenólicos (Tan *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010), afim de, encontrar uma terapia alternativa para o tratamento do DM2.

## **Exercício Físico e DM2**

A inatividade física tem sido associada a ambientes obesogênicos, sendo identificado como o quarto principal fator de risco para a mortalidade global, contribuindo para 5,5% das mortes em nível mundial (Fiuza-Luces *et al.*, 2013). Muitos estudos foram publicados sobre a

prática de exercícios físicos regulares, massivamente recomendados por profissionais da saúde e agências do governo (Haskell *et al.*, 2007). A atividade física pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pela contração da musculatura esquelética, que resulta em um aumento substancial de gasto energético, com um conseqüente aumento do consumo de oxigênio devido à demanda muscular. Além disso, o exercício físico consiste no movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo, responsável pela melhora ou manutenção de um ou mais componentes da aptidão física (Caspersen *et al.*, 1985).

O exercício físico promove uma variedade de alterações no sistema cardiovascular, através do aumento da demanda metabólica associada à contração muscular. A estimulação do organismo ocasiona o engajamento de respostas homeostáticas complexas, que são reconhecidas como efeitos agudos ou respostas fisiológicas à atividade física. Com a prática regular de exercícios são desenvolvidas modificações morfológicas e funcionais, conhecidas como efeitos crônicos (da Nobrega, 2005). Estudos demonstram que o exercício aeróbico está envolvido no aumento de grupamentos musculares, sendo recomendado para manutenção ou melhora da atividade cardiovascular (Garber *et al.*, 2011).

O treinamento físico tem recebido crescente reconhecimento como um marco na prevenção e tratamento do DM2. Segundo dados da literatura, recomenda-se que os pacientes diabéticos do tipo 2 pratiquem exercícios aeróbicos regulares de intensidade moderada (Colberg *et al.*, 2010), realizando minimamente 210 minutos de atividade física por semana. Também tem sido demonstrado que o exercício de resistência ocasiona inúmeras alterações fisiológicas benéficas como o aumento da utilização máxima de oxigênio ( $VO_2$  max) e da atividade cardiopulmonar, bem como adaptações periféricas, como o aumento do transporte e oxidação de ácidos graxos, melhora da densidade capilar e da capacidade mitocondrial (Holloszy e Coyle, 1984), mas principalmente por seu importante papel no controle glicêmico (Colberg *et al.*, 2010). Os efeitos benéficos à saúde promovidos pelo treino de resistência, no entanto, passaram a ser reconhecidos e caracterizados há pouco tempo. Anteriormente, na década de 90, as principais sociedades americanas de saúde não incluíam orientações com a recomendação do treino de resistência, para o treinamento físico e a reabilitação (Strasser e Pesta, 2013).

Evidências de ensaios clínicos randomizados mostraram que o exercício físico ocasiona melhora no controle glicêmico, aumenta a disponibilidade de glicose, possui efeito

hipolipidêmico e reduz o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular em pacientes com DM2 (Umpierre *et al.*, 2011).

Para a indução dos efeitos metabólicos benéficos descritos, o exercício físico estimula a síntese de glicogênio através da inibição da GSK3 pela AKT (Case *et al.*, 2011). A inibição dessa proteína ocasiona a ativação da glicogênio sintase (GS), contribuindo para a síntese de glicogênio. O aumento da atividade da GS mediado pela AKT é, portanto, uma adaptação importante para o controle glicêmico em resposta à atividade física (Strasser e Pesta, 2013). Estudos também observaram uma atividade aumentada da AMPK em resposta ao exercício físico. A ativação desta proteína pode estar ocasionando a fosforilação de proteínas alvo envolvidas em uma série de cascatas de sinalização metabólicas, que resultam no aumento das vias de geração de ATP, como a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT-4 e a oxidação de ácidos graxos (Mu *et al.*, 2001). Ademais, o treinamento físico através de seu efeito de sensibilização à insulina, conduz ao aumento da beta-oxidação e a uma utilização mais equilibrada dos ácidos graxos como substratos (Holten *et al.*, 2004).

Estas adaptações podem ser responsáveis por restaurar a flexibilidade metabólica em indivíduos com DM2 em resposta ao exercício físico regular.

## 1 OBJETIVO

### 1.1 Objetivo geral

Com o objetivo de ampliar nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí, avaliamos neste estudo os efeitos do tratamento com ASE sobre as alterações fisiológicas, metabólicas, moleculares e morfológicas associadas ao modelo experimental de DM2.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito do tratamento com ASE sobre os níveis glicêmicos, insulinêmicos e a IR em ratos diabéticos;
- b) Investigar se o tratamento com ASE modifica os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL e VLDL em ratos diabéticos;
- c) Analisar o efeito do ASE sobre a disfunção endotelial e do músculo liso vascular em resposta a agentes vasodilatadores e vasoconstrictores em leito arterial mesentérico (LAM) isolado de ratos diabéticos;
- d) Avaliar o efeito do tratamento com ASE sobre a peroxidação lipídica (MDA), a carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, catalase e GPx, utilizando homogenato de tecido adiposo epididimal (TAE), fígado e plasma em ratos diabéticos;
- e) Analisar se o tratamento com ASE modifica a produção de NO, determinada pela medida do conteúdo total de nitrito, utilizando homogenato de TAE, fígado e plasma em ratos diabéticos;
- f) Estudar se o tratamento com ASE altera a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 em amostras de soro em ratos diabéticos;



- g) Investigar se o ASE altera a expressão das principais proteínas da cascata de sinalização de insulina (IR, substrato do receptor de insulina-1 fosforilado (pIRS-1), Akt, Pakt, GLUT-4 e da proteína fosforilada quinase cJun NH<sub>2</sub> – terminal (pJNK)) e de adipocinas como a adiponectina e a leptina em homogenato de TAE em ratos diabéticos;
- h) Avaliar se o ASE modifica a expressão das principais proteínas da cascata de sinalização de insulina (IR, Akt, pAKT e GLUT-4) em homogenato de tecido muscular esquelético em ratos diabéticos;
- i) Avaliar a ação do ASE sobre a expressão de proteínas envolvidas na síntese de VLDL (MTP) e de ácidos graxos (pAMPK, pACC, FAS e SREBP-1c) em homogenato de tecido hepático em ratos diabéticos;
- j) Estudar a ação do ASE sobre a expressão de proteínas envolvidas na síntese de colesterol (HMG CoA-R) e da secreção do mesmo pela via biliar (ABCG5 e ABCG8) em homogenato de tecido hepático em ratos diabéticos;
- k) Analisar o efeito do ASE sobre o conteúdo de glicogênio e o perfil lipídico hepático em ratos diabéticos;
- l) Avaliar a ação do ASE sobre alterações morfológicas e histológicas hepáticas em animais diabéticos;
- m) Investigar se o exercício físico potencializa os efeitos do ASE.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais utilizados e modelo experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (Nº CEUA/058/2012).

Para este estudo foram utilizados 80 ratos wistar (180-200g) machos. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/ UERJ, alocados no mesmo. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura média de  $(23 \pm 2^\circ\text{C})$  e umidade  $(60 \pm 10\%)$  controladas. O ciclo de sono-vigília foi de 12 h, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, submetidos durante cinco semanas as seguintes dietas:

- a) Grupo Controle: animais (n=40) que receberam dieta padrão (com 10% de lipídeos/kg), (Tabela 1);
- b) Grupo Hiperlipídico: animais (n=40) que receberam dieta hiperlipídica (com 55% de lipídeos/kg), (Tabela 1; Figura 9).

Após três semanas de utilização das dietas, os animais do grupo Hiperlipídico receberam uma injeção intraperitoneal de STZ ( $35 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Figura 9). Duas semanas depois, completando cinco semanas de utilização da dieta hiperlipídica (55% de lipídeos), foi constatada a hiperglicemia nesses animais (Figura 9). Os grupos controles receberam injeção intraperitoneal do veículo, para serem submetidos às mesmas condições. A partir da quinta semana, todos os animais (controles e hiperlipídicos que receberam STZ) foram alimentados com dieta padrão (10% de lipídeos) até o final do experimento (Figura 9).

A partir da quinta semana, com a indução do DM2, os animais foram divididos em oito grupos experimentais:

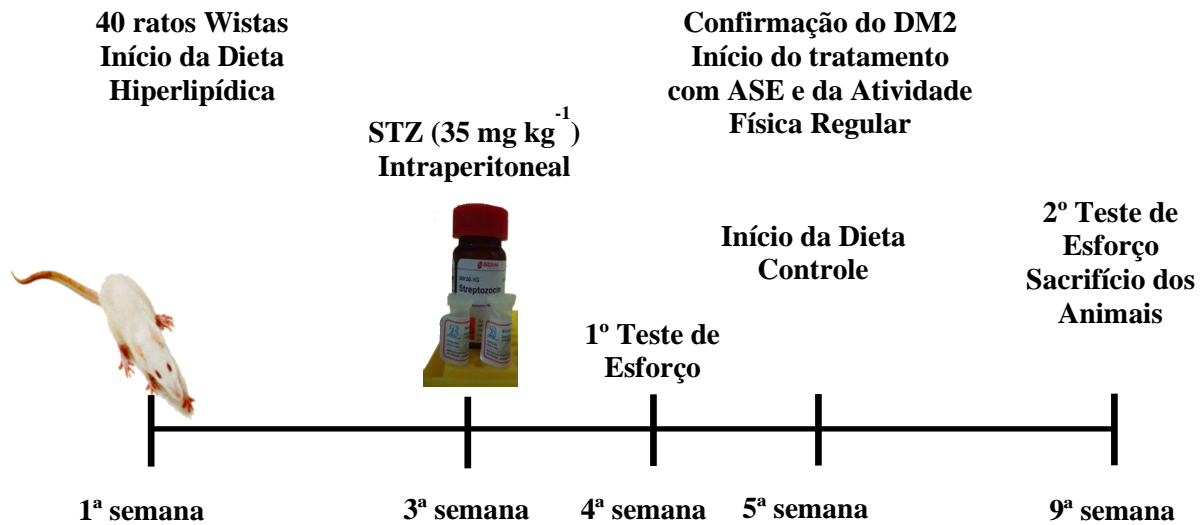
- a) **Controle Sedentário (CS):** animais não tratados que receberam dieta padrão (10% de lipídeos);

- b) **Controle Treino (CT):** animais que receberam dieta padrão (10% de lipídeos) e treinaram em esteira rolante (5 dias/semana);
- c) **Controle ASE Sedentário (CAS):** animais que receberam dieta padrão (10% de lipídeos) e foram tratados com ASE (200 mg/kg/dia);
- d) **Controle ASE Treino (CAT):** animais que receberam dieta padrão (10% de lipídeos) que foram tratados com ASE (200 mg/kg/dia) e treinaram em esteira rolante (5 dias/semana);
- e) **Diabético Sedentário (DS):** animais não tratados que receberam dieta hiperlipídica (55% de lipídeos) e STZ (35 mg kg<sup>-1</sup>);
- f) **Diabético Treino (DT):** animais que receberam dieta hiperlipídica (55% de lipídeos) e STZ (35 mg kg<sup>-1</sup>), que treinaram em esteira rolante (5 dias/semana);
- g) **Diabético ASE Sedentário (DAS):** animais que receberam dieta hiperlipídica (55% de lipídeos) e STZ (35 mg kg<sup>-1</sup>), que foram tratados com ASE (200 mg/kg/dia);
- h) **Diabético ASE Treino (DAT):** animais que receberam dieta hiperlipídica (55% de lipídeos) e STZ (35 mg kg<sup>-1</sup>), que foram tratados com ASE (200 mg/kg/dia) e treinaram em esteira rolante (5 dias/semana).

O tratamento com ASE e a atividade física foram iniciados após o período de indução do DM2 (5 semanas de dieta hiperlipídica e uma dose de STZ) e tiveram duração de quatro semanas (Figura 9). A administração do ASE (200 mg/kg/dia) foi efetuada por gavagem intragástrica, sendo o volume administrado de 500 a 600 µL. Para a realização da atividade física, os ratos foram submetidos a um teste ergométrico em esteira rolante (Figura 9), para determinação da capacidade de exercício (maiores detalhes na sessão 2.3). O treinamento aeróbio foi realizado em esteira, cinco vezes por semana, a uma intensidade correspondente a 60% da capacidade máxima de exercício (determinada pelo teste de esforço), e a duração de cada sessão foi de trinta minutos.

O modelo experimental foi adaptado de Sharma *et al.* (2011). Os animais foram alimentados com livre acesso à ração (Tabela 1) e água durante todo período experimental e as rações utilizadas foram balanceadas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil) baseadas na AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993).

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental



Fonte: A autora, 2015.

Tabela 1 - Composição das dietas padrão e hiperlipídica

<i>Ingredientes</i>	<i>Dietas p/1kg</i>	
	<i>Padrão</i>	<i>Hiperlipídica</i>
Amido de milho	465,7 g	147,6 g
Amido dextrinizado	155,0 g	155,0 g
Caseína	140,0 g	180,1 g
Sacarose	100,0 g	100,0 g
Óleo de soja	40,0 g	40,0 g
Banha de porco	0,0	278,0 g
Celulose microcristalina	50,0 g	50,0 g
L-cistina	1,8 g	1,8 g
Cloreto de colina	2,5 g	2,5 g
BHT	0,008 g	0,008 g
Mix mineral	35,0 g	35,0 g

Mix vitamínico	10,0 g	10,0 g
----------------	--------	--------

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital. Para a obtenção do número de animais (n=80) para o desenvolvimento do protocolo experimental e a obtenção dos resultados, montamos o modelo experimental (Figura 9) duas vezes, o primeiro em 2011 e o segundo em 2012. Cabe aqui ressaltar que a administração da baixa dose de STZ (35 mg kg<sup>-1</sup>) intraperitoneal utilizada, induz a uma perda de aproximadamente 30% dos animais, pois não desenvolvem hiperglicemia impossibilitando sua utilização para o estudo das alterações ocasionadas no DM2.

## 2.2 Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí

Utilizamos frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açaí), provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Professor Dr. Pergentino José Cunha Souza, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Após a lavagem dos frutos, aproximadamente 200 g de caroço foram separados, triturados, embebidos em 400 mL de água destilada e então fervidos por cinco minutos. Imediatamente após a fervura acrescentou-se 400 mL de etanol. O extrato hidroalcoólico foi guardado em geladeira e agitado periodicamente por 2 a 4 h ao longo de 10 dias. Ao final deste período, o extrato foi filtrado em papel de filtro tipo xarope e posteriormente em papel de filtro tipo Whatman número 1. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (Rocha *et al.*, 2007). Após o preparo de todos os extratos, o conteúdo de polifenóis foi medido por Folin Ciocalteu, assim como, o seu potencial vasodilator verificado através da reatividade vascular, essas medidas são utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização. A dose tóxica de administração do ASE é a partir de 1,5 g/kg (dados não publicados).

### 2.3 Protocolo de treinamento físico

Antes do início do treinamento físico aeróbico em esteira rolante (Figura 9), na quarta semana de utilização das dietas padrão e hiperlipídica, uma semana antes do início dos tratamentos, os 80 animais foram divididos em 4 grupos experimentais controles sedentários (n=20), controles treino (n=20), diabéticos sedentários (n=20) e diabéticos treino (n=20). Os animais dos grupos controle treino e diabético treino foram submetidos a um teste progressivo máximo para a determinação da intensidade de treinamento. O teste consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado em esteira rolante (Figura 10), com velocidade inicial de 3m/min, incrementada de 4m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, momento em que não mantém mais o padrão de corrida.

Figura 10 - Foto do treinamento em esteira rolante



Fonte: A autora, 2015.

O treinamento físico foi realizado em esteira rolante (Figura 10), a partir da quinta semana do protocolo experimental, durante quatro semanas, cinco vezes por semana, com duração de trinta minutos cada sessão. A intensidade do treinamento foi estabelecida em 60% da velocidade máxima atingida durante o teste progressivo máximo, que corresponde a

máxima fase estável de lactato e a uma intensidade de treinamento moderada (Matsuura *et al.*, 2010).

O teste progressivo máximo foi repetido mais uma vez ao final das quatro semanas de tratamento para verificar as alterações no tempo e na distância percorrida, ocasionadas pelo treinamento físico.

## 2.4 Dosagens séricas

### 2.4.1 Glicemia

A medida da glicemia de jejum foi realizada uma vez por semana durante todo o período experimental nos animais em jejum de doze horas, sendo realizada com o auxílio de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche<sup>®</sup>), baseado na reação glicose-glicose oxidase.

### 2.4.2 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  $\mu\text{UI/mL}$ .

### 2.4.3 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através do índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment) calculado pela fórmula: insulina de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ ) x glicose de jejum (mmol/L)/22,5 (de Oliveira *et al.*, 2010).

#### 2.4.4 Análise funcional das células beta pancreáticas

A análise funcional das células beta pancreáticas foi realizada utilizando-se os valores da glicemia de jejum e da insulina de jejum como descrito na fórmula:

$$\text{HOMA } \beta = \frac{(20 \times \text{Insulina de jejum})}{(\text{Glicemia de jejum} \times 0,0555) - 3,5}$$

#### 2.4.5 Perfil lipídico

Os níveis séricos dos triglicerídeos, do colesterol total, da lipoproteína de alta densidade (HDL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinados através de kits comerciais (Analisa®, Brasil), que se baseiam em métodos não-enzimáticos colorimétricos. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

A análise dos níveis da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi realizada utilizando-se:

$$\text{VLDL} = \frac{\text{Triglicerídeo sérico}}{5}$$

#### 2.4.6 Perfil pró-inflamatório

Os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 foram determinados através de kits de ELISA comerciais (Peprotech), seguindo as especificações do fabricante. As concentrações séricas foram expressas em pg/mL.



## 2.5 Análise da expressão de proteínas por *Western Blotting*

O TAE (240 mg) foi homogeneizado em 700  $\mu$ L 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  $\mu$ L de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados (13000 rpm, 4°C por 25 min).

O tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado com 2 mL do tampão de lise, acima descrito, contendo 1  $\mu$ L de coquetel inibidor de proteases, centrifugados (13000 rpm, 4°C for 20 min) e sonicado (3 vezes com dez segundos de *pulse on* e quinze segundos de *pulse off*).

A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific 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 (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras foram analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 20  $\mu$ g 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-AKT (1:1000); anti-pAKT (1:1000); anti-GLUT-4, anti-pJNK, anti-LEPTINA (1:1000), anti-ADIPONECTINA (1:1000) e anti- $\alpha$  actina (1:1000) para homogenato de TAE; anti-IR (1:1000); anti-AKT (1:1000), anti-pAKT (1:1000) e anti- $\alpha$  tubulina (1:1000) para homogenato de tecido muscular esquelético, bem como, anti-MTP, anti-pAMPK; anti-AMPK; anti-pACC, anti-FAS, anti-SREBP-1c, anti-HMG CoA-R, anti-ABCG5 e anti-ABCG8 (ambos a 1:1000) para o homogenato de tecido hepático e anti- $\beta$  actina (1:500) para os homogenatos de todos os tecidos (com anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA,

EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com o 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).

## **2.6 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato**

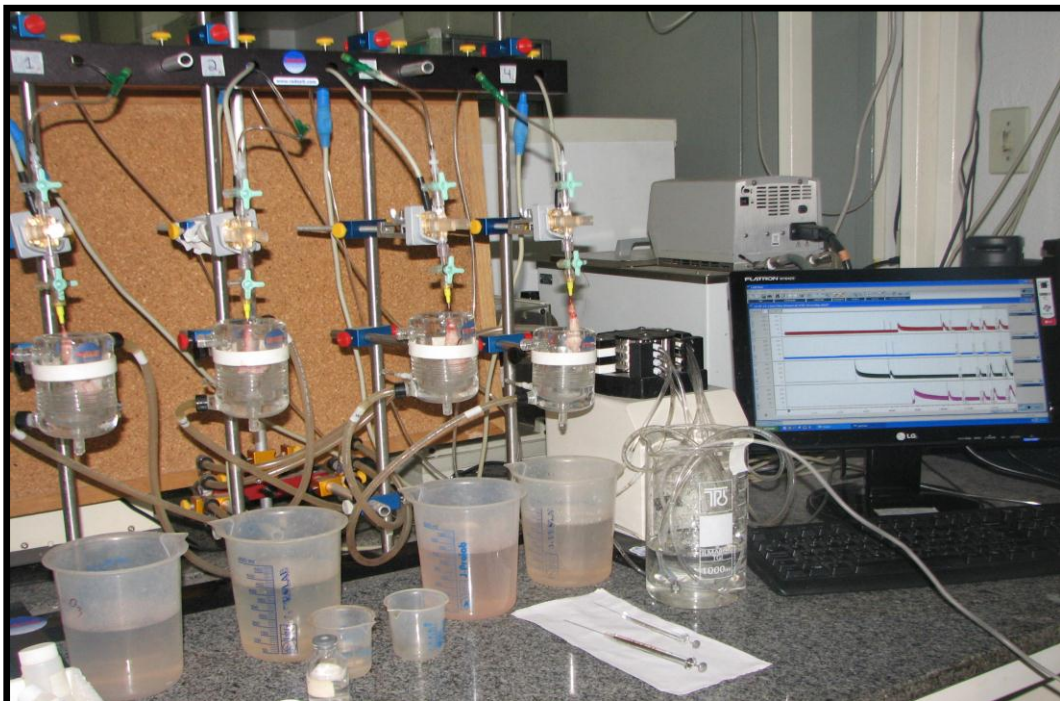
Após o período experimental, os ratos foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) sendo sua administração por via intraperitoneal, para a coleta de sangue arterial através da aorta abdominal, e em seguida submetidos a laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umidecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 1,86 g, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 1,42 g (Resende *et al.*, 1997). Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

## 2.7 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa (PowerLab 4/30) (Figura 11).

Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mmHg (Resende *et al.*, 1997) e então foram administradas injeções de 120 µmol de KCl de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a noradrenalina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 µM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

Figura 11- Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico



Fonte: A autora, 2015.

Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a capacidade do endotélio vascular de liberar NO, com a injeção de Ach (1-1000 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG) 1-1000 nmol, substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. Foi adicionada a solução de Krebs para ser perfundida na preparação vascular, a fim de retornar à pressão basal. Após, foram feitas injeções em doses crescentes de NE (1-3000 nmol) para atingir a contração máxima. A resposta vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela NE e a resposta pressora foi expressa pelo % de contração subtraído da pressão basal. As injeções “in bolus” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microseringas Hamilton de 10 e 100 µl. O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 µL.

## 2.8 Ensaio pró-oxidantes

### 2.8.1 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 peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma.

Foram utilizados 200 µL de homogenato de TAE e fígado para 400 µL de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foram utilizados 200 µL de amostra, diluídos em

600µL de TCA. As amostras foram centrifugadas por dez 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 trinta minutos. Deixou-se esfriar por cinco minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

### 2.8.2 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas, (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<sup>-1</sup> em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 200µL de homogenato de TAE e 100µL de homogenato de fígado e amostras de plasma em duplicata. Foram 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 600 g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCl 2 M 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 trinta minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro (370 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

### 2.9 **Atividade das enzimas antioxidantes**

A medida da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase (CAT) e GPx foi realizada em amostras de plasma, e em homogenato de TAE e fígado preparados com tampão

fosfato (NaCl 5,84 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH: 7,4.

### 2.9.1 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 e Calabrese (1982) para a medida no plasma, e adaptando-a para o tecido vascular, rim e coração.

Foram utilizados 20, 60 e 100 µL de cada amostra de plasma; 40, 100 e 160 µL de cada amostra de homogenato de TAE e 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, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de cento e oitenta segundos.

### 2.9.2 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 40 µL de amostra de plasma, 200 µL de amostra de homogenato de TAE e 60 µL de amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240 nm;

Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de sessenta segundos (Aebi, 1984).

### 2.9.3 Medida da glutathiona peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H<sub>2</sub>O 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 espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 50 µL de amostra de plasma, 200 µL de homogenato de TAE e 20 µL de amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 µL de tampão fosfato, glutathiona reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

### 2.10 **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 (NO<sub>2</sub>), 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 dez minutos foram adicionados 50 µL da solução 2. Após a homogeneização, a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro ou leitor de microplacas. O resultado foi representado em µM (ou mMol)/ mg proteína.

### 2.11 Perfil lipídico hepático

O conteúdo total de triglicerídeo hepático foi avaliado por adaptação da metodologia previamente descrita por Folch *et al.*, (1957). Resumidamente, 50 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de álcool isopropílico (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugados (1500 rpm, 10 min, 4°C). O conteúdo de triglicerídeos e colesterol em 20 µL do sobrenadante foi quantificado com kit colorimétrico de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin, BH, MG, Brasil). A leitura foi realizada a 490–540 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

### 2.12 Glicogênio hepático

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada com kit comercial (Doles, Goiânia, GO, BR) em método previamente descrito por Trevenzoli *et al.*, (2010). As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas com 4 mL de TCA (10%). Após a centrifugação (3000 rpm, 10 min, 4°C) foram adicionados 5 mL de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) a 2 mL do sobrenadante. Após doze horas de incubação à -20°C a mistura foi centrifugada (3000 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O



glicogênio foi hidrolisado pela incubação do *pellet* com HCl 1 M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) por trinta minutos. Adicionou-se 1 mL de NaOH 1 M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200 µL do sobrenadante a 510 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

### 2.13 Histologia do fígado

Fragmentos aleatórios de todos os lobos do fígado foram retirados de cinco ratos de cada grupo experimental estudado e foram fixados em formalina de Millong (formaldeído 37-40% 100 mL, NaOH 4,2 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18,6 g em 1 L de água destilada). Os fragmentos fixados foram embebidos em Paraplast plus para realização de cortes não seriados de 5 µm. Os cortes foram alocados em lâminas histológicas para a coloração com hematoxilina/eosina, a fim de, identificar a arquitetura do fígado por microscopia óptica. Foram tiradas dez fotografias aleatórias por animal para avaliar a esteatose e a arquitetura do fígado. A avaliação da esteatose hepática foi realizada através do método de contagem de pontos, o sistema teste contém uma grade com trinta e seis pontos (PT). A densidade de volume (V<sub>v</sub>) foi estimada pela fórmula:  $V_v \text{ [esteatose]} = PP \text{ [esteatose]} / PT \text{ [fígado]}$ . Onde PP é o número de pontos que estão sobre gotículas de gordura no tecido hepático e PT é o total de pontos do sistema teste (36) (Catta-Preta et al., 2011). Todas as imagens foram escolhidas ao acaso (formato JPG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) e fotografadas com câmera Olympus DP71 Olympus BX40 acoplada ao 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 ANÁLISE ESTATÍSTICA

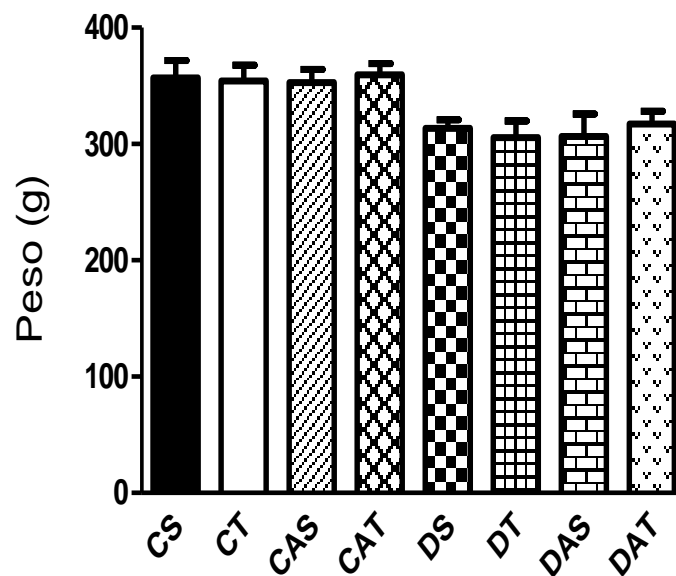
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O programa SPSS IBM Statistics (IBM corporation softwares, Inc., Chicago, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e para obtenção dos gráficos foi utilizado GraphPad Prism 5 (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se Tree-way analysis of variance (ANOVA), para comparar as diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Tukey e Bonferroni, sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Para as análises glicêmicas foram utilizadas medidas repetidas e quando analisadas as diferenças entre dois grupos foi utilizado o Teste-t.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o peso corporal

Não houve alteração estatística no peso corporal, aferido ao final do experimento, nos animais dos diferentes grupos estudados (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o peso corporal



Fonte: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo.  $p < 0,05$  conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

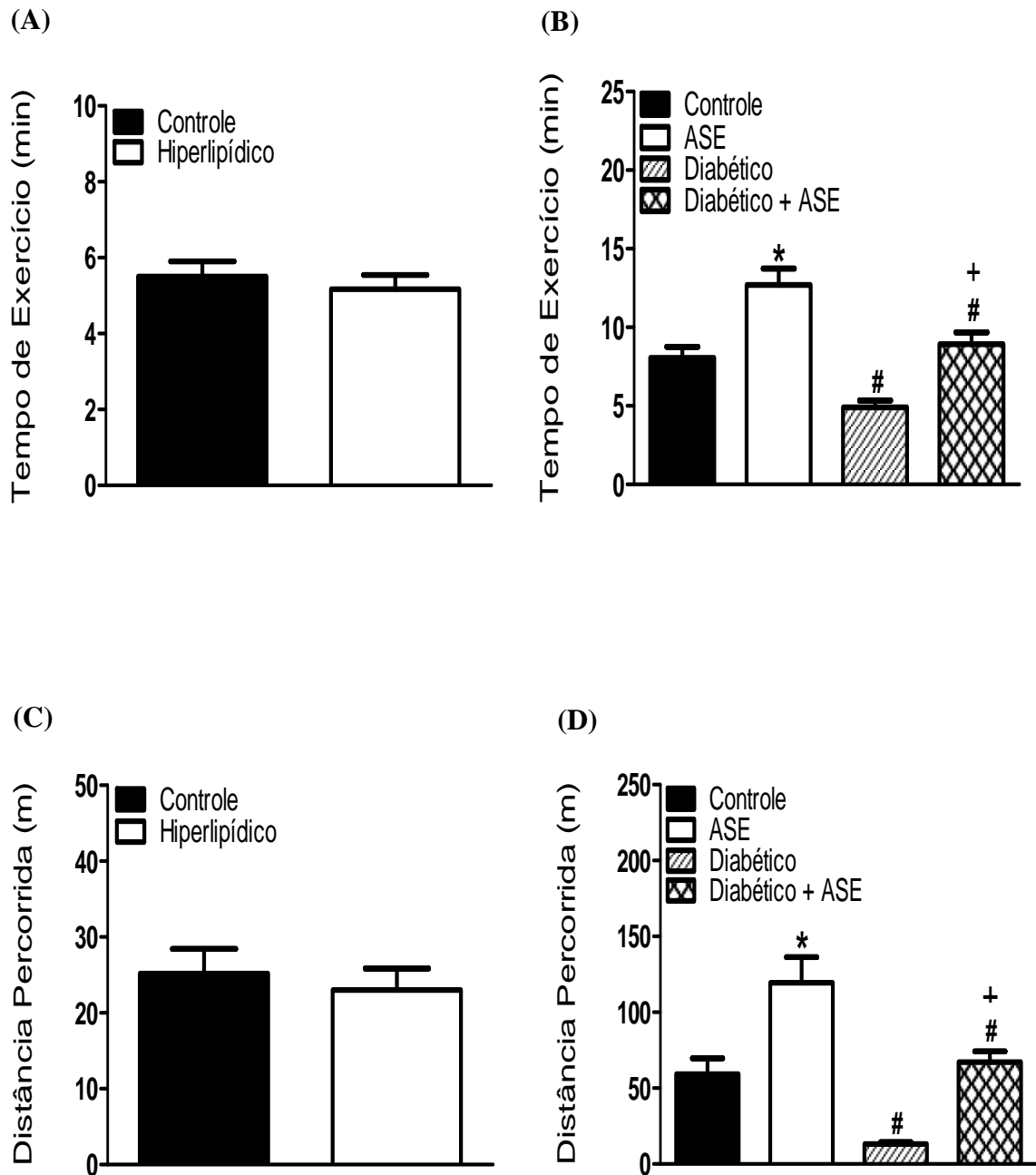
#### 4.2 Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo

No primeiro teste progressivo máximo, realizado na quarta semana de utilização da dieta hiperlipídica, uma semana após a injeção de estreptozotocina, antes do início do tratamento com ASE e da atividade física regular, nenhuma diferença estatística foi observada entre o grupo hiperlipídico e o controle para o tempo de corrida e a distância percorrida ao longo do teste (Figura 13A e 13C).

Após quatro semanas de tratamento com ASE e de atividade física regular, no final do experimento, foi realizado o segundo teste progressivo máximo. Neste teste foi constatado, que os animais do grupo diabético que treina, se exercitaram por um tempo menor ( $p < 0,05$ ) na esteira rolante quando comparados aos animais do grupo ASE (controles tratados com ASE) (Figura 13B). O tratamento com ASE no grupo diabético (Diabético+ASE) aumentou ( $p < 0,05$ ) o tempo de exercício quando comparado ao grupo diabético (Figura 13B). Observamos também o aumento do tempo de treinamento ( $p < 0,05$ ) no grupo controle tratado com ASE quando comparado ao grupo controle e aos grupos diabéticos com e sem extrato (Figura 13B).

Neste mesmo teste progressivo máximo, realizado no período final do experimento, após quatro semanas de tratamento com ASE e de treinamento físico regular, observamos que os animais do grupo diabético percorreram distâncias menores ( $p < 0,05$ ), durante o teste, quando comparados aos animais do grupo ASE (Figura 13D). O tratamento com ASE aumentou a distância percorrida ( $p < 0,05$ ) pelo grupo diabético (Diabético+ASE) (Figura 13D). Encontramos também maior metragem percorrida pelo grupo controle tratado com ASE quando comparado ao grupo controle e aos grupos diabéticos com e sem extrato (Figura 13D).

Figura 13 - Efeito do tratamento com ASE sobre os parâmetros avaliados no teste de esforço



Legenda: Animais: controles, controles tratados com ASE (ASE), diabéticos e diabéticos tratados com ASE (Diabético + ASE). Tempo de exercício durante o teste de esforço antes do tratamento (A) e ao final do tratamento (B). Distância percorrida durante o teste de esforço antes do tratamento (C) e ao final do tratamento (D).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Letra (A) e (C)  $p < 0,05$  conforme determinado pelo Testes-t. Letra (B) e (D) \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo ASE; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo diabético, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.3 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos

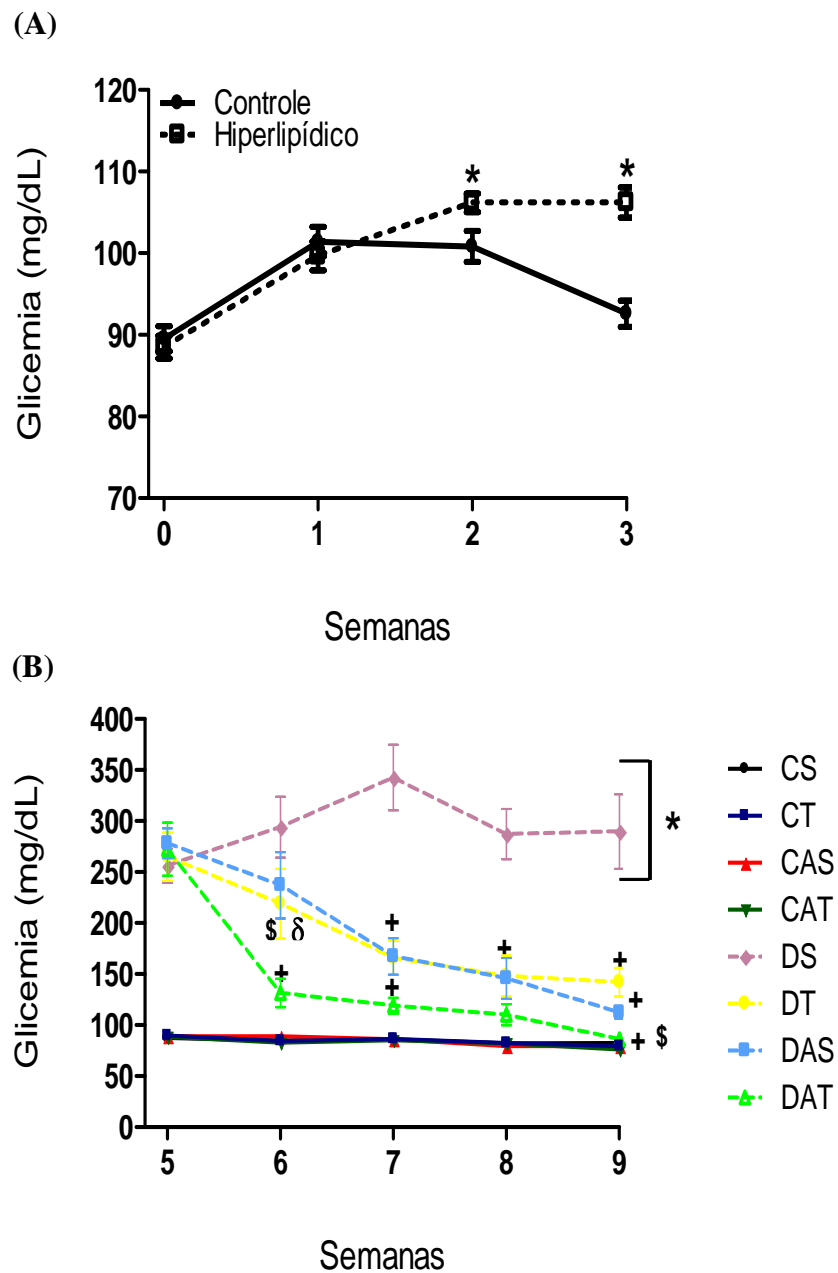
Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um discreto aumento da glicemia ( $p < 0,05$ ) a partir da segunda semana de dieta, quando comparados aos animais que receberam dieta controle (Figura 14A).

Duas semanas após a injeção de STZ, ou seja, na quinta semana do estudo, foi constatada a hiperglicemia nos animais dos grupos diabéticos ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos controles (Figura 14B). O grupo DS permaneceu com níveis glicêmicos elevados ( $p < 0,05$ ) durante todo o período experimental (Figura 14B).

Após a primeira semana de tratamento, a associação da administração do ASE à atividade física reduziu acentuadamente ( $p < 0,05$ ) a glicemia nos animais do grupo DAT quando comparados aos demais grupos diabéticos (Figura 14B).

Nas semanas seguintes o tratamento com ASE e a atividade física isoladamente ou associados reduziram ( $p < 0,05$ ) a glicemia nos grupos diabéticos quando comparados ao grupo DS (Figura 14B). Na última semana foi observado que o tratamento com ASE associado ao exercício diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis glicêmicos mais consistentemente do que a atividade física isoladamente (Figura 14B).

Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis glicêmicos durante a ingesta da dieta hiperlipídica (A) e níveis glicêmicos depois da administração da STZ, período de hiperglicemia estabelecida e de realização dos tratamentos (B).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Letra (A) \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, conforme determinado pelo Teste-t. Letra (B) \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p < 0,05$  em relação ao grupo DT;  $\delta$   $p < 0,05$  em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### **4.4 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis insulinêmicos, HOMA-IR e HOMA-B**

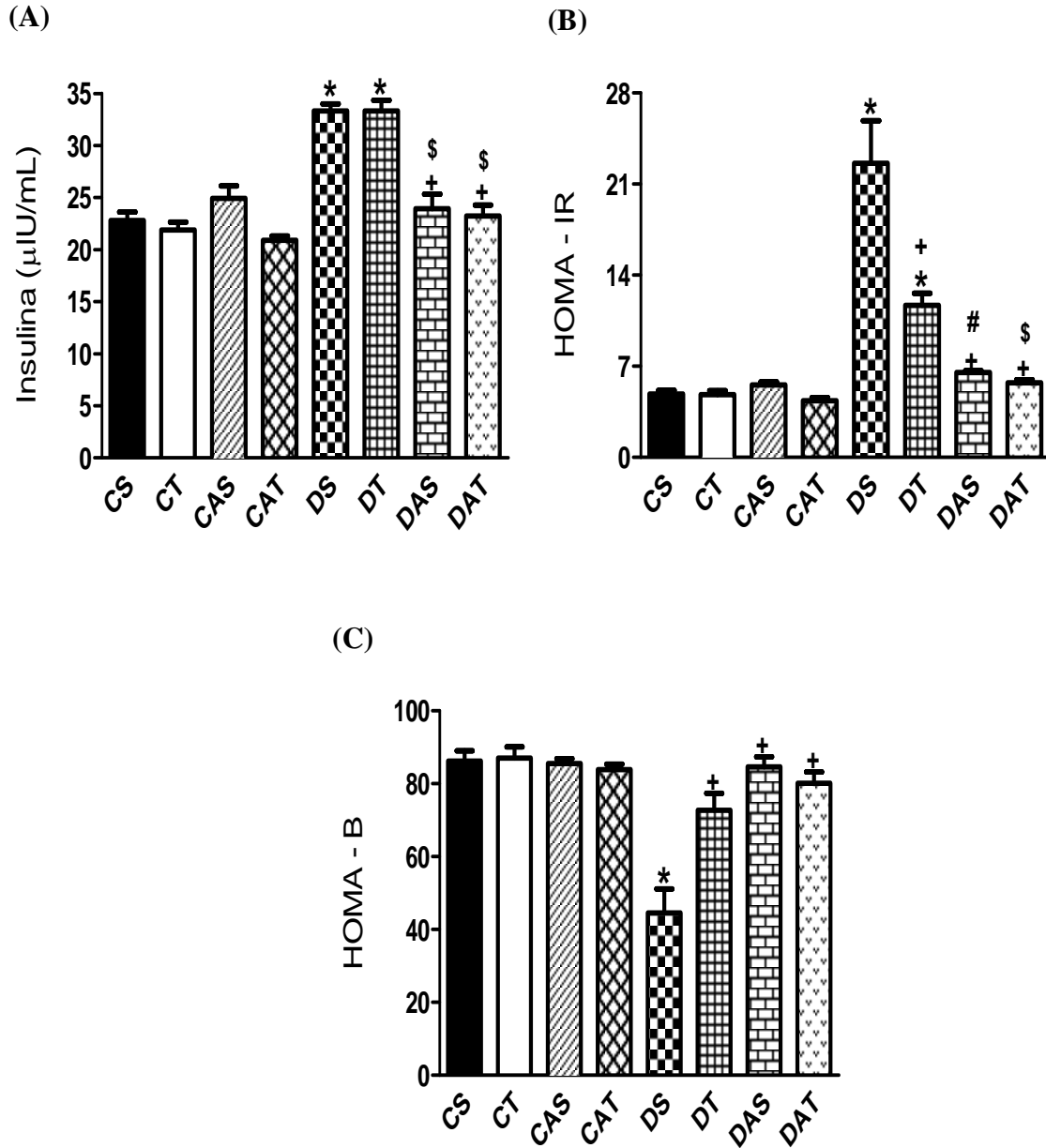
Os níveis séricos de insulina foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos grupos DS e DT, quando comparados aos controles (Figura 15A). O tratamento com ASE isoladamente ou associado ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) o aumento dos níveis séricos de insulina nos animais dos grupos DAS e DAT (Figura 15A).

A resistência à insulina determinada pelo índice de HOMA foi observada ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos DS e DT quando comparados aos controles (Figura 15B). O tratamento com ASE isoladamente e associado à atividade física reduziu ( $p < 0,05$ ) a resistência à insulina nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparado aos animais DS e DT (Figura 15B). A atividade física isoladamente também reduziu ( $p < 0,05$ ), de forma menos expressiva que os demais tratamentos, este índice nos animais do grupo DT quando comparados ao grupo DS (Figura 15B). A administração do ASE (4 semanas) apresentou efeito mais potente do que o treino sobre a redução da resistência à insulina (Figura 15B).

A funcionalidade das células beta-pancreáticas foi inferida através do índice HOMA-B. O índice HOMA-B foi menor ( $p < 0,05$ ) nos animais DS quando comparados aos controles (Figura 15C). O tratamento com ASE isoladamente ou associado ao exercício físico promoveu a recuperação ( $p < 0,05$ ) da funcionalidade das células beta-pancreáticas nos animais dos grupos DAS e DAT, quando comparados ao grupo DS (Figura 15C). A atividade física isoladamente também recuperou ( $p < 0,05$ ) este índice nos animais do grupo DT quando comparados ao grupo DS (Figura 15C).



Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis séricos de insulina, a resistência à insulina e a funcionalidade das células beta-pancreáticas



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis séricos de insulina (A), índice de HOMA (B) e funcionalidade das células beta-pancreáticas (HOMA-BETA) (C).

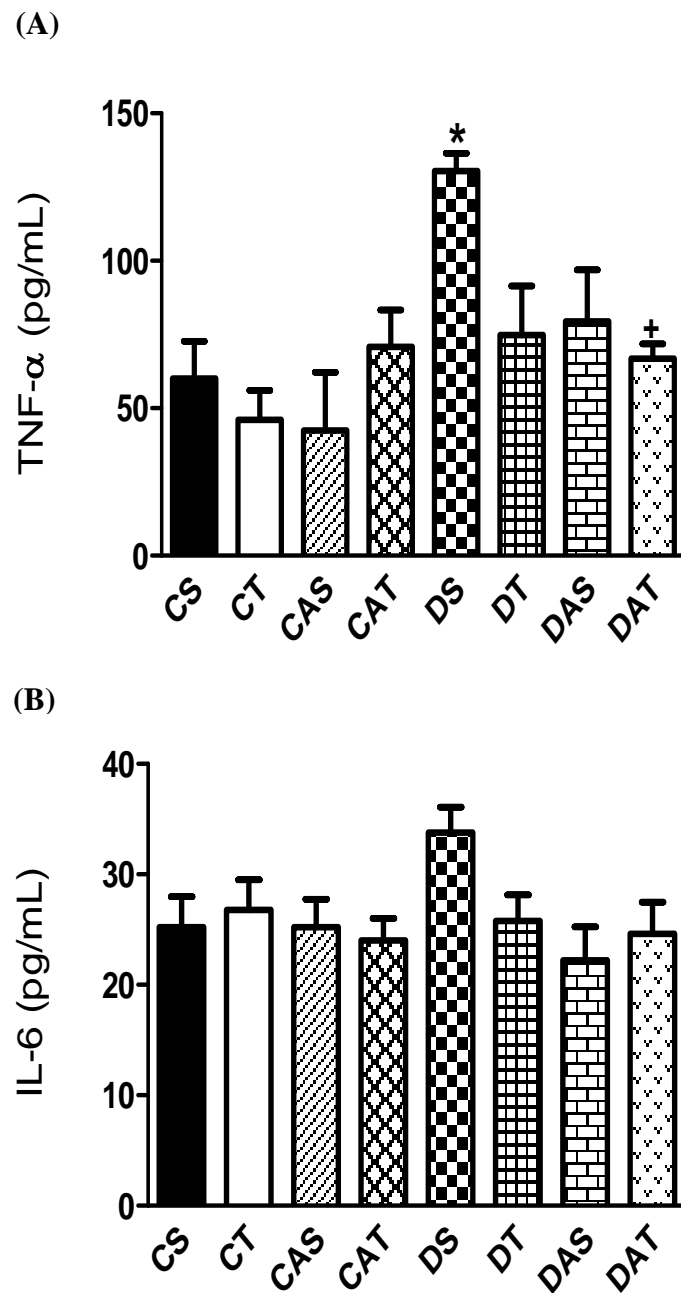
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. \* $p<0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p<0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p<0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni. Letra (B) # $p<0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo Teste-t.

#### 4.5 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil pró-inflamatório

Os níveis séricos da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos CS, CT e CAS (Figura 16A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente não alteraram significativamente os níveis séricos dessa citocina nos grupos diabéticos (Figura 16A). A administração do ASE associada à atividade física reduziu ( $p < 0,05$ ) os níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos animais do grupo DAT, quando comparados ao grupo DS (Figura 16A).

Os níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-6 não foram diferentes entre os grupos estudados (Figura 16B).

Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis séricos de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=6 ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CS, CT, CAS; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tuckey e Bonferroni.

#### 4.6 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina e de adipocinas no tecido adiposo epididimal

A proteína  $\alpha$ -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras. Os níveis proteicos de  $\alpha$ -actina não diferiram entre os grupos controles e diabéticos com e sem tratamentos (dados não mostrados).

Foi observado maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo proteico do IR nos grupos DT, DAS e DAT quando comparados a todos os grupos controles, assim como, no grupo DS quando comparado ao grupo CAS (Figura 17A). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico não alterou significativamente esses níveis proteicos nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 17A). O grupo DT apresentou valores superiores ( $p < 0,05$ ) de expressão de IR quando comparado a todos os outros grupos diabéticos (Figura 17A), que foram reduzidos pelo tratamento com ASE.

Os níveis proteicos de pIRS-1 foram menores ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado ao grupo CS (Figura 17B). O tratamento com ASE aumentou ( $p < 0,05$ ) o conteúdo dessa proteína no grupo DAS quando comparado ao grupo DS (Figura 17B). O exercício físico isoladamente e a sua associação ao tratamento com ASE não alteraram significativamente a expressão dessa proteína (Figura 17B).

A expressão da proteína AKT não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 17C). No entanto, o conteúdo proteico de sua forma fosforilada, pAKT, foi reduzido ( $p < 0,05$ ) nos grupos diabéticos quando comparados aos controles (Figura 17D). O tratamento com ASE e a atividade física isoladamente ou associados não alteraram significativamente a expressão da pAKT (Figura 17D) nos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS.

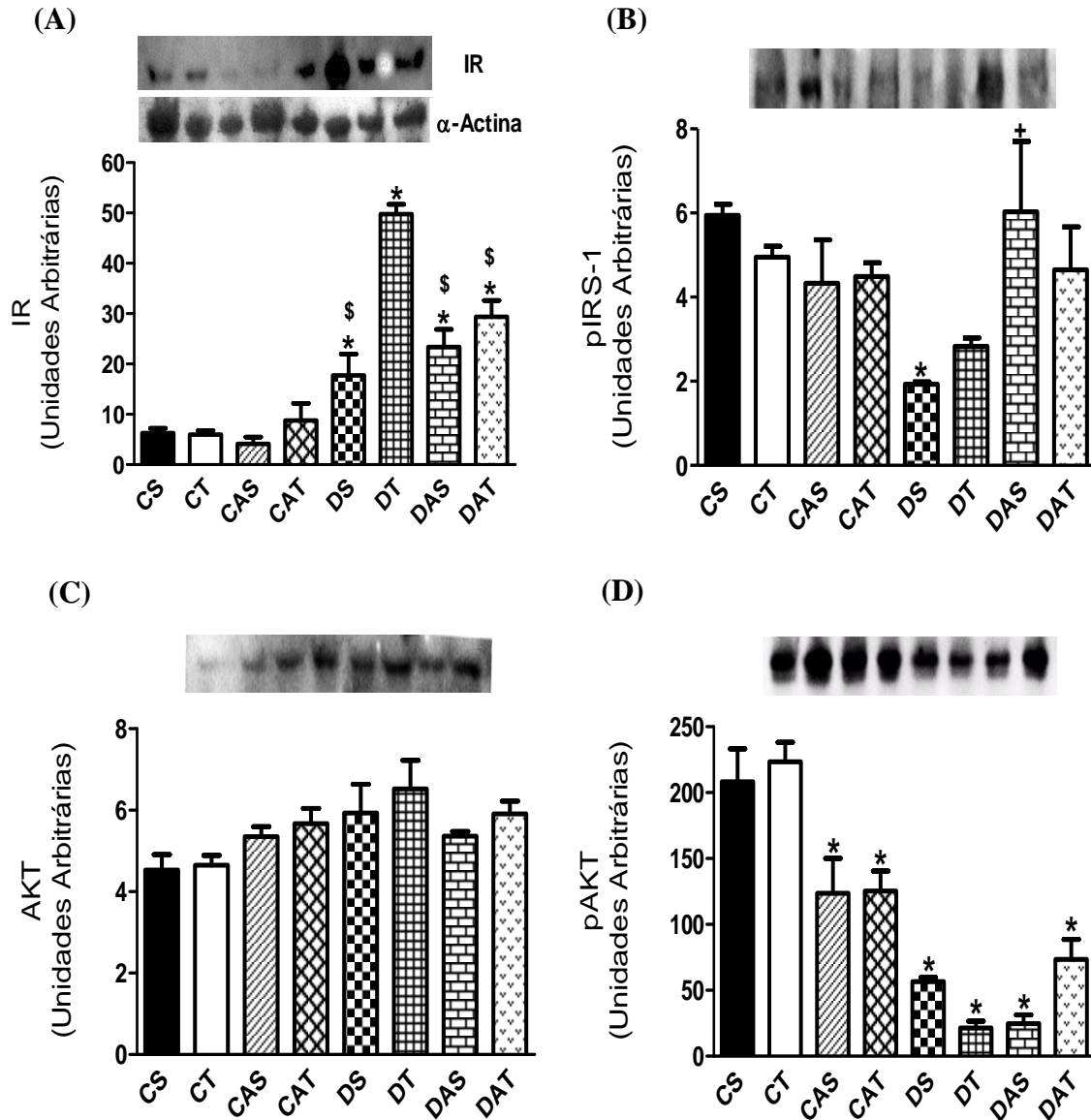
Todos os grupos diabéticos apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) conteúdo proteico de GLUT-4 quando comparados aos grupos controles (Figura 17E). O tratamento com ASE aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão do GLUT-4 nos animais do grupo DAS quando comparados ao grupo DS (Figura 17E). O exercício físico isoladamente não alterou significativamente a expressão dessa proteína (Figura 16E) no grupo DT quando comparado ao grupo DS. Entretanto, quando associados promoveram o aumento ( $p < 0,05$ ) do conteúdo de GLUT-4 no grupo DAT quando comparado aos animais dos grupos DS e DT (Figura 17E).

A expressão da proteína pJNK foi aumentada ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado aos controles (Figura 17F). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) o conteúdo dessa proteína nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 17F). O treinamento físico isoladamente não alterou significativamente a expressão da pJNK nos animais diabéticos (Figura 17F).

Os níveis proteicos da proteína adiponectina foram menores ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado ao CS e no grupo DT quando comparado aos grupos CS e CT (Figura 17G). O tratamento com ASE e a atividade física isoladamente não modificaram significativamente a expressão dessa proteína (Figura 17G). No entanto, a associação de ambos promoveu o aumento ( $p < 0,05$ ) da expressão da adiponectina no grupo DAT quando comparado aos grupos DS, DT e DAS (Figura 17G). Em adição, a expressão dessa adipocina no grupo DAT foi significativamente maior que a encontrada nos animais dos grupos controles CAS e CAT (Figura 17G).

A expressão da proteína leptina não foi alterada entre os diferentes grupos estudados (Figura 17H).

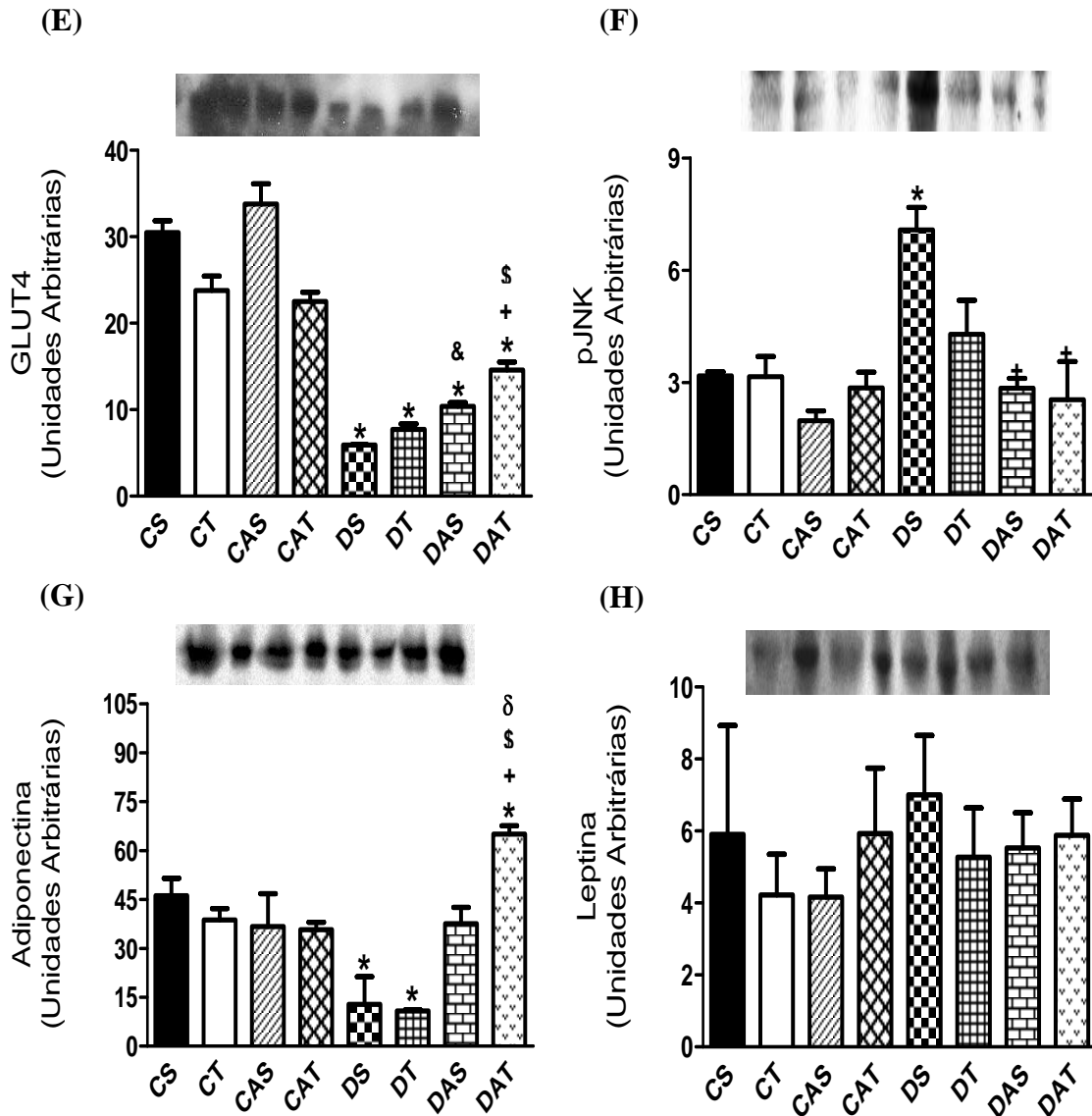
Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão proteica das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal (TAE)



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos de IR (A), pIRS-1 (B), AKT (C) e pAKT (D).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=3$  ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) para o grupo DS \* $p<0,05$  em relação ao grupo CAS, na letra (B) para o grupo DS \* $p<0,05$  em relação ao grupo CS e na letra (D) para os grupos CAS, CAT, DS e DAT \* $p<0,05$  em relação aos grupos CS e CT. Para os demais: \* $p<0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p<0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p<0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão proteica das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal (TAE)



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos Do GLUT-4 (E), pJNK (F), adiponectina (G) e leptina (H).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (G) para o grupo DS \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CS; para o grupo DT \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CS e CT; para o grupo DAT \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CAS e CAT. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; †  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; ‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo DT; §  $p < 0,05$  em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni. &  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo Teste-t.

#### 4.7 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético

A proteína  $\beta$ -tubulina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras. Os níveis proteicos de  $\beta$ -tubulina não diferiram entre os grupos controles e diabéticos com e sem tratamento (dados não mostrados).

Os níveis proteicos de IR não foram significativamente alterados nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 18A). O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente o conteúdo dessa proteína (Figura 18A). O exercício físico isoladamente aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão do IR no grupo DT quando comparado aos animais do grupo DS (Figura 18A). O tratamento com ASE associado ao exercício físico ocasionou o aumento da expressão ( $p < 0,05$ ) desse receptor nos animais do grupo DAT quando comparados a todos os grupos controles e aos grupos diabéticos DS e DAS (Figura 18A).

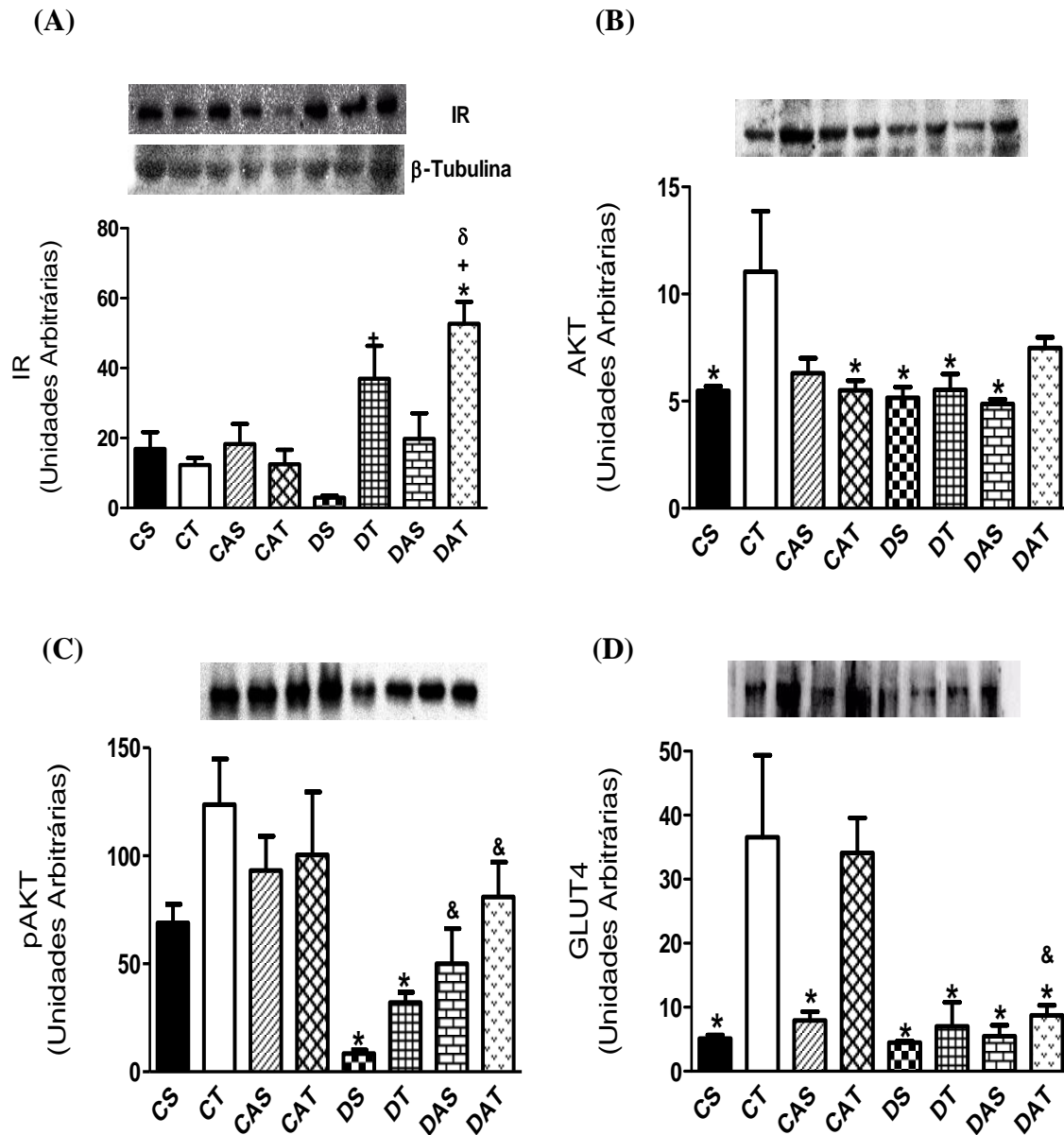
A proteína AKT foi mais expressa ( $p < 0,05$ ) nos animais CT quando comparados aos grupos controles CS e CAT, assim como, aos grupos diabéticos DS, DT e DAS (Figura 18B). Os tratamentos realizados não alteraram significativamente a expressão dessa proteína nos animais diabéticos quando comparados ao grupo DS (Figura 18B).

O conteúdo proteico da pAKT foi menor ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado aos grupos CT, CAS e CAT, assim como, no grupo DT quando comparado ao grupo CT (Figura 18C). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou a expressão dessa proteína nos animais diabéticos dos grupos DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 18C). A atividade física isoladamente não alterou significativamente o conteúdo proteico da pAKT.

Todos os grupos diabéticos apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) conteúdo proteico de GLUT-4 quando comparados aos grupos controles CT e CAT (Figura 18D). Os grupos controles CS e CAS também apresentaram níveis reduzidos de expressão desse transportador quando comparados aos animais do grupo CT e CAT (Figura 18D). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente não alteraram significativamente o conteúdo proteico do GLUT-4 (Figura 18D). Entretanto, a administração do ASE associada à atividade física aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão desse transportador nos animais do grupo DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 18D).



Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão proteica da cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético



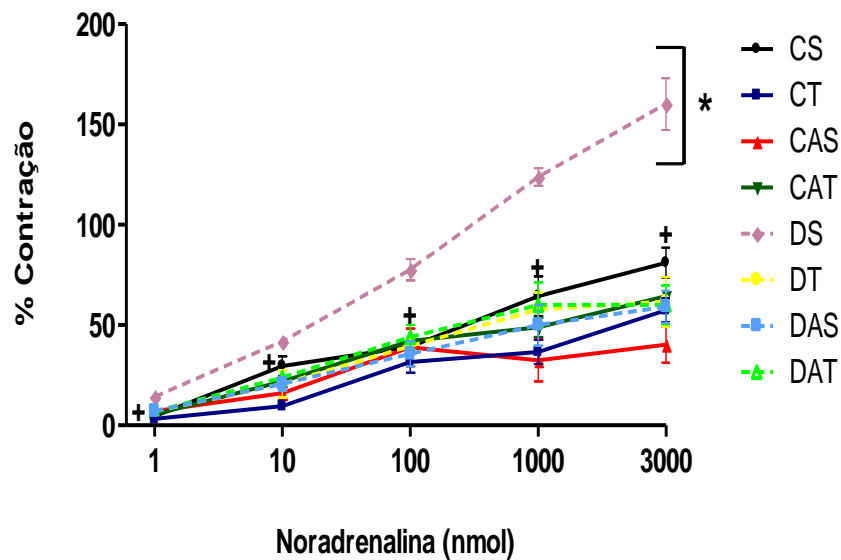
Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos de IR (A), AKT (B), pAKT (C) e GLUT-4 (D).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 a 4 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (B) para todos os grupos \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CT; letra (C) para o grupo DS \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CT, CAS e CAT; e na letra (D) para todos os grupos \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CT e CAT. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p < 0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni. & $p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo Teste-t.

#### 4.8 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da noradrenalina em LAM

A noradrenalina produziu uma resposta vasoconstritora dose-dependente que foi maior ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais do grupo DS, quando comparados aos grupos controles em todas as doses (Figura 19). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados reduziram ( $p < 0,05$ ) a resposta vasoconstritora da noradrenalina nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS. (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da noradrenalina em leito arterial mesentérico



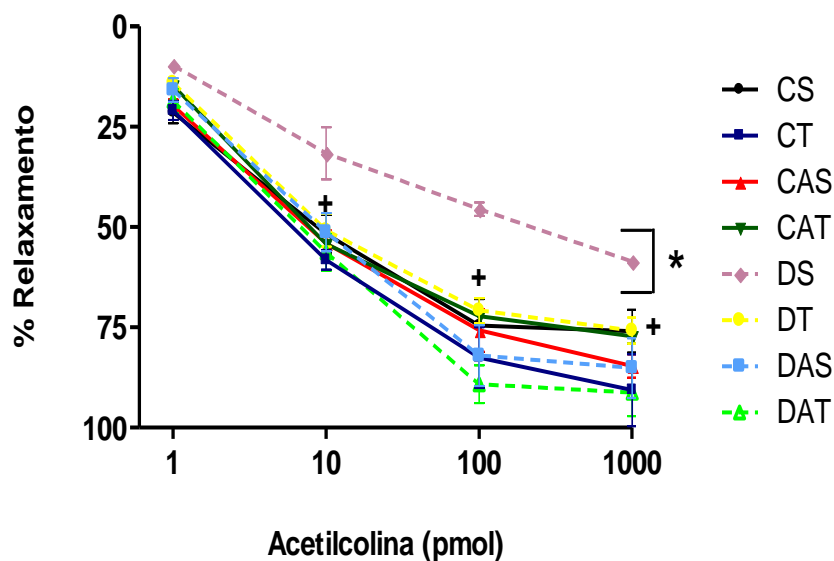
Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. Exceções: segunda dose  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CT, CAS e CAT. Para os demais:  $*p < 0,05$  em relação aos grupos controles;  $+ p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.9 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM

A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi menor ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais do grupo DS, quando comparados aos controles (Figura 20). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) a resposta vasodilatadora da ACh nos animais diabéticos dos grupos DAS e DAT, a partir da dose de 10 pmol, quando comparados aos animais do grupo DS (Figura 20). A atividade física isoladamente não alterou significativamente a resposta vasodilatadora nos animais diabéticos.

Figura 20 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico



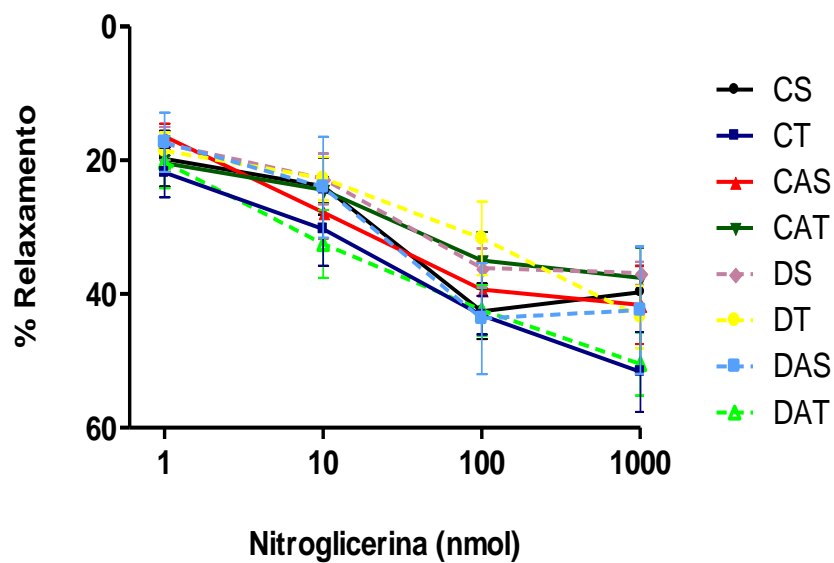
Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. Exceções: dose de 1:  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CS, CT e CAS, dose de 10  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CT, CAS e CAT; e na dose de 1000  $*p < 0,05$  em relação ao grupo CT. Para os demais  $*p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS para os grupos DAS e DAT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.10 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM

Não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos animais dos diferentes grupos estudados (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=6 ratos wistar machos por grupo.  $p < 0,05$  conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.11 Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre os ensaios pró-oxidantes

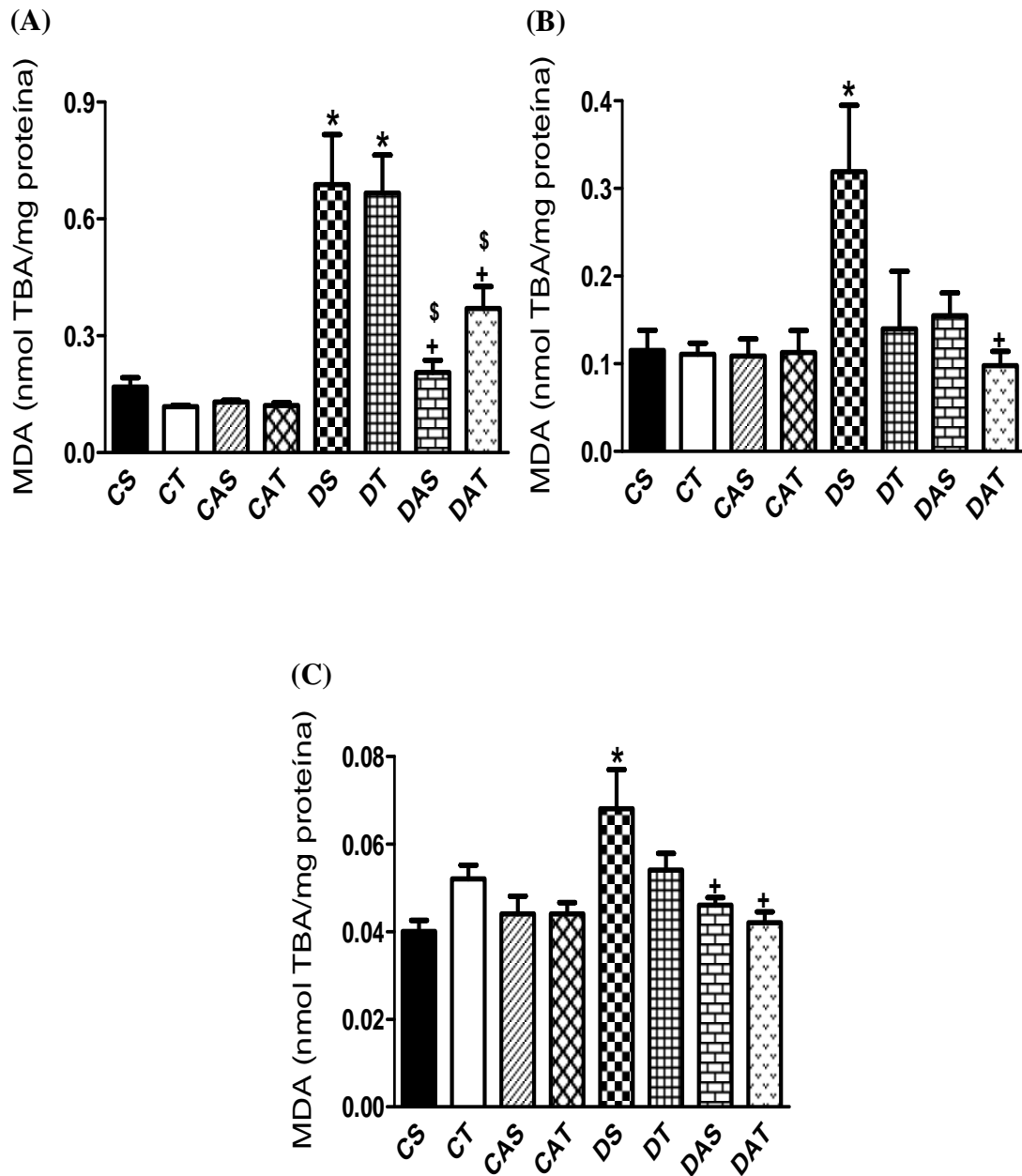
##### 4.11.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi observado um aumento ( $p < 0,05$ ) na formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica em amostras de plasma dos animais dos grupos DS e DT, quando comparados aos animais controles (Figura 22A). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis plasmáticos de MDA nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados aos grupos DS e DT (Figura 22A).

Os níveis de MDA em amostras de TAE foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos controles (Figura 22B). O tratamento com ASE associado à atividade física reduziu ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais do grupo DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 22B). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente não alteraram significativamente a peroxidação lipídica nos animais diabéticos.

Também foi observado um aumento ( $p < 0,05$ ) da peroxidação lipídica em amostras de tecido hepático dos animais do grupo DS quando comparados aos grupos CS, CAS e CAT (Figura 22C). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico diminuiu os níveis de MDA nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados aos animais DS (Figura 22C). O exercício físico isoladamente não alterou significativamente a peroxidação lipídica nos animais diabéticos.

Figura 22 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de TBARS



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceção: letra (C) para o grupo DS \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CS, CAS e CAT. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p < 0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

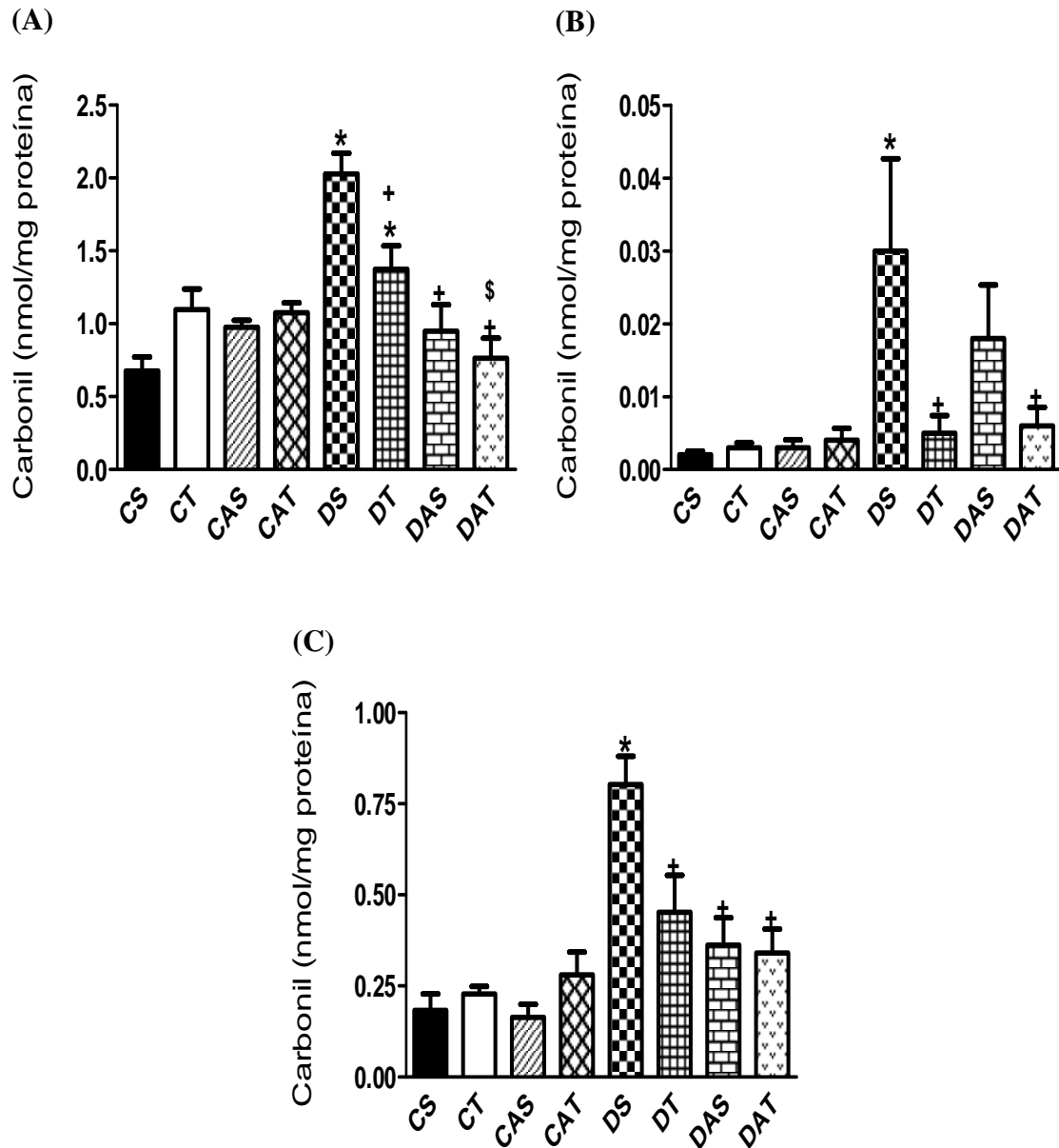
#### 4.11.2 Carbonilação de proteínas

Foi observado um aumento ( $p < 0,05$ ) na carbonilação de proteínas em amostras de plasma dos animais do grupo DS quando comparados a todos os grupos controles e do grupo DT quando comparado ao grupo CS (Figura 23A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados reduziram ( $p < 0,05$ ) a carbonilação de proteínas nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 23A). O exercício físico isoladamente também reduziu ( $p < 0,05$ ) a oxidação de proteínas nos animais do grupo DT quando comparados ao grupo DS. Entretanto, o tratamento com ASE associado à atividade física diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis de carbonilação de proteínas mais consistentemente do que a atividade física isoladamente (Figura 23B).

Os níveis de oxidação de proteínas foram aumentados ( $p < 0,05$ ) em amostras de TAE dos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 23B). A atividade física isoladamente e associada ao tratamento com ASE reduziu ( $p < 0,05$ ) a carbonilação de proteínas nos animais dos grupos DT e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 23B). O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente a carbonilação de proteínas nos animais diabéticos.

A carbonilação de proteínas também foi aumentada ( $p < 0,05$ ) em amostras de tecido hepático nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 23C). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados diminuíram ( $p < 0,05$ ), os danos oxidativos ocasionados às proteínas neste modelo, nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 23C).

Figura 23 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de carbonilação de proteínas



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceção: na letra (A) para o grupo DT \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CS. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; \$  $p < 0,05$  em relação ao grupo DT. Obs: na carbonilação do plasma \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CT para o grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tuckey e Bonferroni.



## 4.12 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as enzimas antioxidantes

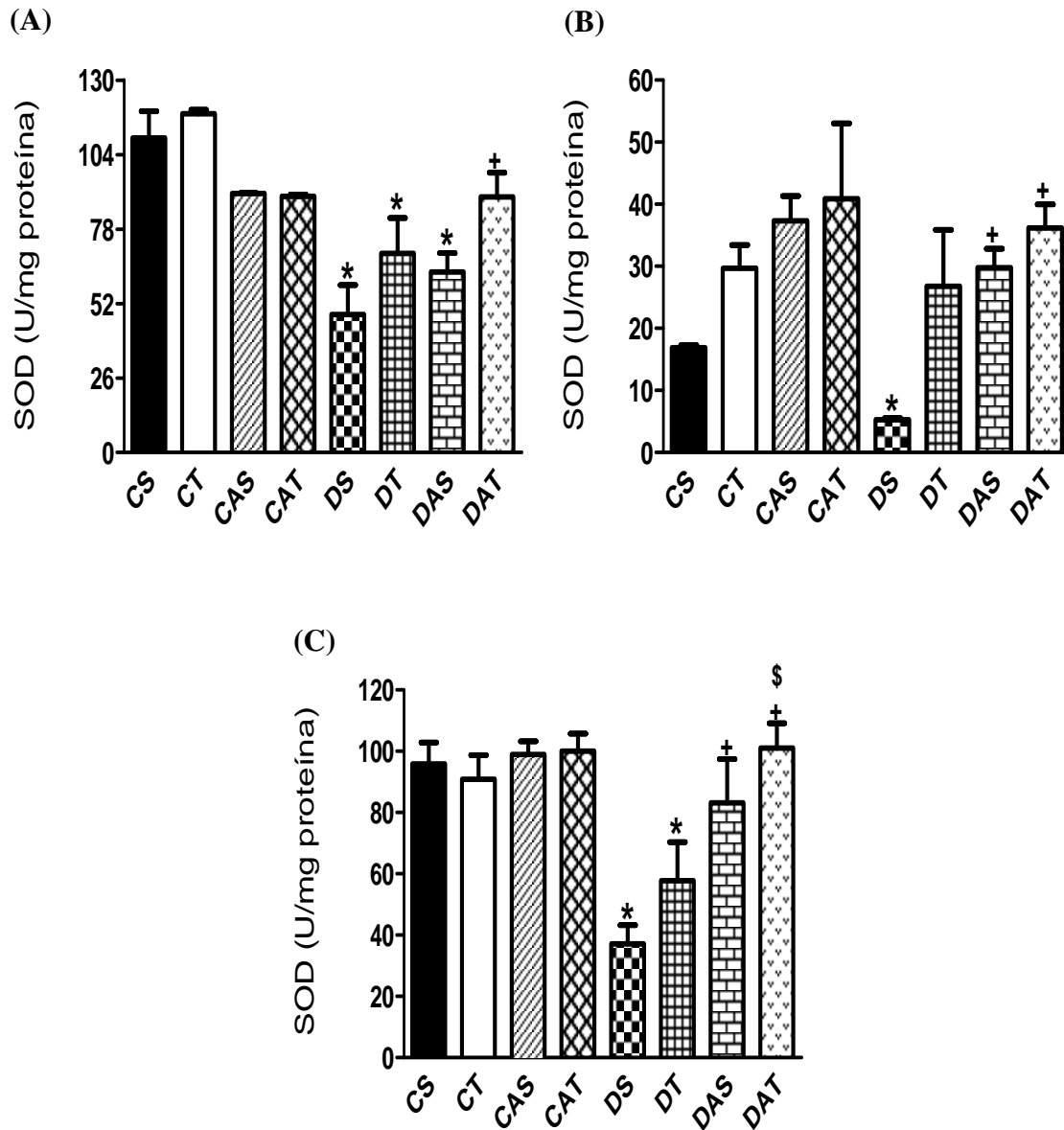
### 4.12.1 Superóxido desmutase

A atividade da enzima SOD foi menor ( $p < 0,05$ ) em amostras de plasma nos animais dos grupos DS quando comparados aos grupos controles, assim como, nos grupos DT e DAS quando comparados aos grupos CS e CT (Figura 24A). O tratamento com ASE associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) a atividade desta enzima nos animais do grupo DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 24A). Observamos também que o tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente não alteraram significativamente a atividade da SOD em amostras de plasma nos animais diabéticos (Figura 24A).

Foi encontrada uma menor ( $p < 0,05$ ) atividade da SOD em amostras de TAE nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos controles CAS e CAT (Figura 24B). O tratamento com ASE isoladamente e associado à atividade física promoveu o aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade desta enzima nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 24B). O exercício físico isoladamente não alterou significativamente a atividade da SOD em amostras de TAE nos animais diabéticos (Figura 24B).

A atividade da SOD também foi reduzida ( $p < 0,05$ ) em amostras de tecido hepático nos animais do grupo DS quando comparados a todos os grupos controles, assim como, do grupo DT quando comparado aos grupos CAS e CAT (Figura 24C). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou a atividade da SOD nos animais do grupo DAS quando comparados aos animais DS e do grupo DAT quando comparados aos animais DS e DT (Figura 24C). O exercício físico isoladamente não alterou significativamente a atividade da SOD em amostras de tecido hepático nos animais diabéticos (Figura 24C).

Figura 24 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima SOD



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) no grupo DT e DAS \*p<0,05 em relação aos grupos CS e CT; letra (B) no grupo DS \*p<0,05 em relação aos grupos CAS e CAT; e na letra (C) no grupo DT \*p<0,05 em relação aos grupos CAS e CAT. Para os demais: \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS; \$ p<0,05 em relação ao grupo DT; δ p<0,05 em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tuckey e Bonferroni.

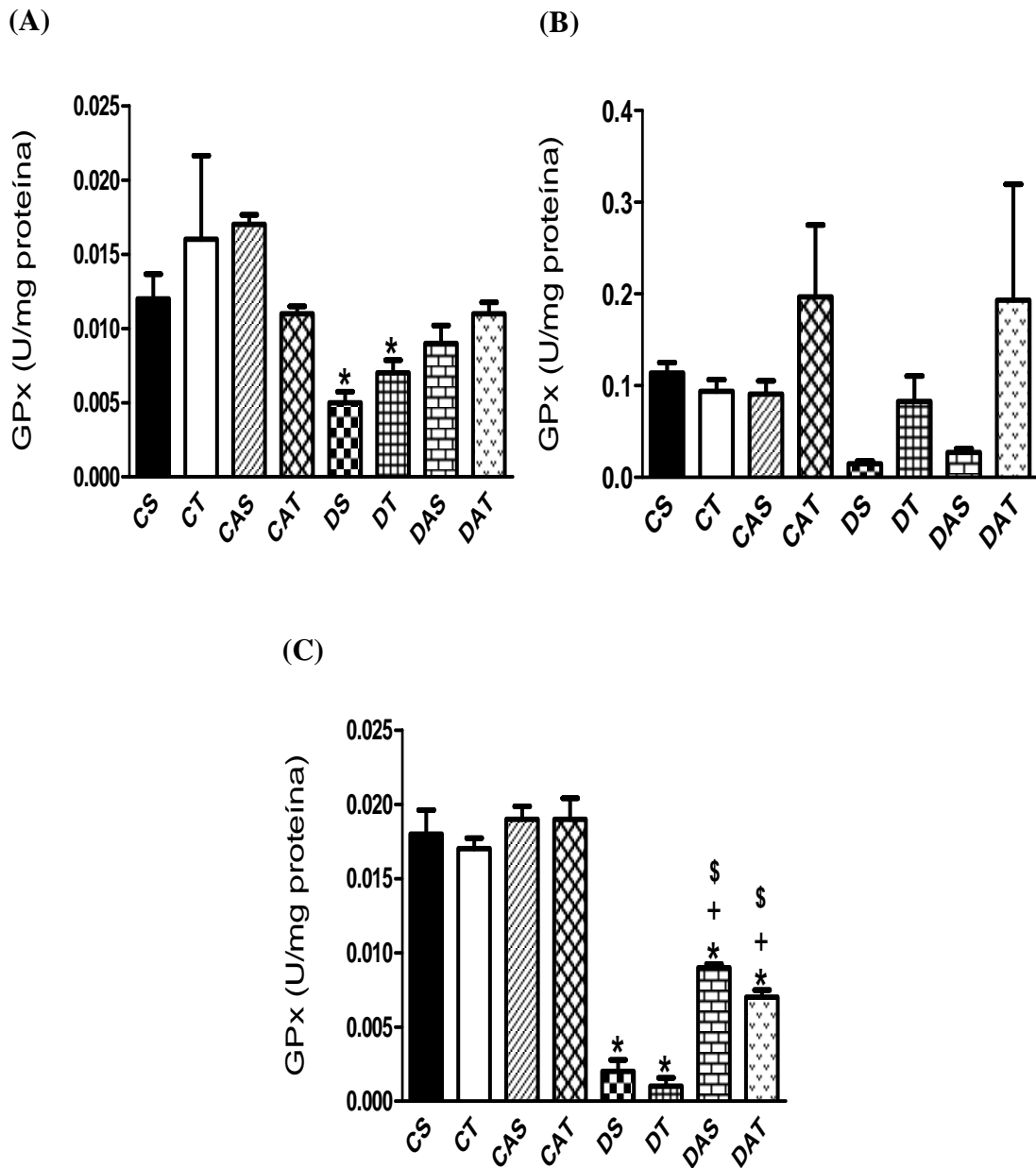
#### 4.12.2 Glutathiona peroxidase

A atividade da enzima GPx foi menor ( $p < 0,05$ ) em amostras de plasma nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos controles CT e CAS, assim como, no grupo DT quando comparado aos animais CAS (Figura 25A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados não alteraram a atividade desta enzima nestas amostras (Figura 25A).

Não encontramos diferenças na atividade da enzima GPx em amostras de TAE nos diferentes grupos estudados (Figura 25B).

A atividade da GPx também foi reduzida ( $p < 0,05$ ) em amostras de tecido hepático nos animais diabéticos de todos os grupos estudados quando comparados aos controles (Figura 25C). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) a atividade da GPx nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados aos grupos DS e DT (Figura 25C). O exercício físico isoladamente não reverteu a diminuição da atividade desta enzima em amostras de tecido hepático (Figura 25C).

Figura 25 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima GPx.



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) no grupo DS \*p<0,05 em relação aos grupos CT e CAS; no grupo DT \*p<0,05 em relação ao grupo CAS. Para os demais: \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS; \$ p<0,05 em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

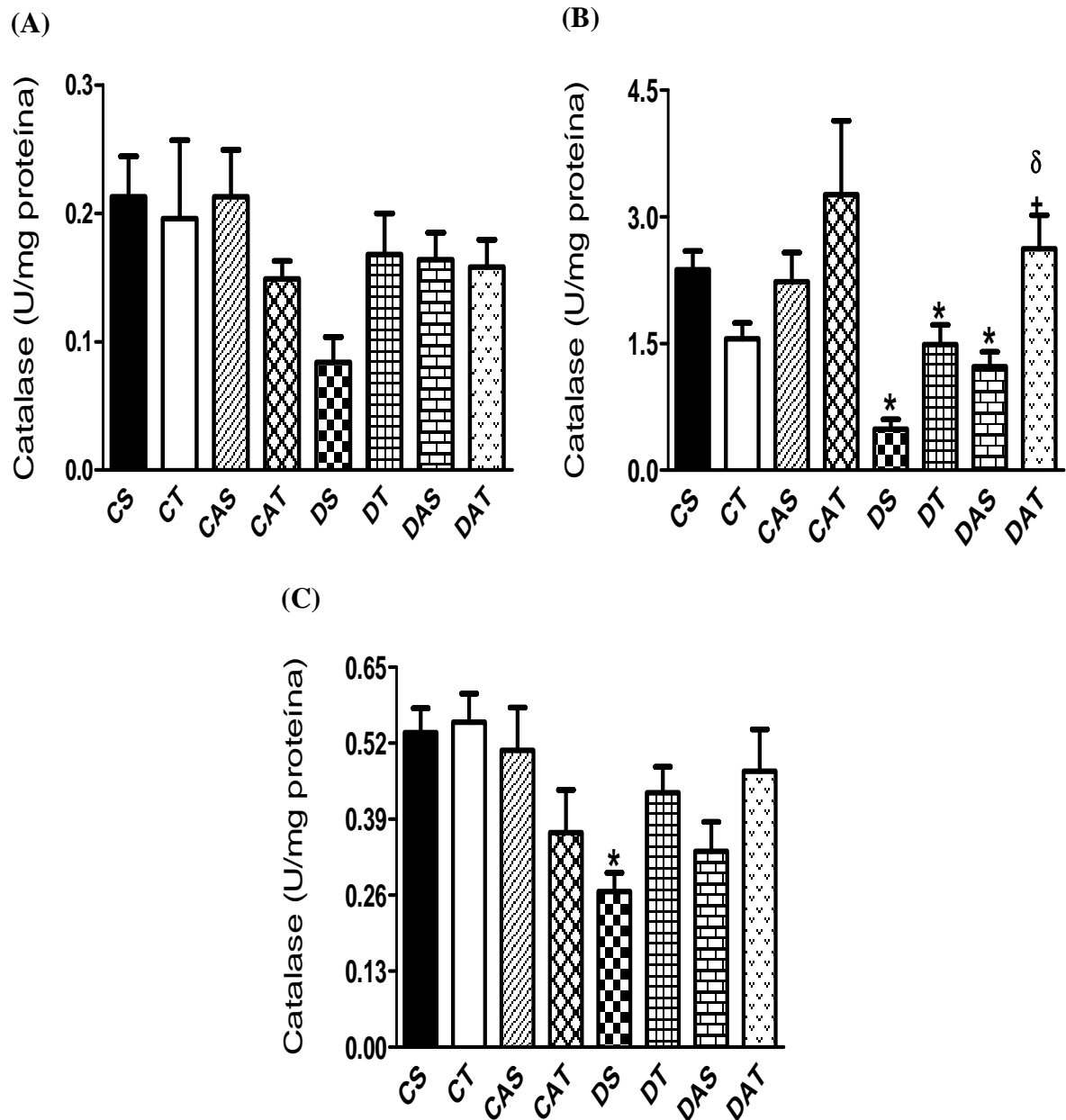
#### 4.12.3 Catalase

Não encontramos diferenças na atividade antioxidante da enzima catalase em amostras de plasma nos diferentes grupos estudados (Figura 26A).

Foi observada uma redução ( $p < 0,05$ ) na atividade antioxidante da enzima catalase em amostras de TAE nos animais diabéticos do grupo DS quando comparados aos grupos CS, CAS e CAT, assim como, nos grupos DT e DAS quando comparados aos animais CAT (Figura 26B). O tratamento com ASE associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) a atividade desta enzima nos animais do grupo DAT quando comparados aos grupos DS e DAS (Figura 26B). O tratamento com ASE e a atividade física isoladamente não alteraram significativamente a atividade da catalase nestas amostras (Figura 26B).

A atividade da catalase também foi menor ( $p < 0,05$ ) em amostras de tecido hepático nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos CS e CT (Figura 26C). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados não alteraram significativamente a atividade antioxidante desta enzima nestas amostras (Figura 26C).

Figura 26 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima catalase



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (B) no grupo DS \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CS, CAS e CAT; no grupo DT \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CAT; e na letra (C) no grupo CS \* $p < 0,05$  em relação aos grupos. Para os demais +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS;  $\delta$   $p < 0,05$  em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

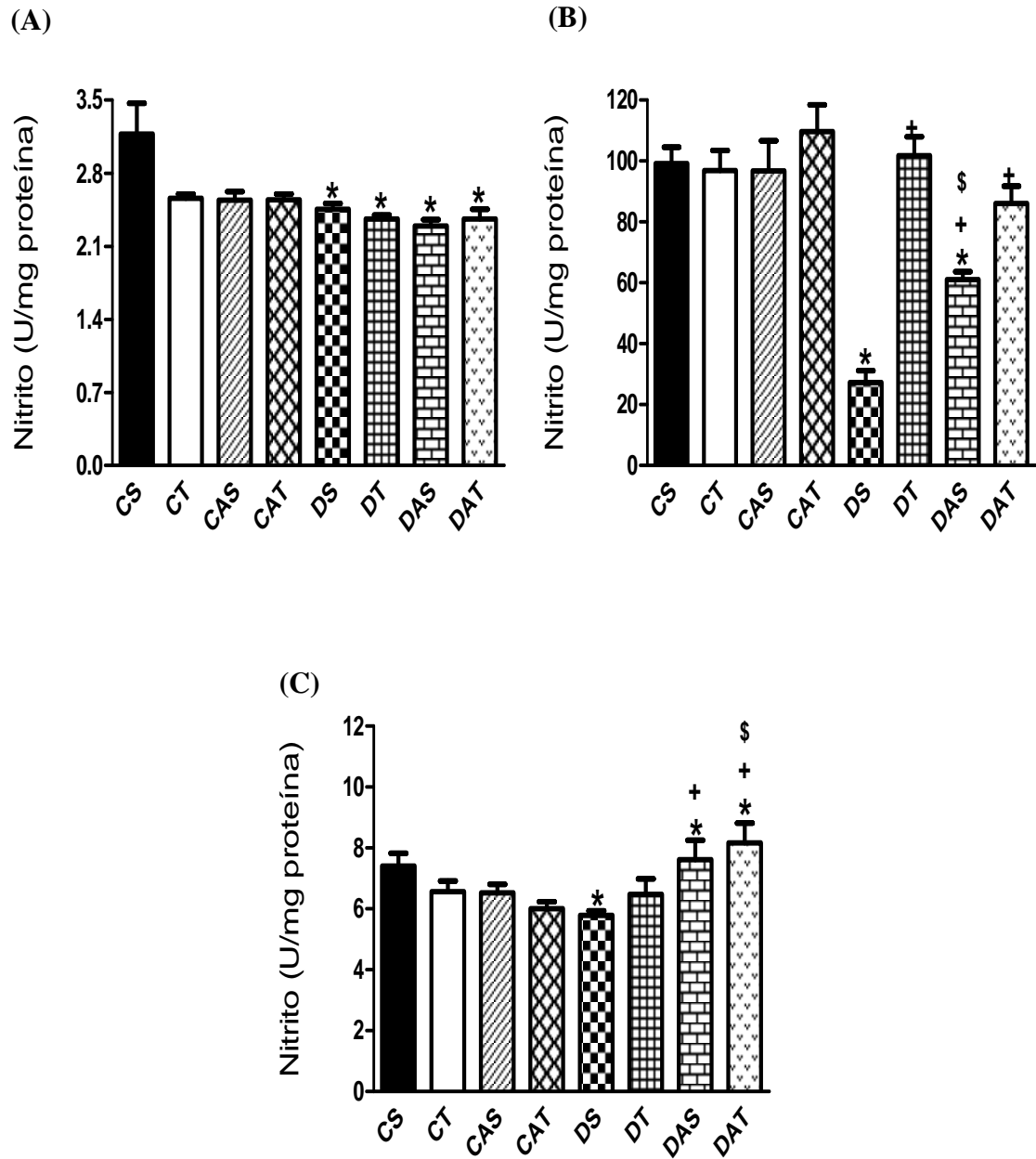
#### 4.13 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram menores ( $p < 0,05$ ) em amostras de plasma de todos os grupos de animais diabéticos quando comparados ao grupo CS (Figura 27A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados não alteraram os níveis de nitrito nestas amostras nos animais diabéticos e controles (Figura 27A).

Foi observado um menor ( $p < 0,05$ ) nível de nitrito em amostras de TAE nos animais dos grupos DS e DAS quando comparados aos controles (Figura 27B). O tratamento com ASE e a atividade física isoladamente e associados aumentaram ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados aos animais DS (Figura 27B). O exercício físico isoladamente demonstrou maiores ( $p < 0,05$ ) níveis de nitrito nos animais do grupo DT quando comparados ao tratamento com ASE nos animais do grupo DAS nestas amostras (Figura 27B).

Os níveis de nitrito também foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) em amostras de tecido hepático nos animais do grupo DS quando comparados ao grupo CS (Figura 27C). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DAS quando comparados aos animais DS e do grupo DAT quando comparados aos animais DS e DT (Figura 27C). A administração do ASE e sua associação à atividade física ocasionou a elevação ( $p < 0,05$ ) dos níveis de nitrito nos animais dos grupos DAS e DAT, sendo maiores que os níveis encontrados nos grupos controles CAT, assim como, CAS e CAT respectivamente, nestas amostras (Figura 27C).

Figura 27 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de nitrito



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Em amostras de: plasma (A), de TAE (B) e de fígado (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CS; e na letra (C) para o DS \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CS; para o DAS \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CAT; e para o DAT \* $p < 0,05$  em relação aos grupos CAS e CAT. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS; \$ $p < 0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método three-way ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.



#### 4.14 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico sérico

Os níveis séricos de triglicerídeos foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos controles, assim como, do grupo DAS quando comparado ao grupo CAT (Figura 28A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados reduziram ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 28A). O tratamento com ASE associado ao exercício físico diminuiu ( $p < 0,05$ ) drasticamente esses níveis nos animais DAT, sendo comparáveis aos dos grupos controles e foram menores ( $p < 0,05$ ) que os níveis de triglicerídeos encontrados no grupo DAS que recebeu somente o tratamento com ASE (Figura 28A).

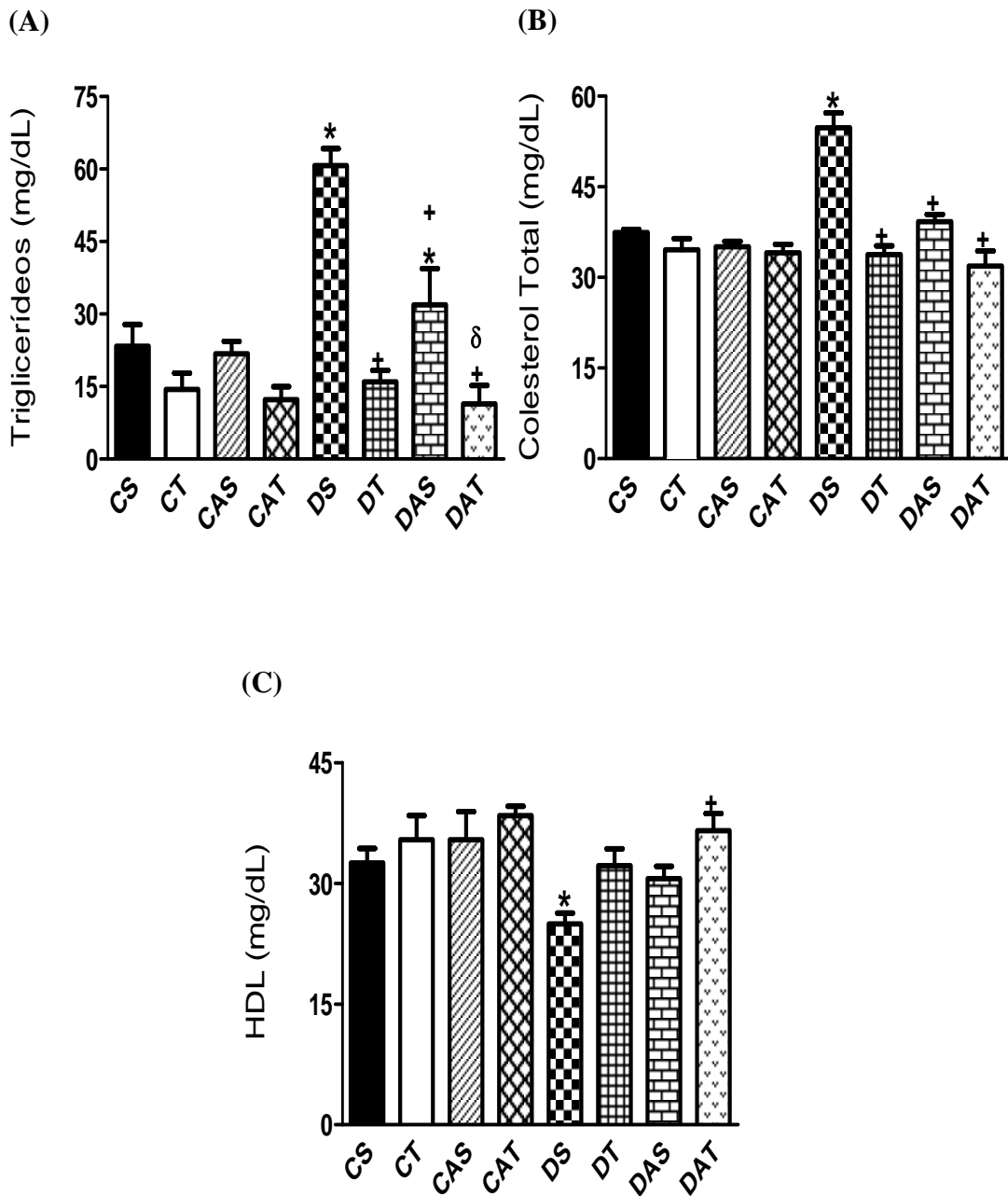
Os níveis séricos do colesterol total foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 28B). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados reduziram ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 28B).

Os níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) foram menores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos CT, CAS e CAT (Figura 28C). O tratamento com ASE associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) esses níveis no grupo DAT quando comparado ao grupo DS (Figura 28C). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente não alteraram os níveis séricos de HDL (Figura 28C).

Os níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) não foram diferentes entre os grupos estudados (Figura 28D).

Os níveis séricos da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 28A). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados reduziram ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 28A). O tratamento com ASE associado ao exercício físico diminuiu ( $p < 0,05$ ) drasticamente esses níveis nos animais DAT, sendo comparáveis aos dos grupos controles e foram menores ( $p < 0,05$ ) que os níveis de VLDL encontrados no grupo DAS que recebeu somente o tratamento com ASE (Figura 28A).

Figura 28 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico

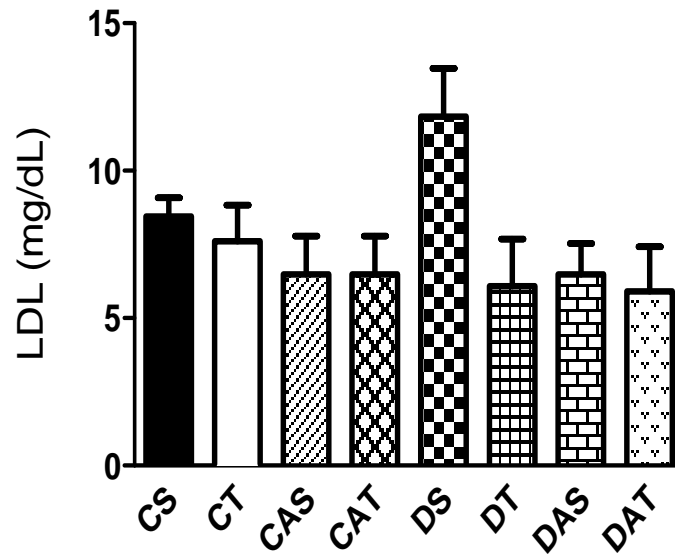


Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis séricos de triglicerídeos (A), colesterol total (B), e HDL (C).

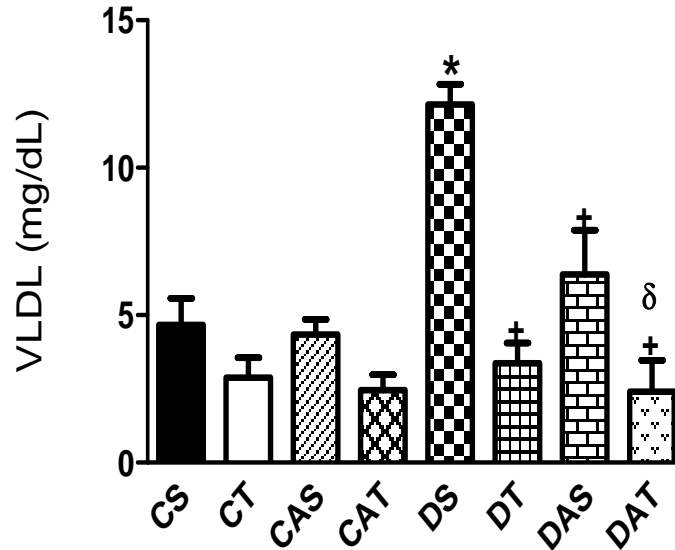
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) no grupo DAS \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CAT; e na letra (C) no grupo DS \* $p < 0,05$  em relação ao grupo CT, CAS, CAT. Para os demais: \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS;  $\delta$   $p < 0,05$  em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Figura 28 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico

(D)



(E)



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis séricos de LDL (D) e VLDL (E).

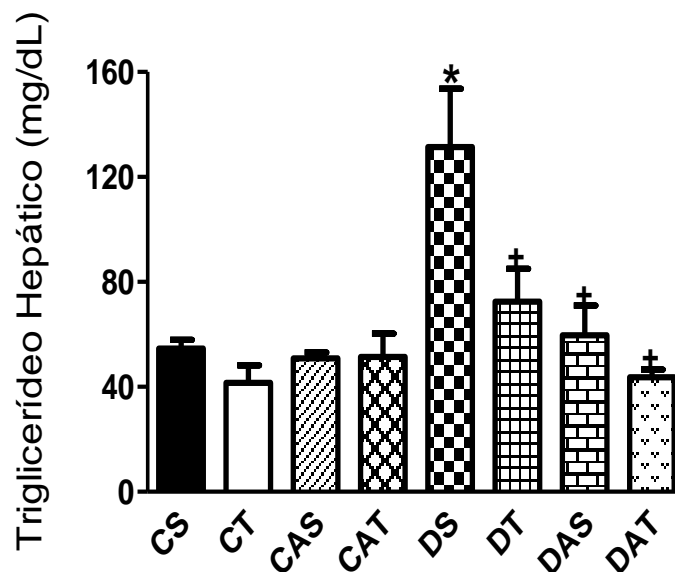
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS;  $\delta$  p<0,05 em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.15 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o perfil lipídico hepático

##### 4.15.1 Triglicerídeos hepáticos

Os níveis de triglicerídeos hepáticos foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 29). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados reduziram ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados aos animais do grupo DS (Figura 29).

Figura 29 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de triglicerídeos hepáticos



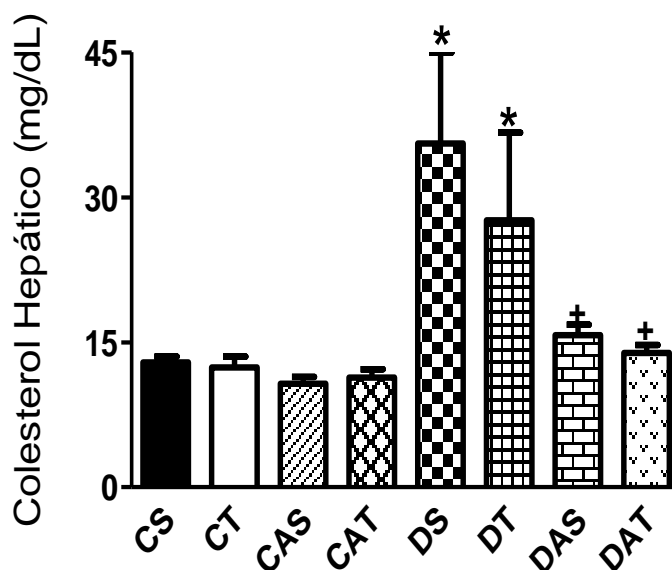
Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controles; †  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.15.2 Colesterol Hepático

Os níveis de colesterol hepáticos foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos DS quando comparados a todos os controles, assim como, no grupo DT quando comparado aos animais dos grupos CAS e CAT (Figura 30). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) esses níveis nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados aos animais DS (Figura 30). O exercício físico isoladamente não diminuiu os níveis de colesterol hepáticos nos animais diabéticos (Figura 30).

Figura 30 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de colesterol hepáticos



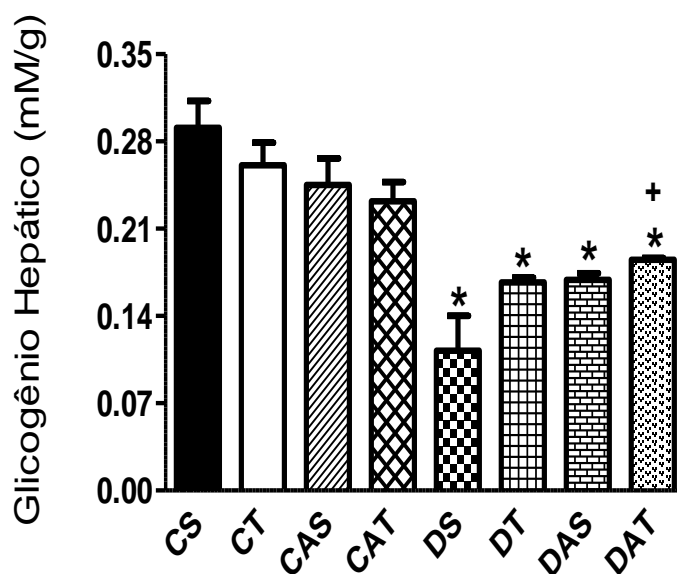
Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. Exceção: no grupo DT  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CAS e CAT. Para os demais:  $*p < 0,05$  em relação aos grupos controles;  $+ p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.16 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o conteúdo de glicogênio hepático

O conteúdo de glicogênio hepático foi menor ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos DS e DAS quando comparados a todos os controles, assim como, no grupo DT quando comparado aos animais dos grupos CS, CT e CAS e no grupo DAT quando comparado aos grupos CS e CT (Figura 31). O tratamento com ASE associado ao exercício físico aumentou ( $p < 0,05$ ) o conteúdo de glicogênio nos animais do grupo DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 31). A administração do ASE e o exercício físico separadamente não alteraram significativamente o conteúdo de glicogênio hepático nos animais diabéticos (Figura 31).

Figura 31 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o conteúdo de glicogênio hepático



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  ratos wistar machos por grupo. Exceções: no grupo DT  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CS, CT e CAS; e no grupo DAT  $*p < 0,05$  em relação aos grupos CS e CT. Para os demais:  $*p < 0,05$  em relação aos grupos controles; +  $p < 0,05$  em relação ao grupo DS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### **4.17 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e na síntese e excreção de colesterol no fígado**

A proteína  $\beta$ -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras. Os níveis proteicos de  $\beta$ -actina não diferiram entre os grupos controles e diabéticos com e sem tratamento (dados não mostrados).

Os níveis proteicos da MTP foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparado aos grupos CS e CAS, bem como, no grupo DT quando comparado a todos os grupos controles (Figura 32A). O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente a expressão dessa proteína nos animais diabéticos (Figura 32A). O tratamento com ASE associado ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) drasticamente a expressão da MTP nos animais do grupo DAT quando comparados aos grupos DS e DT (Figura 32A).

Foi observado maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo proteico de AMPK nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 32B). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados reduziram ( $p < 0,05$ ) a expressão dessa proteína nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 32B).

A expressão da proteína pAMPK foi menor ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados aos grupos CT, CAS e CAT (Figura 32C). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados aumentaram ( $p < 0,05$ ) o conteúdo dessa proteína nos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 32C).

Os níveis proteicos da pACC não foram significativamente alterados nos animais do grupo DS quando comparados aos controles (Figura 32D). O tratamento com ASE isoladamente aumentou ( $p < 0,05$ ) o conteúdo dessa proteína no grupo DAS quando comparado ao grupo DS (Figura 32D). O exercício físico isoladamente e sua associação ao tratamento com ASE não alterou a expressão dessa proteína (Figura 32D).

Foi observado maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo proteico da FAS nos animais do grupo DS quando comparado aos grupos CS, CT e CAS, assim como, nos grupos DT e DAS quando comparados a todos os grupos controles (Figura 32E). O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente a expressão dessa proteína (Figura 32E). O tratamento com

ASE associado à atividade física reduziu ( $p < 0,05$ ) a expressão da FAS nos animais do grupo DAT quando comparados aos grupos DT e DAS (Figura 32E).

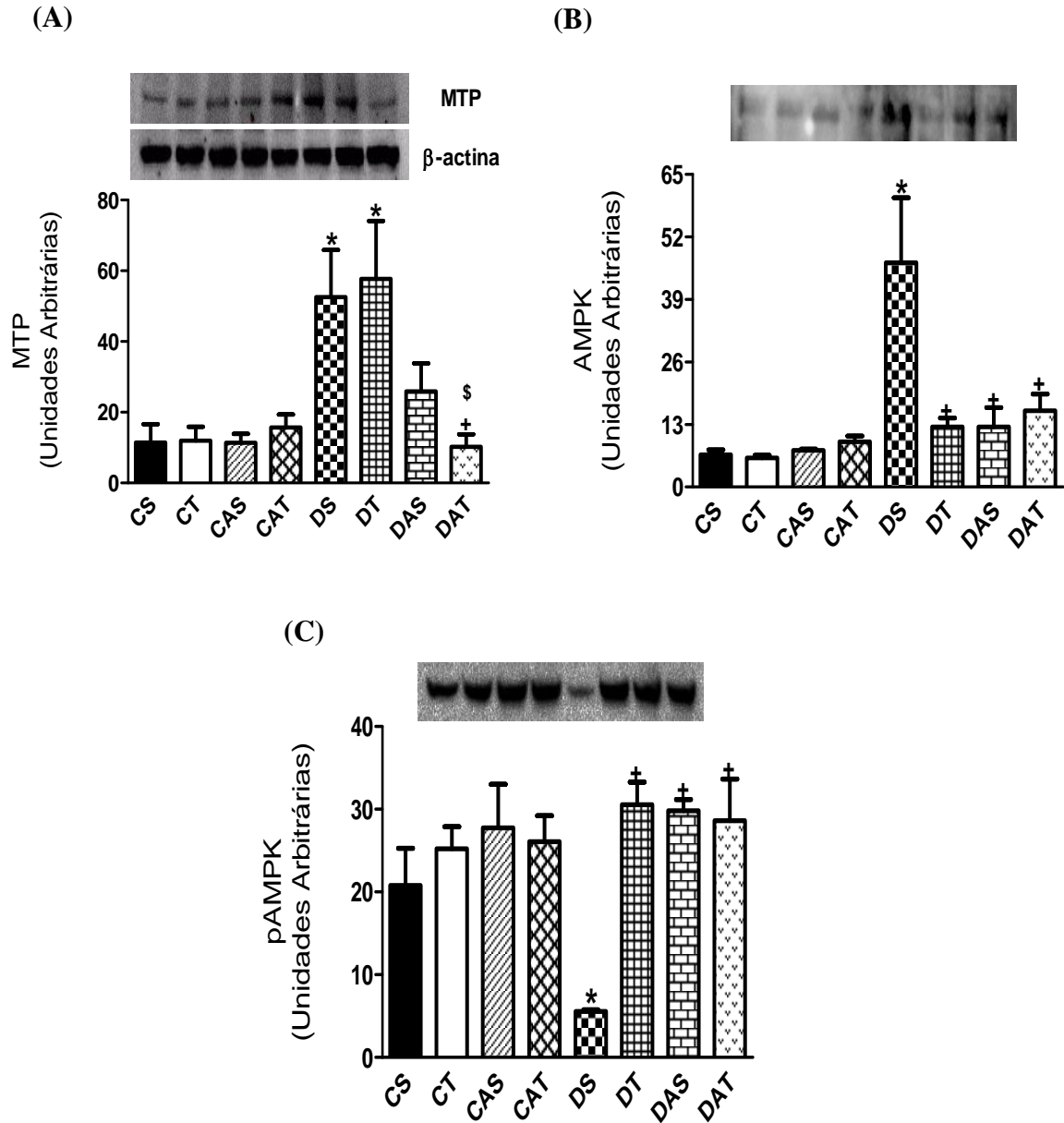
A expressão da proteína SREBP-1c foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado aos controles (Figura 32F). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico, assim como, o exercício físico isoladamente, reduziram ( $p < 0,05$ ) o conteúdo dessa proteína nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 32F).

O conteúdo proteico da HMG CoA-R foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos DS e DT quando comparados aos controles (Figura 32G). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) a expressão dessa proteína nos animais dos grupos DAS e DAT quando comparados aos grupos DS e DT (Figura 32G).

A expressão do transportador ABCG5 não foi alterada nos diferentes grupos estudados (Figura 32H). No entanto, o conteúdo proteico do ABCG8 foi menor ( $p < 0,05$ ) no grupo DS quando comparado a todos os controles e no grupo DT quando comparado aos grupos CS e CT (Figura 32I). O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente a expressão do ABCG8 nos animais diabéticos (Figura 32I). O tratamento com ASE associado à atividade física aumentou a expressão do ABCG8 nos animais do grupo DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 32I). O exercício físico isoladamente não alterou significativamente o conteúdo proteico desse transportador no grupo DT quando comparado ao grupo DS (Figura 32I).



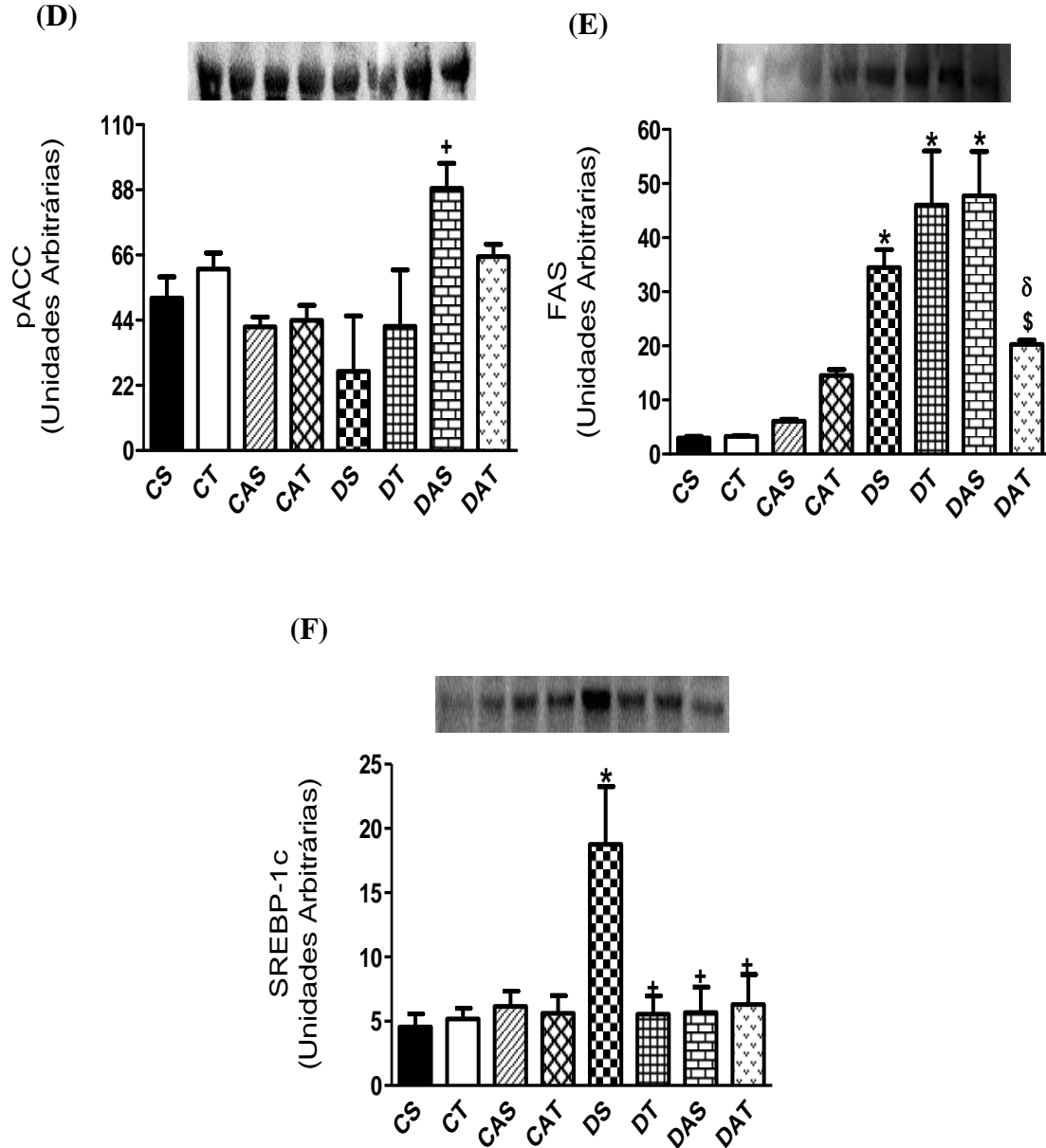
Figura 32 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e de colesterol em homogenato de tecido hepático



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos de MTP (A), AMPK (B) e pAMPK (C).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=3$  a 5 ratos wistar machos por grupo. Exceções: letra (A) no grupo DS \* $p<0,05$  em relação aos grupos CS e CAS; e na letra (C) no grupo DS  $p<0,05$  em relação aos grupos CS, CAS e CAT. Para os demais: + $p<0,05$  em relação aos grupos controles; \* $p<0,05$  em relação ao grupo DS; \$ $p<0,05$  em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

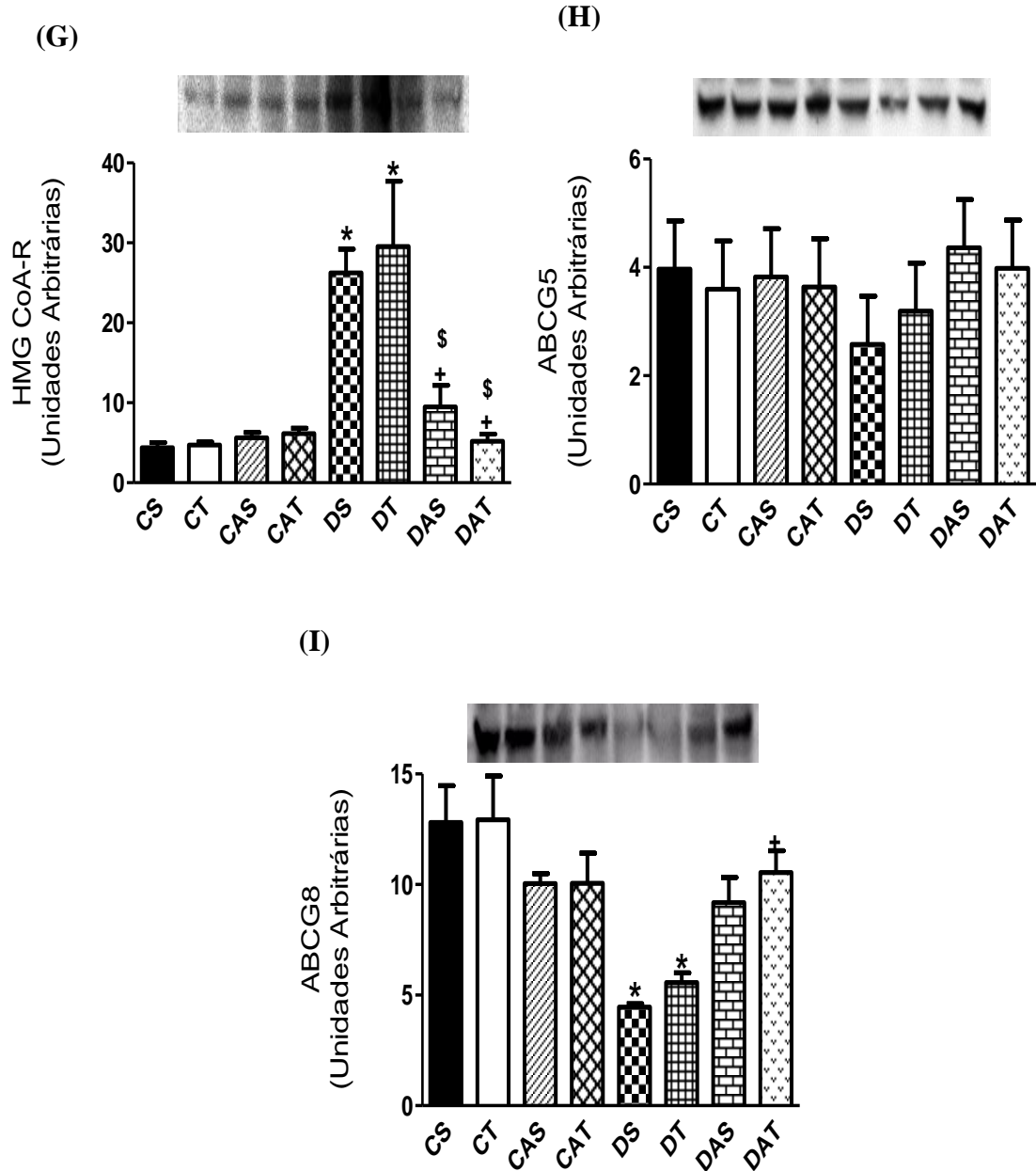
Figura 32 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e de colesterol em homogenato de tecido hepático



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos de pACC (D), FAS (E) e SREBP-1c (F).

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 a 5 ratos wistar machos por grupo. Exceção: letra (E) no grupo DS \*p<0,05 em relação aos grupos CS, CT e CAS. Para os demais \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS; \$p<0,05 em relação ao grupo DT;  $\delta$  p<0,05 em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Figura 32 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão das principais proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e de colesterol em homogenato de tecido hepático



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Níveis proteicos de HMG CoA-R (G), ABCG5 (H) e ABCG8 (I)

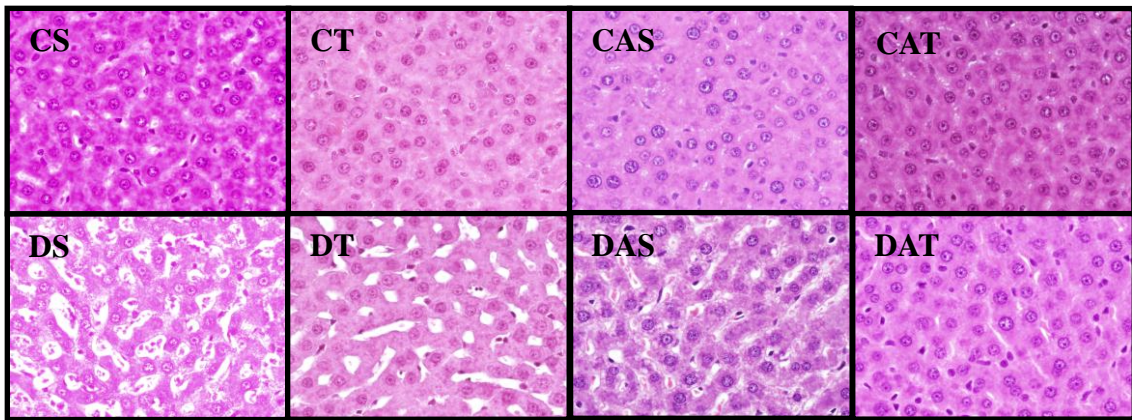
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 a 5 ratos wistar machos por grupo. \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS; § p<0,05 em relação ao grupo DT, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

#### 4.18 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a esteatose hepática

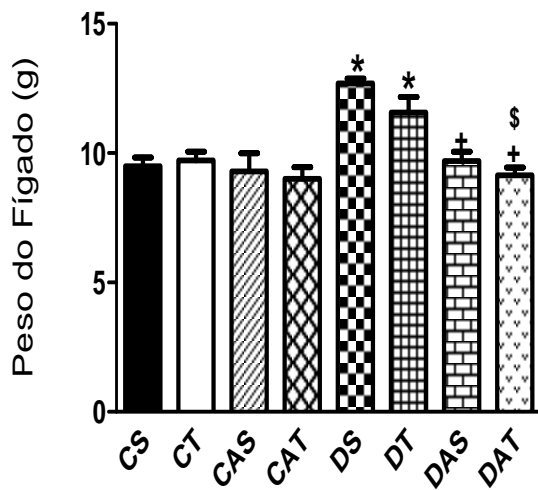
O peso do fígado foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo DS quando comparados a todos os grupos controles, assim como, no grupo DT quando comparado aos grupos CAS e CAT (Figura 33A). O tratamento com ASE isoladamente reduziu ( $p < 0,05$ ) o peso do órgão em questão nos animais do grupo DAS quando comparados ao grupo DS (Figura 33A). A administração do ASE associada ao exercício físico diminuiu ( $p < 0,05$ ) o peso do fígado nos animais do grupo DAT quando comparados aos grupos DS e DT (Figura 33A). O exercício físico não alterou significativamente o peso do fígado nos animais do grupo DT quando comparados ao grupo DS (Figura 33A).

Como verificado na fotomicrografia e na Figura 33B, a análise histológica do fígado pelo método de hematoxilina/eosina, evidenciou maior percentual ( $p < 0,05$ ) de gotículas de lipídios nos hepatócitos dos grupos DS, DT e DAS quando comparados a todos os controles, assim como, no grupo DAT quando comparado aos grupos CAS e CAT. Caracterizando um quadro de esteatose hepática. Tanto a atividade física quanto a administração do ASE isoladamente ou associados reduziram ( $p < 0,05$ ) o conteúdo lipídico hepático nos animais dos grupos DT, DAS e DAT quando comparados ao grupo DS (Figura 33B). Entretanto, a associação do tratamento com ASE ao exercício físico reduziu ( $p < 0,05$ ) o conteúdo lipídico, de forma mais eficaz, no grupo DAT quando comparado aos grupos DT e DAS, ou seja, os tratamentos separadamente (Figura 33B).

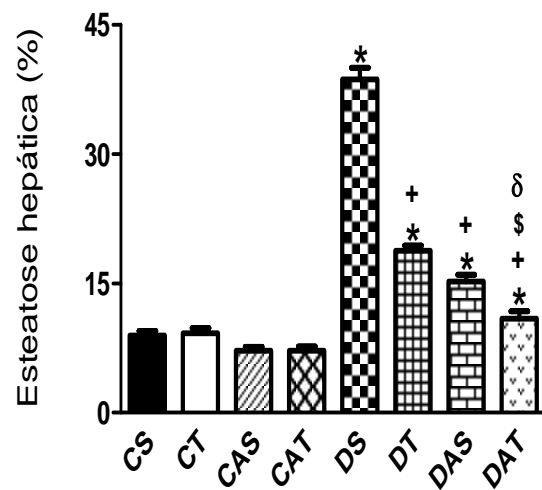
Figura 33 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a esteatose hepática



(A)



(B)



Legenda: Animais controles: sedentários (CS), treino (CT), sedentários tratados com ASE (CAS) e treino tratados com ASE (CAT); e animais diabéticos: sedentários (DS), treino (DT), sedentários tratados com ASE (DAS) e treino tratados com ASE (DAT). Esteatose hepática. Cortes representativos do fígado corados com hematoxilina e eosina. Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 60X).  
 Peso do fígado (A) e a esteatose hepática (B).

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, n=10 para o peso do fígado e n=5 para a avaliação da esteatose, ratos wistar machos por grupo. Exceção: letra (A) no grupo DT e na letra (B) no grupo DAT \*p<0,05 em relação aos grupos CAS e CAT. Para os demais: \*p<0,05 em relação aos grupos controles; + p<0,05 em relação ao grupo DS; \$p<0,05 em relação ao grupo DT; δp<0,05 em relação ao grupo DAS, conforme determinado pelo método *three-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

O DM2 é uma doença crônica que afeta múltiplos órgãos e sistemas, uma patologia complexa envolvendo o desenvolvimento progressivo da resistência à insulina no fígado e nos tecidos periféricos acompanhada por uma secreção irregular de insulina pelas células beta pancreáticas o que ocasiona a hiperglicemia (Srinivasan e Ramarao, 2007; Lu *et al.*, 2010; Delbin e Trash, 2014). Este estudo avaliou o papel do tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico sobre as alterações fisiológicas, metabólicas, moleculares e morfológicas descritas neste modelo de DM2 experimental.

Nossos resultados mostraram que o peso corporal não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais estudados, demonstrando uma tendência de redução da massa corpórea nos animais dos grupos diabéticos, corroborando com dados anteriormente publicados por Zhang *et al.* (2010) e por Guo *et al.* (2011). Estes grupos também encontraram redução do peso corporal em ratos Wistar, mesmo com a utilização de dieta hiperlipídica por algumas semanas, no mesmo modelo experimental desenvolvido para este estudo. Entretanto, foi observado o aumento do peso corporal, com a utilização de dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ em ratos Sprague-Dawley (Lu *et al.*, 2010). Desta forma, podemos sugerir que os ratos Wistar são mais resistentes ao ganho de peso ou mais propensos a perder peso nestas condições experimentais.

No modelo experimental estudado, evidenciamos uma redução no tempo de exercício e na distância percorrida pelos animais do grupo diabético em relação ao grupo controle tratado com ASE, durante o segundo teste de esforço realizado ao final do tratamento, confirmando os achados de Rouyer *et al.* (2007). O tratamento com ASE promoveu um aumento significativo no tempo e na distância percorrida pelos animais diabéticos durante o exercício, possivelmente através de uma elevação da performance muscular nos animais controles, bem como, restaurando a capacidade funcional nos animais diabéticos. O mecanismo de seu efeito benéfico na função muscular ainda não está esclarecido, mas pode ser decorrente de um efeito direto na função circulatória e respiratória do músculo esquelético. Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ASE também é capaz de estimular a formação de NO em células endoteliais, via ativação da NOS (Rocha *et al.*, 2007), o qual poderia ser um importante mediador do efeito benéfico do ASE na dinâmica muscular.

O NO liberado pelas propriedades do ASE, no tecido muscular esquelético, poderia melhorar a microcirculação da maquinaria contrátil dos miócitos, devido à sua ação vasodilatadora, assim como, por promover o aumento da biogênese mitocondrial (Wadley e McConnell, 2007) e da capilaridade muscular (Lloyd *et al.*, 2003). Em adição, alguns trabalhos sugerem que o consumo de bebidas ricas em polifenóis suprime a utilização de hidratos de carbono, poupando, assim, glicogênio resultando no aumento da execução de exercícios de resistências (Murase *et al.*, 2005; Murase *et al.*, 2006). Outros dados demonstraram que os polifenóis da maçã melhoram a função muscular normal em ratos Wistar, através do aprimoramento do metabolismo oxidativo, pela proteção das fibras musculares do estresse oxidativo, promovendo o aumento da resistência muscular (Nakazato *et al.*, 2007). Desta forma, sugerimos que o ASE também possa estar promovendo o aumento do conteúdo de glicogênio muscular e a proteção das fibras musculares do estresse oxidativo, devido ao seu efeito antioxidante (Rocha *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2010, da Costa *et al.*, 2012; de Bem *et al.*, 2014). Demonstramos pela primeira vez, que o tratamento com ASE possui um efeito estimulante sobre a atividade física. Nossos resultados podem dar suporte científico para a procura e consumo de bebidas ricas em extrato de açaí, por jovens envolvidos em práticas esportivas.

Alguns estudos utilizam uma dieta com alto teor de gordura e uma baixa dose de STZ, que ocasionam um dano parcial às células  $\beta$ -pancreáticas, para a indução da resistência à insulina e do estresse oxidativo, obtendo um modelo experimental de DM2 (Zhang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010). Os animais dos grupos diabéticos desenvolveram hiperglicemia, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, diminuição da sensibilidade à insulina e perda da função das células beta pancreáticas corroborando com dados obtidos por outros grupos (Xing *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011; Ibrahim e Islam, 2014), demonstrando que este modelo apresenta satisfatoriamente os parâmetros que caracterizam o DM2, podendo ser utilizado para testes de tratamentos com agentes antidiabéticos.

Dados da literatura demonstram que a utilização de glicose pelos tecidos periféricos (glicólise) está diminuída e a taxa de glicogenólise e de gliconeogênese hepática é aumentada consideravelmente em pacientes com DM2, o que contribui significativamente com a hiperglicemia de jejum (Barthel e Schmoll, 2003; Mackenzie e Elliott, 2014). A exposição aguda das células beta pancreáticas às altas concentrações de glicose resulta em um aumento substancial na liberação de insulina, ao passo que a exposição crônica a essa situação acaba

desencadeando a dessensibilização da insulina estimulada pela glicose (DeFronzo e Abdul-Ghani, 2011).

Neste estudo os animais diabéticos apresentaram hiperglicemia e o grupo DS manteve os níveis glicêmicos elevados durante todo o período experimental, corroborando com dados publicados por Xing *et al.* (2009). O tratamento com ASE isoladamente apresentou um efeito promissor de reduzir a glicemia nos animais diabéticos a partir da segunda semana de tratamento, apresentando níveis glicêmicos muito semelhantes aos encontradas nos animais controles no final desse período (4 semanas de tratamento). Evidências recentes têm sugerido que os polifenóis possuem propriedades hipoglicemiantes (Babu *et al.*, 2013) e resultados do nosso grupo demonstraram que o tratamento preventivo com o ASE reduz os níveis glicêmicos em modelo de síndrome metabólica (de Oliveira *et al.*, 2010) e em modelo de programação metabólica (dados não publicados). Sugerimos que os mecanismos envolvidos neste efeito benéfico possam estar associados com a inibição da alfa-glicosidase, promovida pela ação de proantocianidinas (Schäfer e Högger, 2007), um dos polifenóis presente em maior concentração no ASE. Esta inibição retarda a liberação da glicose proveniente da dieta e atrasa sua absorção, resultando na redução dos níveis glicêmicos plasmáticos pós-prandiais (Schäfer e Högger, 2007). O aumento da sensibilidade à insulina (dados discutidos posteriormente) e a inibição da absorção intestinal de glicose, que reduz as concentrações da mesma na corrente sanguínea, ocasionada pelas catequinas, (Shimizu *et al.*, 2000) são mecanismos que também podem estar associados ao potencial do ASE de reduzir a hiperglicemia neste modelo experimental.

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com ASE associado ao exercício físico reduziu drasticamente os níveis glicêmicos nos animais diabéticos já na primeira semana de tratamento. Após as quatro semanas de tratamento os animais do grupo DAT apresentaram valores glicêmicos próximos aos encontrados nos grupos controles e estatisticamente menores que os observados no grupo DT, que somente realizou atividade física regular. Desta forma, podemos sugerir que a associação da atividade física ao tratamento com ASE potencializou a redução dos níveis glicêmicos na primeira semana de tratamento. Entretanto, a atividade física isoladamente também demonstrou um efeito promissor de reduzir os níveis glicêmicos nos animais diabéticos ao longo das quatro semanas de tratamento. Os principais mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo da glicose pelo exercício físico são: a estimulação do transporte de glicose para os músculos, o aumento



da ação da insulina nas células dos órgãos envolvidos com a atividade física e a regulação positiva das vias de sinalização estimuladas pela insulina (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011). A partir destes achados, sugerimos que o ASE e o exercício físico podem estar atuando em pontos distintos para a regulação dos níveis glicêmicos e este pode ser o principal fator envolvido na maior redução da glicemia com a associação de ambos já na primeira semana de tratamento. Mostramos pela primeira vez neste estudo, o efeito hipoglicemiante do tratamento com ASE, posterior ao estabelecimento da doença, em modelo de DM2.

Os níveis séricos de insulina e a resistência à insulina foram maiores nos animais dos grupos DS e DT, corroborando com dados publicados por Guo *et al.* (2011 e 2013) e por Sharma *et al.* (2011). O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico reduziu os níveis insulinêmicos nos animais diabéticos. Entretanto, o grupo DT, que somente realizou atividade física regular, apresentou aumento da insulinemia, demonstrando que o treinamento não alterou esse parâmetro nos animais diabéticos. Desta forma, o resultado observado no grupo DAT (ASE associado ao exercício) foi oriundo das propriedades do extrato, demonstrando que o ASE possui um efeito mais potente na redução da hiperinsulinemia. A resistência à insulina também foi reduzida nos animais diabéticos tratados com ASE e que realizaram atividade física isoladamente ou associados. Porém, o exercício físico isoladamente demonstrou uma menor redução da resistência à insulina quando comparado ao tratamento com ASE isoladamente e associado à atividade física. Dados anteriormente publicados pelo nosso grupo demonstraram que o ASE reduz a hiperinsulinemia e a resistência à insulina em modelo de síndrome metabólica (de Oliveira *et al.*, 2010) e em modelo de programação metabólica (dados não publicados). Outro grupo também encontrou efeitos semelhantes, utilizando o açaí em uma população saudável com sobrepeso (Udani *et al.*, 2011). Evidências recentes têm sugerido que os polifenóis têm um potencial significativo de aumentar a sensibilidade à insulina (Babu *et al.*, 2013). Os possíveis mecanismos do ASE associados ao aumento da sensibilidade à insulina serão discutidos a seguir, através da análise das alterações promovidas pelo tratamento sobre a expressão das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina. Em contrapartida, os mecanismos pelos quais o exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina podem ser, por ocasionar o aumento da capacidade do tecido muscular de capturar a glicose circulante, devido à diminuição das reservas de gordura intramuscular (Sigal *et al.*, 2007), mas também por promover o aumento da expressão das principais proteínas da cascata de sinalização da

insulina (Sato *et al.*, 2003; Christ-Roberts *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2012), conforme dados que serão discutidos neste estudo com maiores detalhes adiante, e ainda, por ocasiona o aumento da capacidade do músculo de oxidar a gordura, sendo este um importante mecanismo para o aumento da sensibilidade à insulina.

Em adição, a funcionalidade das células beta pancreáticas foi reduzida nos animais diabéticos do grupo DS confirmando os achados de Sharma *et al.* (2011) e de Ibrahim e Islam (2014). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados aumentaram a funcionalidade das células beta pancreáticas nos animais diabéticos, contribuindo para a redução da hiperinsulinemia e da resistência à insulina observadas neste estudo. Dados da literatura mostraram que as epicatequinas, componente fenólico presente no ASE, induzem a regeneração das células beta pancreáticas (Kim *et al.*, 2003). Desta forma, sugerimos que este possa ser um dos caminhos pelos quais o extrato promove seus efeitos benéficos sobre os parâmetros anteriormente mencionados. Além disso, foi demonstrado que o exercício físico de intensidade vigorosa e moderada pode ocasionar a melhora da funcionalidade das células beta pancreáticas (Slentz *et al.*, 2009; Malin *et al.*, 2013) por mecanismos distintos. A elevada quantidade de exercício de intensidade vigorosa foi associada a uma melhoria na sensibilidade à insulina e uma diminuição na secreção de insulina compensatória. Entretanto, a baixa quantidade de exercício de intensidade moderada foi associada a uma melhoria na sensibilidade à insulina semelhante, mas com quase nenhuma redução na secreção de insulina (Slentz *et al.*, 2009), corroborando com os dados encontrados em nosso estudo, no qual foi realizada uma atividade física regular moderada, promovendo uma melhora da funcionalidade das células beta e o aumento da sensibilidade à insulina sem alterar a secreção de insulina nos animais do grupo DT.

Tecidos periféricos sensíveis à insulina, tais como o músculo e o tecido adiposo, contêm diferentes isoformas de transportadores de glicose, dentre eles o GLUT-1 e o GLUT-4 (Mueckler, 1990). A insulina induz a translocação do GLUT-4 do interior da célula para a membrana plasmática aumentando dessa forma a captação de glicose nos tecidos periféricos (Klip *et al.*, 1987). A reduzida captação de glicose no músculo e no tecido adiposo é um fator causal de resistência à insulina periférica em pacientes diabéticos do tipo 2 (DeFronzo e Bonadonna, 1992). Alterações na expressão das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina, que culminam com a menor translocação do GLUT-4 para a membrana, podem afetar a captação de glicose basal ou induzida pela insulina nos tecidos periféricos.

No tecido muscular esquelético, nossos resultados mostraram menor conteúdo proteico de IR nos animais do grupo DS, corroborando com dados publicados por Dong *et al.* (2013). Encontramos também reduzida expressão da pAKT nos animais dos grupos DS e DT, assim como, diminuição do conteúdo proteico do GLUT-4 nos animais do grupo DS, DT, DAS e DAT quando comparados aos grupos controles CT e CAT. Estas observações do nosso estudo, estão de acordo com os achados de outros grupos (Dong *et al.*, 2013; Gandhi *et al.*, 2013; Ishak *et al.*, 2013). Em adição, o conteúdo proteico da AKT foi reduzido nos animais dos grupos DS, DT e DAS quando comparados ao grupo CT. Tendo sido documentado por outro grupo a redução da expressão do RNAm da AKT em animais diabéticos (Sampath *et al.*, 2013). Portanto sugerimos, que o menor conteúdo de IR pode estar associado a uma diminuição da fosforilação tirosina ocasionada pela ligação da insulina ao seu receptor, resultando em reduzida ativação das principais proteínas da cascata de sinalização, como observado em nosso estudo, culminando com uma menor expressão e translocação do GLUT-4 para a membrana, desencadeando a resistência à insulina.

O tratamento com ASE isoladamente não alterou significativamente a expressão do IR, apenas apresentou uma tendência de aumentar a expressão do mesmo. O exercício físico isoladamente e associado ao ASE aumentou significativamente o conteúdo proteico do IR nos animais diabéticos, demonstrando um efeito promissor da atividade física sobre o aumento da expressão desse receptor no tecido muscular esquelético, efeito este que potencializou a ação do ASE neste parâmetro. Quanto a expressão da pAKT, o tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico aumentou o conteúdo dessa proteína nos animais diabéticos. Encontramos também aumento da expressão do GLUT-4 na associação do tratamento com ASE ao exercício físico nos animais diabéticos, demonstrando mais uma vez que a atividade física potencializou o efeito do extrato. O tratamento com ASE isoladamente demonstrou uma tendência de elevação da expressão desse transportador. Estes resultados em conjunto sugerem que a elevação do conteúdo proteico do IR, poderia ocasionar maior ligação da insulina ao seu receptor, aumentando a ativação da cascata de sinalização da insulina, culminando com o aumento da expressão do GLUT-4, possibilitando que o mesmo seja translocado para a membrana e possa captar a glicose circulante. Nosso grupo mostrou que o ASE, rico em polifenóis, reduz a hiperinsulinemia e a resistência à insulina em modelo de síndrome metabólica (de Oliveira *et al.*, 2010) e em modelo de programação metabólica (dados não publicados). Dados da literatura reportaram as propriedades terapêuticas da

atividade física sobre essa sinalização. Indivíduos diabéticos apresentaram menor expressão da AKT, antes do início do exercício, quando comparados à indivíduos saudáveis (Christ-Roberts *et al.*, 2004) e o treino aumentou significativamente a expressão dessa proteína em ambos os grupos. Ao mesmo tempo, a atividade física regula a transcrição de genes como o IRS-1 e a expressão pós-transcricional da PI3K (Sato *et al.*, 2003), bem como, aumenta a expressão do GLUT-4 (Christ-Roberts *et al.*, 2004) efeitos fundamentais para a melhora da sensibilidade à insulina. Em adição, associado a estes achados podemos mencionar o efeito promissor do treinamento sobre o aumento da expressão das proteínas AKT, pAKT e do GLUT-4 nos animais controles dos grupos CT e CAT em relação a todos os outros grupos neste estudo, demonstrando o importante potencial de atuação da atividade física sobre a musculatura esquelética, promovendo o aumento da sensibilidade à insulina. A maior expressão dessas proteínas, promovida pelo ASE isoladamente ou associado ao exercício físico, poderia explicar o aumento da sensibilidade à insulina e a redução da hiperglicemia e da resistência à insulina observados neste estudo nos animais diabéticos. Demonstramos pela primeira vez, o efeito do ASE sobre a sinalização da insulina.

No TAE, nossos resultados mostraram maior conteúdo proteico de IR nos animais de todos os grupos diabéticos, sendo mais elevados no grupo DT quando comparado aos animais diabéticos não tratados e que receberam tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico. Na década de oitenta dados da literatura demonstraram que ratos submetidos à atividade física expressavam níveis mais elevados de receptores de insulina em pequenos adipócitos (Craig *et al.*, 1981). Encontramos também maior expressão da pJNK nos animais DS, corroborando com dados publicados por Hu *et al.* (2014) e menor conteúdo proteico do pIRS-1 nos animais DS, assim como, da pAKT e do GLUT-4 em todos os grupos de animais diabéticos, como demonstrado por outros grupos (Furuta *et al.*, 2002; Gandhi *et al.*, 2013; Ishak *et al.*, 2013). No entanto, não foram encontradas diferenças na quantificação da proteína AKT neste estudo. Este dado está de acordo com os resultados encontrados em modelo experimental utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (Dinh *et al.*, 2015).

O aumento da expressão do IR nos animais diabéticos pode estar relacionado aos elevados níveis de insulina circulantes, que poderiam estar estimulando este aumento proteico. Também sugerimos que o aumento da proteína pJNK, que atua fosforilando um resíduo de serina no IRS-1/2, possa reduzir a ativação promovida pela fosforilação tirosina

ocasionada pela ligação da insulina ao seu receptor, inibindo a cascata de sinalização da insulina. Corroborando com estudos que demonstraram aumento da expressão do IRS-1 serina 307 e redução do conteúdo proteico do IRS-1 tirosina em animais diabéticos (Dong *et al.*, 2013). Por outro lado, evidenciamos uma diminuição nos níveis de pIRS-1 e pAKT nos animais diabéticos o que motiva o curso da resistência à insulina e o estado pré-diabético, pois apesar de haver aumento do número de receptores no TAE não ocorre a ativação da cascata de sinalização da insulina, culminando com a redução da translocação do GLUT-4 para a membrana, promovendo a hiperglicemia encontrada neste estudo. Em adição, foram encontrados reduzidos níveis proteicos de adiponectina nos animais dos grupos DS e DT, o que contribui para uma sensibilidade à insulina prejudicada através de vários mecanismos, incluindo a diminuição no gasto energético e na oxidação de ácidos graxos, bem como, ocasionando a elevação da produção da glicose hepática e a redução da utilização da glicose muscular (de Kloet *et al.*, 2010). Entretanto, não encontramos diferenças estatísticas na expressão da leptina, uma proteína chave no estabelecimento da resistência à insulina, nos diferentes grupos estudados. Dados da literatura reportam que os níveis séricos e a expressão do RNAm para leptina no tecido adiposo estão aumentados em animais diabéticos alimentados com dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ (Zhang *et al.*, 2013).

No presente estudo, em homogenato de TAE, nós mostramos que o tratamento com ASE isoladamente aumentou significativamente o conteúdo proteico do pIRS-1 (fosforilação tirosina) nos animais diabéticos, demonstrando que o extrato ativa um passo limitante da cascata de sinalização da insulina. Evidenciamos também que o ASE e o exercício físico isoladamente ou associados promoveram menor expressão da pJNK nos animais diabéticos, contribuindo para a redução da fosforilação de um resíduo de serina ao IRS-1. Quanto as alterações no GLUT-4, o tratamento com ASE isoladamente aumentou a expressão desse transportador nos animais diabéticos. A administração do extrato associada à atividade física elevou significativamente o conteúdo proteico do GLUT-4 nos animais diabéticos. Dado este que nos permite inferir que o treinamento físico potencializou o efeito do ASE, aumentando a expressão desse transportador. Cabendo aqui ressaltar que este é um importante ponto de regulação dos níveis glicêmicos, pois o aumento da expressão do GLUT-4 ocasiona sua maior translocação para a membrana, efeito este ocasionado pela associação dos tratamentos. Enfim, demonstramos que o tratamento com ASE possui uma tendência de aumentar a expressão de adiponectina e que a associação do extrato ao exercício físico elevou significativamente o

conteúdo proteico dessa proteína nos animais diabéticos. Onde mais uma vez podemos observar que a atividade física potencializa o efeito do ASE, aumentando a expressão de adiponectina, proteína que também contribui para o aumento da sensibilidade à insulina.

Estudos anteriores do nosso laboratório comprovaram que o extrato da casca da uva (ACH09), outro fruto rico em polifenóis, atua aumentando a expressão das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina em modelo de diabetes (Soares de Moura *et al.*, 2011) e em modelo de programação metabólica com dieta hiperlipídica durante a lactação (Resende *et al.*, 2013). Outros grupos apontaram que os flavonoides como o flavon-3-ols, podem reduzir a fosforilação de um resíduo de serina ao IRS-1 em células musculares C1C12 de camundongos (Deng *et al.*, 2012) e que as antocianidinas aumentam a ativação da AKT e reduzem a da JNK em camundongos db/db ou obesos alimentados com dieta hiperlipídica (Guo *et al.*, 2012). Mecanismos esses que estão associados aos efeitos ativadores do ASE sobre a cascata de sinalização da insulina, ocasionando o aumento da sensibilidade à insulina. O exercício físico crônico, por sua vez, ocasiona uma redução nos níveis séricos de marcadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e aumenta os níveis séricos da adiponectina (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011), proteína com propriedades sensibilizadoras da insulina, como também induz a liberação de galanina que facilita a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática em ratos com DM2 (Liang *et al.*, 2012), potencializando o efeito do ASE sobre o aumento da expressão do GLUT-4 e da adiponectina no tecido adiposo.

Os resultados apresentados até aqui mostram que a associação das propriedades hipoglicemiantes, de aumento da sensibilidade à insulina, de ativação das principais proteínas da cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético e no TAE, de aumento da funcionalidade das células beta pancreáticas e anti-inflamatórias do extrato, nos permitem sugerir que o ASE é uma ferramenta terapêutica que apresenta importante efeito anti-diabético, demonstrado pela primeira vez neste estudo.

Dados da literatura têm demonstrado que o TNF- $\alpha$  é um importante mediador da resistência à insulina (Hotamisligil *et al.*, 1994; Wellen e Hotamisligil, 2005). Neste estudo encontramos aumento dos níveis séricos dessa citocina pró-inflamatória nos animais do grupo DS, estando de acordo com os achados de Sharma *et al.* (2011), que também demonstraram aumento dos níveis séricos de IL-6. Entretanto, em nossos resultados não encontramos diferenças estatísticas nos níveis de IL-6 nos diferentes grupos estudados. A hiperglicemia, a dislipidemia e o aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Sharma *et al.*, 2011) são fatores

que podem levar a ativação das proteínas IKK- $\beta$ , PKC- $\Theta$  e JNK responsáveis pela fosforilação de um resíduo de serina ao IRS-1/2, reduzindo a fosforilação tirosina mediada pela insulina com conseqüente inativação da cascata de sinalização da insulina (Wellen e Hotamisligil, 2005). Estes dados corroboram com o estudo de Sun *et al.* (2011) que apontou um aumento da expressão da proteína JNK no tecido hepático de animais diabéticos, assim como, com o nosso estudo que demonstrou maior conteúdo proteico dessa proteína em homogenato de TAE. Outro mecanismo proposto para inativação do IRS é a ativação da proteína STAT3 pelas citocinas pró-inflamatórias anteriormente citadas, resultando em aumento da expressão de SOCS3 que através de uma reação de ubiquitinação promove a degradação do IRS (Gray e Kim, 2011), culminando com uma menor translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática. Assim supomos, que estes sejam alguns dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina, associada à inflamação e ao tecido adiposo no modelo experimental estudado.

Neste estudo, o tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente apresentaram uma tendência de reduzir os níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos animais diabéticos. No entanto, a associação do ASE à atividade física reduziu significativamente os níveis séricos dessa citocina pró-inflamatória nos animais diabéticos. Nosso grupo demonstrou que o ASE possui propriedades anti-inflamatórias (Moura *et al.*, 2012) e nosso estudo apontou seu efeito sobre o aumento da expressão de adiponectina, que dentre outras funções, é responsável pela redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ . Dados da literatura também apontaram que o exercício físico crônico, como o realizado neste estudo, ocasiona a diminuição dos níveis séricos de marcadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e aumenta os níveis de adiponectina (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011), uma adipocina com importantes propriedades sensibilizadoras da insulina e como dito anteriormente, anti-inflamatórias. Este resultado nos permite sugerir que o exercício físico potencializou o efeito do ASE, contribuindo para a redução significativa dos níveis de TNF- $\alpha$ . Estes marcadores pró-inflamatórios, ou seja, a inflamação também está envolvida com a disfunção das células beta pancreáticas (Eguchi e Manabe, 2013). Agentes com propriedades anti-inflamatórias, como o ASE, possuem potencial terapêutico para o tratamento do DM2. Esta propriedade do extrato pode ser um mecanismo adicional que contribui para a melhora da funcionalidade das células beta (anteriormente discutido).

Vários fatores parecem contribuir para a etiologia da disfunção endotelial observada em modelos animais de DM2, assim como, em pacientes diabéticos. Dentre eles, destaca-se a

hiperglicemia ocasionando o acúmulo de intermediários lipídicos, como o diacilglicerol ativador da PKC, que possui múltiplos efeitos adversos sobre a função vascular, incluindo a ativação da NADPH oxidase gerando uma exacerbada produção de superóxido, promovendo o desacoplamento da NOS inibindo a produção e a atividade do NO (Hadi e Suwaidi, 2007). O ânion superóxido também contribui para a inativação do NO através da formação de peroxinitrito, potente agente oxidativo, ocasionando uma vasodilatação prejudicada (Maritim *et al.*, 2003). Ocorre também a ativação das proteínas MAPK que estimulam a síntese e a secreção de endotelina-1, um peptídeo vasoconstrictor (Cardillo *et al.*, 2002; Sachidanandam *et al.*, 2009), e a inativação da PI3K responsável no endotélio vascular por regular a sinalização e ativação da eNOS (Cardillo *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2000). Outras alterações vasculares apresentam papel de destaque no comprometimento da função endotelial, dentre elas, o aumento da expressão de  $\alpha$ -adrenoceptores, a disfunção da guanilato ciclase solúvel e a expressão aumentada do receptor AT1 que ocasionam um aumento da contratilidade em artérias de ratos diabéticos (Brondum *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que os animais do grupo DS possuem respostas contráteis exacerbadas à noradrenalina em comparação aos controles, corroborando com resultados encontrados em outros modelos de DM2, em ratos Zucker obesos (Stepp e Frisbee, 2002), ratos Goto-Kakizaki (Brondum *et al.*, 2008) e em ratos com STZ (Yousif, 2008). O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados reduziram a contratilidade induzida pela noradrenalina nos animais diabéticos. Também demonstramos que o efeito vasodilatador dependente do endotélio promovido pela ACh foi significativamente menor nos animais do grupo DS (doses de 100 e 1000 pmol), o que corrobora com resultados publicados por Wang *et al.* (2009) em anéis de aorta e por Stanley *et al.* (2013) em artérias mesentéricas, caracterizando um quadro de disfunção endotelial. O tratamento com ASE e sua associação ao exercício físico reduziu significativamente a disfunção endotelial nos animais dos grupos DAS e DAT, através do aumento da vasodilatação observada nestes grupos quando comparados ao grupo DS. No entanto, não houve alteração no efeito vasodilatador independente de endotélio promovido pela nitroglicerina nos animais estudados, resultado semelhante ao encontrado em anéis de aorta de animais diabéticos (Wang *et al.*, 2009). Este efeito vasodilatador induzido através do tratamento com ASE é mediado pelo NO e pelo EDHF (Rocha *et al.*, 2007). Desta forma, podemos sugerir que a liberação endotelial de NO induzida pelo ASE, como demonstrado



previamente por nosso grupo em células endoteliais em cultura (Rocha *et al.*, 2008), assim como, seu efeito antioxidante observado em estudos experimentais do nosso grupo (Rocha *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; de Moura *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012; da Costa *et al.*, 2012; de Bem *et al.*, 2014) e no presente estudo podem contribuir para a melhora da função endotelial provavelmente por aumentar a biodisponibilidade do NO. Existem evidências de que os polifenóis presentes em frutas, por exemplo, são capazes de modular a produção de NO no endotélio vascular, contribuindo para a prevenção da disfunção endotelial (Curin e Andriantsitohaina, 2005). Também foi demonstrado, que os polifenóis presentes no chá verde aumentam a atividade da PI3K regulando a ativação da eNOS e a produção de NO nas células endoteliais, bem como, diminuindo a expressão de endotelina-1 reduzindo o tônus vasoconstrictor promovendo uma melhora da função vascular no DM2 (Munir *et al.*, 2013).

Outra explicação para a melhora da função vascular no diabetes são os efeitos benéficos do exercício físico moderado, que ocasiona aumento dos níveis de nitrito/nitrato, da expressão da eNOS (Bunker *et al.*, 2010), da defesa antioxidante e a redução da geração de espécies reativas, conseqüentemente reduzindo o dano celular (Qi *et al.*, 2011). A atividade física aumenta os níveis de adiponectina (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011), essa adipocina também possui um importante papel no relaxamento vascular, visto que uma infusão de adiponectina promove um aumento do efeito vasodilatador dependente do endotélio pela ACh em animais diabéticos (Zhang *et al.*, 2010). Enfim, o exercício atenua as alterações nas concentrações do cálcio intracelular na musculatura lisa vascular coronariana associadas ao diabetes, facilitando a extrusão de cálcio, aumentando o seu teor no retículo sarcoplasmático, ocasionando relaxamento muscular, contribuindo com a função endotelial (Witczak e Sturek, 2004).

O excesso oxidativo tem sido demonstrado em vários modelos de diabetes experimental, incluindo o DM2 em camundongos db/db (Hinder *et al.*, 2013), DM2 em ratos obesos Zucker (Raza *et al.*, 2013) e o DM2 com a associação de dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ (Guo *et al.*, 2013; Posuwan *et al.*, 2013). O aumento da ativação da NADPH oxidase (Wei *et al.*, 2006) e da oxidação de glicose (Wolff e Dean, 1987; Jiang *et al.*, 1990), a formação dos AGEs (Mohamed *et al.*, 1999), a produção mitocondrial de agentes oxidantes (Stone e Yang, 2006) e o estresse do retículo endoplasmático (Montane *et al.*, 2014) têm sido implicados no aumento da geração de ânion superóxido em modelos de diabetes experimental (Houstis *et al.*, 2006; Rask-Madsen e King, 2008). Dentro deste contexto, o

estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, resultando na biodisponibilidade destas espécies, gerando um estado pró-oxidante (Grossman, 2008). Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas espécies reativas a componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos e principalmente lipídeos (Maritim *et al.*, 2003). Desta forma, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, que está relacionado com a patogênese de várias doenças, dentre elas o DM2 (Scott e King, 2004).

Nossos resultados demonstram um aumento significativo nos níveis de MDA em amostras de plasma nos animais diabéticos dos grupos DS e DT, assim como, em homogenato de TAE e de tecido hepático nos animais diabéticos do grupo DS, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica neste modelo de DM2. O aumento dos níveis de MDA no plasma e tecido hepático também foram observados por Zhang *et al.* (2010) e por Lu *et al.* (2010) no modelo que utiliza dieta hiperlipídica associada a uma baixa dose de STZ. O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico reduziu significativamente os níveis de MDA nas amostras de plasma e em homogenato de fígado nos animais diabéticos. Em homogenato de TAE o tratamento com ASE isoladamente apresentou uma tendência de reduzir os níveis de MDA, enquanto sua associação ao exercício físico diminuiu significativamente esses níveis nos animais diabéticos. Cabendo aqui ressaltar que o exercício físico potencializou o efeito redutor da peroxidação lipídica do extrato em amostras de TAE. Estes resultados associados sugerem um efeito antioxidante do ASE, que já foi demonstrado por nosso grupo em lavado bronqueoalveolar de camundongos expostos a fumaça de cigarro (Rocha *et al.*, 2008); em plasma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (de Oliveira *et al.*, 2010); em homogenato de pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro (Moura *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012); em homogenato de vasos mesentéricos em modelo de hipertensão renovascular (da Costa *et al.*, 2012); e em plasma e homogenato de rim em modelo de programação metabólica com dieta hipoprotéica durante a gestação (de Bem *et al.*, 2014).

As espécies reativas também podem levar à destruição de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril (Halliwell e Gutteridge, 1999). As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelos radicais oxidantes, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação,

além de maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações das espécies reativas sobre as proteínas (Yu, 1994).

Nossos resultados mostram um aumento significativo na carbonilação de proteínas em amostras de plasma nos animais diabéticos dos grupos DS e DT; e em homogenato de TAE e tecido hepático nos animais diabéticos do grupo DS, caracterizando um aumento na oxidação de proteínas neste modelo de DM2. Estes resultados corroboram com estudos previamente publicados por Tahara *et al.* (2013) em modelo de DM2 e por Kesavanarayanan *et al.* (2013) em ratos submetidos à dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ. O tratamento com ASE isoladamente e associado ao exercício físico diminuiu significativamente a carbonilação em amostras de plasma e em homogenato de tecido hepático nos animais diabéticos. Enquanto, em homogenato de TAE o tratamento com ASE apresentou uma tendência de reduzir a carbonilação de proteínas, porém sua associação à atividade física diminuiu significativamente os níveis de oxidação de proteínas nos animais diabéticos. Parveen *et al.* (2010) também observaram uma redução da carbonilação de proteínas em ratos diabéticos tratados com Pycnogenol, uma mistura complexa de procianidinas, componentes polifenólicos colhidos a partir da casca de um pinheiro francês (*Pinus pinaster*), confirmando um importante papel dos polifenóis para a indução dos efeitos antioxidantes observados.

As enzimas antioxidantes constituem a principal barreira de defesa contra o dano oxidativo. As enzimas antioxidantes mais importantes são a SOD, Catalase e a GPx. A SOD é o maior sistema de defesa da célula vascular. Ela age catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, já a catalase e a GPx transformam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Cai, 2005).

Nossos resultados mostram uma diminuição significativa na atividade da SOD, catalase e GPx em amostras de plasma, TAE e fígado dos animais diabéticos, quando comparadas com a dos animais controles. Estes resultados estão de acordo com dados publicados por Zhang *et al.* (2010), por Lu *et al.* (2010), por Guo *et al.* (2013) e por outros grupos neste modelo de diabetes. Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima catalase no plasma e da GPx no tecido adiposo entre os diferentes grupos estudados. O tratamento com ASE e o exercício físico aumentaram significativamente a atividade destas enzimas em todos os tipos de amostras utilizadas dos animais diabéticos. No entanto, encontramos uma redução na atividade da GPx no grupo diabético treino, em homogenato de TAE. Estes dados, nos permitem sugerir que o mecanismo do efeito

antioxidante do ASE deve-se em grande parte ao aumento da defesa antioxidante nos diferentes tecidos, contribuindo para o aumento da biodisponibilidade de NO.

Trabalhos têm demonstrado que a frequência e a intensidade da realização de exercícios físicos alteram o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Desta forma, o exercício crônico prepara o corpo para novos estresses que possam ocorrer, através do aumento da atividade do sistema antioxidante celular, efeito conhecido como adaptação ao treinamento (Ji, 1999). Corroborando com dados que apontam uma redução de agentes oxidantes e aumento da atividade antioxidante em animais diabéticos que realizam atividade física (Qi *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2014). Esses achados em conjunto com nossos resultados sugerem o importante papel do efeito antioxidante do exercício físico e de sua associação ao tratamento com ASE sobre as alterações patológicas desenvolvidas no DM2.

O NO é rapidamente oxidado a nitrito e então, a nitrato pela hemoglobina oxigenada, pelo oxigênio molecular e pelo ânion superóxido. Assim, os principais metabólitos oxidativos são nitrito e nitrato (Baylis e Vallance, 1998). Níveis elevados da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor competitivo da L-arginina, podem inibir significativamente a atividade da NOS (Fard *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que o estresse oxidativo desenvolvido pela hiperglicemia e hipercolesterolemia (Ito *et al.*, 1999), o TNF- $\alpha$  (Eid *et al.*, 2007) e os AGEs (Lu *et al.*, 2007) ocasionem a inibição da enzima arginina dimetilamino-hidrolase (DDAH) que metaboliza ADMA, aumentando seus níveis e inibindo a síntese do NO derivado do endotélio no DM2 (Ito *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 2008), como demonstrado em estudo com animais submetidos à dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ (Lin *et al.*, 2002). Também tem sido reportada uma redução da tetrahydrobiopterina (BH4), um efector alostérico da atividade da NOS, em aorta de ratos resistentes à insulina (Shinozaki *et al.*, 1999) e uma expressão prejudicada da eNOS (Zhu *et al.*, 2014) neste modelo experimental. Sugerimos que esses sejam os mecanismos envolvidos na diminuição da produção de NO observada neste modelo experimental e em indivíduos diabéticos. Portanto, as medidas dos níveis de nitrito obtidas neste estudo, refletem as mudanças na geração do NO. Nosso estudo encontrou uma redução dos níveis de nitrito em homogenato de TAE e de tecido hepático nos animais diabéticos do grupo DS, como demonstrado por outros grupos (Takenouchi *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2014). Sugerindo que a redução dos níveis de nitrito e indiretamente do NO correlaciona-se com a resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas elevados, atividade antioxidante reduzida e

com a disfunção endotelial observada. O tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados em homogenato de TAE, assim como, o tratamento com ASE isoladamente e associado à atividade física em homogenato de tecido hepático aumentaram os níveis de nitrito nos animais diabéticos. Estes dados demonstram a participação dos polifenóis, presentes neste extrato, e da atividade física, sobre o aumento da biodisponibilidade do NO.

Acreditamos que uma das maiores contribuições do ASE para o aumento da biodisponibilidade do NO, seja oriunda de seu efeito antioxidante, uma vez que, o estresse oxidativo tem um papel de destaque sobre a inibição da produção de NO, em acórdância com o estudo que utilizou um agente antioxidante e encontrou aumento de DDAH e redução nos níveis de ADMA em animais diabéticos (Lin *et al.*, 2002), sugerindo a importância do efeito antioxidante do ASE sobre o aumento da liberação de NO. Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ASE possui propriedades anti-inflamatórias (de Moura *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012), que podem estar atenuando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  que aumenta os níveis de ADMA reduzindo a síntese de NO. Outra importante propriedade do extrato é a estimulação da formação de NO em células endoteliais, efeito este que é abolido pela inibição da NO sintase (Rocha *et al.*, 2007), contribuindo para o aumento da biodisponibilidade do NO.

Em adição, dados da literatura têm demonstrado que o exercício físico promove o aumento da produção de NO na vasculatura através de vários mecanismos. Dentre eles possui papel de destaque, o aumento da expressão da eNOS em pacientes diabéticos do tipo 2 (Brinkmann *et al.*, 2011) e em modelos experimentais de DM2 (Grijalva *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011), a melhora da biodisponibilidade de BH4 em animais diabéticos (Meininger *et al.*, 2000; Bitar *et al.*, 2005; Grijalva *et al.*, 2008) e de seu potencial antioxidante atenuando o estresse oxidativo no diabetes experimental (Qi *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2014), desta forma, assim como o ASE a atividade física contribui para a elevação dos níveis de nitrito observados neste estudo.

A dislipidemia que envolve altos níveis de triacilglicerol e de ácidos graxos livres circulantes provenientes da dieta ou da lipólise, assim como, a exposição direta das células musculares aos ácidos graxos prejudicam a captação de glicose mediada pela insulina e, por conseguinte, podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina (Badawi *et al.*, 2010). Os ácidos graxos livres podem também ocasionar a indução da apoptose das

células beta (Shimabukuro *et al.*, 1998). Em adição ocorre um aumento na produção hepática de VLDL estimulada por citocinas pró-inflamatórias, o que ocasiona a dislipidemia diabética característica, que estimula a formação hepática de fibrinogênio, um fator de risco aterogênico (Pickup e Crook, 1998; Sjöholm e Nyström, 2006).

Nossos resultados mostram o aumento dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e de VLDL nos animais diabéticos do grupo DS, bem como, a redução dos níveis de HDL nos animais do grupo DS, corroborando com dados da literatura que demonstraram a ocorrência de dislipidemia neste modelo experimental de DM2 (Seo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Entretanto, não encontramos diferenças estatísticas nos níveis séricos de LDL nos diferentes grupos estudados. O tratamento com ASE associado ou não a atividade física reduziu os níveis séricos de triglicerídeos e de VLDL nos animais diabéticos. O treino potencializou o efeito do extrato sobre a redução desses níveis. A redução dos níveis séricos de triglicerídeos e do VLDL, está associada ao aumento da expressão de adiponectina e a redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , observados neste estudo. Dados da literatura demonstraram que a adiponectina induz a ativação da LPL, ocasionando o clearance de VLDL e a redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Berneis e Krauss, 2002), assim como, o TNF- $\alpha$  estimula a lipólise dos adipócitos aumentando os níveis de ácidos graxos circulantes e a inibição da síntese de adiponectina (Arner *et al.*, 2005), contribuindo para o aumento desses níveis. Considerando esses achados, sugerimos que as propriedades do ASE e da atividade física, anti-inflamatórias e de aumento da expressão de adiponectina participem ativamente na diminuição dos níveis de triglicerídeos e do VLDL. Os níveis séricos do colesterol total também foram reduzidos pelo tratamento com ASE e o exercício físico associados ou não nos animais diabéticos. Em adição, o tratamento com ASE associado ao exercício físico aumentou os níveis séricos de HDL nos animais diabéticos.

Quanto as alterações no perfil lipídico hepático, encontramos aumento dos níveis de triglicerídeos nos animais diabéticos do grupo DS e de colesterol nos animais diabéticos dos grupos DS e DT, corroborando com dados publicados por Seo *et al.* (2009) e por Zhang *et al.* (2012) em modelo de diabetes. O conteúdo de glicogênio também foi reduzido nos animais diabéticos do grupo DS, de acordo com resultados publicados por outros grupos neste modelo experimental (Tan *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2009). Notavelmente, o tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente e associados reduziram os níveis de triglicerídeos hepáticos e o tratamento com ASE isoladamente e associado à atividade física diminuiu os níveis hepáticos

de colesterol nos animais diabéticos. Assim como, a administração do ASE associada ao treinamento aumentou o conteúdo de glicogênio nos animais diabéticos. O potencial hipolipidêmico do ASE já havia sido demonstrado por resultados do nosso grupo em modelo de síndrome metabólica (de Oliveira *et al.*, 2010) e em modelo de programação metabólica (dados não publicados), corroborando com dados da literatura, que demonstraram o efeito hipocolesterolêmico do açaí em ratos submetidos a dieta hiperlipídica suplementada com 2% de polpa de açaí (de Souza *et al.*, 2012). As propriedades redutoras do perfil lipídico promovidas pelo treino também são conhecidas (Misra *et al.*, 2008; Teixeira de Lemos *et al.*, 2011). Porém, os mecanismos associados e esses efeitos serão abordados e discutidos com maiores detalhes adiante.

Vários mecanismos como a ativação da AMPK, estão associados à redução da hipertrigliceridemia. Encontramos uma redução na expressão da proteína pAMPK e aumento de AMPK no grupo DS quando comparado aos demais grupos. Zou *et al.* (2009), Yi *et al.* (2013) e Chen *et al.* (2014) encontraram, resultados semelhantes em ratos submetidos à dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ. A administração do ASE e a atividade física aumentaram a expressão da proteína pAMPK nos animais diabéticos do tipo 2. Estudos recentes indicam que catequinas e epicatequinas também ocasionam esta ativação (Wang *et al.*, 2014), como observado em nosso estudo. Em nível celular a ativação da AMPK inibe a gliconeogênese hepática (Bergeron *et al.*, 2001); aumenta a atividade da glicogênio sintase, enzima chave na síntese de glicogênio, contribuindo para o aumento do conteúdo de glicogênio no fígado (Zou *et al.*, 2009); promove a oxidação de ácidos graxos (Steinberg e Kemp, 2009) e regula a biogênese mitocondrial (Jørgensen *et al.*, 2005). Esta proteína também bloqueia a fosforilação de uma serina ao IRS-1 estimulando a translocação do GLUT-4 para a membrana no músculo esquelético (Zou *et al.*, 2009).

A AMPK também controla alguns dos mais importantes reguladores metabólicos celulares, ela fosforila e inibe a atividade da ACC e da FAS, assim como, reduz a expressão do SREBP-1c, limitando dessa forma proteínas que atuam na síntese de ácidos graxos (Carling *et al.*, 2008). Promove a ativação do peroxissoma proliferador-ativado do receptor gama coativador-1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) que controla a expressão de genes relacionados com a oxidação de lipídeos e com a biogênese mitocondrial (Wu *et al.*, 1999), reduzindo a produção de triglicérides e aumentando a oxidação de ácidos graxos, ocasionando a redução do conteúdo lipídico do fígado. Nós demonstramos que o tratamento com ASE aumentou a

expressão da proteína pACC e que a associação do ASE à atividade física reduziu o conteúdo proteico da FAS em animais diabéticos. A ativação da AMPK é um alvo terapêutico em potencial para o tratamento do diabetes tipo 2. A metformina, um exemplo de fármaco que promove a ativação desta via, é amplamente utilizada no tratamento desta patologia (Yu *et al.*, 2010), sugerindo que a utilização do ASE pode possuir potencial terapêutico no tratamento do DM2.

A lipogênese é uma via metabólica que converte os carboidratos em excesso em ácidos graxos, que são, posteriormente esterificados à triglicerídeos (Ferré e Foufelle, 2010). Um dos fatores de transcrição chave neste processo é o SREBP-1c. Este fator pode regular a expressão de múltiplos genes lipogênicos, que incluem, a ACC e a FAS (Dentin *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ASE e o exercício físico isoladamente ou associados reduziram os níveis proteicos da SREBP-1c, de acordo com dados publicados por Wang *et al.* (2014), mostrando que polifenóis como o resveratrol e a curcumina suprimem a expressão desse fator de transcrição lipogênico.

Dentro deste contexto, o exercício físico promove seus efeitos benéficos através, da redução da ativação de genes lipogênicos no fígado como o ácido graxo sintase (FAS) (Schultz *et al.*, 2012) e promove o aumento da expressão do receptor PPAR- $\alpha$  (Schultz *et al.*, 2012) que correlaciona-se com a alta atividade mitocondrial e peroxissomal (Pyper *et al.*, 2010), estimulando a utilização de glicose e oxidação de ácidos graxos. A atividade física ativa efetivamente a via de sinalização leptina-AMPK-ACC (Niu *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2013) atenuando as desordens lipídicas do fígado e revertendo parcialmente a resistência à insulina e à leptina (Yi *et al.*, 2013).

Um ponto chave limitante da biosíntese de colesterol é a inibição da enzima HMG CoA-R (Yamane *et al.*, 2011). O tratamento com ASE associado ou não ao exercício físico diminuiu a expressão da HMG CoA-R. Nós sugerimos que este efeito esteja contribuindo para a redução da produção de colesterol, corroborando com os dados encontrados neste estudo. Dados recentes demonstraram que a curcumina tem efeitos similares aos das estatinas, classe de fármacos utilizados para o tratamento de elevações nos níveis séricos do colesterol. Este polifenol atua reduzindo a biossíntese de colesterol no fígado por inibir direta ou indiretamente a HMG CoA-R (Zingg *et al.*, 2013), sugerimos que o ASE também esteja atuando por essa via. Este efeito do ASE é de grande importância, uma vez que, as drogas



hipolipidêmicas sintéticas, como as estatinas, apresentam muitos efeitos adversos (Song *et al.*, 2014).

Dentro deste contexto, a MTP é uma proteína residente do retículo endoplasmático que atua no transporte de lipídeos neutros para cadeias polipeptídicas nascentes ApoB, um passo limitante na montagem e secreção de VLDL e dos triglicerídeos (Choi and Ginsberg, 2011). Nós observamos que a expressão dessa proteína foi aumentada nos animais dos grupos DS e DT. Outros estudos reportaram uma elevação da transcrição gênica de MTP em ratos ob/ob, modelo de DM2, sugerindo que este efeito possa refletir uma tentativa do fígado de evitar o acúmulo excessivo de triglicerídeos (Bartels *et al.*, 2002). A administração do ASE associada ao exercício em animais diabéticos do tipo 2 reduziu a expressão da MTP, corroborando com estudos que demonstraram que componentes polifenólicos, como naringenina, reduzem a atividade e a expressão dessa proteína em cultura de células de hepatócitos humanos (Wilcox *et al.*, 2001), reduzindo a acumulação de lipídeos neutros no lúmen microssomal e posterior lipidação e secreção de Apo B (Borradaile *et al.*, 2003a). Isto sugere que este provavelmente seja o principal mecanismo responsável pela redução dos níveis plasmáticos de lipídeos em roedores (Borradaile *et al.*, 2003b).

Em adição, a eliminação do colesterol do organismo pela via biliar, que ocorre através da ação dos transportadores ABCG5 e ABCG8 (Graf *et al.*, 2002) é outro caminho que pode estar contribuindo para a redução dos níveis séricos e hepáticos do colesterol. A administração do ASE associada ao exercício físico ocasionou o aumento da expressão do transportador ABCG8 em animais diabéticos do tipo 2. Estudo recente demonstrou que animais submetidos à dieta hiperlipídica suplementada com 2% de polpa de açaí eleva a expressão do RNAm dos transportadores ABCG5 e ABCG8, sugerindo que o aumento desses transportadores é um dos possíveis mecanismos para explicar a redução da concentração sérica de colesterol e o aumento da excreção fecal do mesmo (de Souza *et al.*, 2012).

Eising *et al.*, mostraram que a atividade física não afeta os lipídeos hepáticos e a atividade da HMG CoA-R no fígado de cobais, em contraste aos seus efeitos induzidos no plasma. Também tem sido reportado um aumento da excreção fecal de colesterol em animais que treinam (Meissner *et al.*, 2011; Côté *et al.*, 2013). Estes efeitos podem potencializar as ações do ASE sobre a redução dos lipídeos séricos e hepáticos em animais diabéticos do tipo 2.

Até o presente momento não estava esclarecido as possíveis vias pelas quais o ASE atuava promovendo a redução do perfil lipídico, os dados anteriormente citados, possibilitam uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito hipolipidêmico do ASE, oferecendo uma possibilidade para a utilização terapêutica desse extrato no tratamento da dislipidemia.

O fígado é um órgão que desempenha importante papel no metabolismo energético. A NAFLD, que acomete esse órgão, é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos, resultando em esteatose e inflamação hepática (Tarantino *et al.*, 2010), alterações essas associadas à resistência à insulina (Unger, 2003; Qureshi e Abrams, 2007) presente no DM2. A hipoadiponectinemia é uma característica clínica da NAFLD, geralmente associada ao quadro de resistência à insulina. O papel crítico desse hormônio foi reforçado por um estudo demonstrando esteatose hepática espontânea em camundongos deficientes de adiponectina (Zhou *et al.*, 2008). A resistência à leptina desenvolvida no DM2 também possui um papel de destaque na NAFLD, pois contribui para uma maior inibição no fígado da via AMPK-ACC ocasionando desordens metabólicas neste órgão e sistêmicas (Yi *et al.*, 2013). Os metabólitos derivados de lipídeos desencadeiam a geração de espécies reativas de oxigênio (Schultz *et al.*, 2012), que podem promover disfunção mitocondrial, ativação da NADPH oxidase (Poniachik *et al.*, 2006) e indução do citocromo hepático (microsomal peroxissomal CYP2E1) (Schattenberg *et al.*, 2005) estimulando respostas imunes, que ocasionam inflamação, acúmulo de triglicerídeos, produção de colágeno e a progressão da doença hepática (Videla *et al.*, 2004).

Em conjunto, os resultados apresentados neste estudo, contribuem para o desenvolvimento da esteatose hepática em animais diabéticos do tipo 2, resultados estes que corroboram com dados da literatura (Xing *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2009). O tratamento com ASE associado ou não ao exercício físico reduz a esteatose nos grupos diabéticos, porém este efeito é mais promissor quando os tratamentos estão associados, pois podemos observar que o exercício amplifica o potencial do ASE de reduzir a área de acúmulo lipídico. Sugerimos que os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do ASE estejam relacionados ao seu potencial hipoglicemiante e de aumento da sensibilidade à insulina (de Oliveira *et al.*, 2010), através do aumento da ativação da cascata de sinalização da insulina culminado com a translocação do Glut-4 para a membrana celular aumentando a captação de glicose como demonstrado neste estudo. Suas propriedades anti-inflamatórias (de Moura *et al.*, 2011;

Moura *et al.*, 2012), uma vez que as citocinas pró-inflamatórias estão relacionados com a inativação do IRS (Asrih e Jornayvaz, 2013) e níveis plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$  têm sido associados à formação de fibrose hepática em pacientes com NAFLD avançada (Lesmana *et al.*, 2009), dentre outros efeitos. O extrato também contribui para o aumento da expressão da adipocina adponectina, demonstrado neste estudo, proteína que se mostra reduzida na inflamação presente no DM2 e que possui importantes propriedades sensibilizadoras da insulina e anti-inflamatórias. Seu potencial antioxidante (Rocha *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; de Moura *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012; da Costa *et al.*, 2012; de Bem *et al.*, 2014) atuando contra o estresse oxidativo encontrado neste trabalho e o efeito hipolipidêmico (de Oliveira *et al.*, 2010), como demonstrado anteriormente, alterando o perfil lipídico de forma benéfica. Todas essas propriedades do ASE auxiliam no combate da esteatose hepática, efeito este demonstrado pela primeira vez em nosso estudo.

Além de outros efeitos anteriormente citados, o exercício também promove o aumento do conteúdo de adiponectina (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011; Schultz *et al.*, 2012) quando associado ao ASE como demonstrado em nosso estudo. Possui propriedades anti-inflamatórias (Teixeira de Lemos *et al.*, 2011), hipolipidêmicas e ocasiona o aumento da sensibilidade à insulina como demonstrado pelo aumento da expressão do Glut-4 (Liang *et al.*, 2012), efeitos esses que potencializam o efeito do tratamento com ASE sobre a redução da esteatose hepática.

## CONCLUSÃO

O tratamento com ASE promove efeitos benéficos sobre as alterações ocasionadas pelo Diabetes Mellitus do tipo 2. Demonstramos também que a associação do exercício físico ao tratamento potencializou os efeitos do ASE em muitos dos parâmetros estudados. A ação anti-hiperglicêmica, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias induzidas pelo ASE devem contribuir para o potencial terapêutico do extrato. Estes estudos pré-clínicos abrem uma possibilidade para a administração oral do ASE no tratamento do diabetes.

## REFERÊNCIAS

- Abe T, Hirasaka K, Kohno S, Ochi A, Yamagishi N, Ohno A, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b and obesity-induced insulin resistance. *Endocr J.* 2014; 61: 529-538.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Akkati S, Sam KG, Tungha G. Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol.* 2011; 51: 796-804.
- Alberti KGMM, Zimmet PZ, for the World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO. 1999.
- Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1436:151-164.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013; 36: 67-74.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1221-1231.
- Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr Mol Med.* 2005; 5: 333-339.
- Asrih M, Jornayvaz FR. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol.* 2013; 218: 25-36.
- Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem.* 2013; 24: 1777-1789.
- Badawi A, Klip A, Haddad P, Cole DE, Bailo BG, El-Sohehy A, Karmali M. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2010; 3: 173-186.
- Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50: 291-303.
- Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28: 783-789.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1982; 32: 131-138.

Bardini G, Rotella MC, Giannini S. Dyslipidemia and Diabetes: Reciprocal Impact of Impaired Lipid Metabolism and Beta-Cell Dysfunction on Micro- and Macrovascular Complications. *Rev Diabet Stud.* 2012; 9: 82-93.

Bartels ED, Lauritsen M, Nielsen LB. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes.* 2002; 51: 1233-1239.

Bartels ED, Lauritsen M, Nielsen LB. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes.* 2002; 51: 1233-1239.

Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: 685-692.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17: 4-12.

Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998; 7: 59-62.

Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008; 6: 343-368.

Berg KE, Tian H, Graf GA, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000; 290: 1771-1775.

Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR 3rd, Young LH, Shulman GI. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes.* 2001; 50: 1076-1082.

Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002, 43: 1363-1379.

Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2005; 511: 53-64.

Bobbio FO, Druzian JL, Abrão PA, Bobbio PA, Fadelli S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterp oleracea* Mart). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2000; 20: 388-390.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002; 3:14-23.

- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46, 3–10.
- Bonora E. Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 74-83.
- Borradaile NM, de Dreu LE, Barrett PHR, Behrsin CD, Huff MW. Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. *Biochemistry*. 2003a; 42: 1283-1291.
- Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, dependent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes*. 2003b; 52: 2554-2561.
- Bosi PL, Carvalho AM, Contrera D, Casale G, Pereira MA, Gronner M, Diogo TM, Torquato MTCG, Oishi J, Leal AMO, Prevalência de diabetes mellitus e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53: 726-732.
- Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis*. 2004; 8: 639-671.
- Brady MJ, Bourbonais FJ, Saltiel AR. The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 1998; 273: 14063-14066.
- Brinkmann C, Schwinger RH, Brixius K. Physical activity and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients: the role of nitric oxide and oxidative stress. *Wien Med Wochenschr*. 2011; 161: 305-314.
- Brondum E, Kold-Petersen H, Nilsson H, Flyvbjerg A, Aalkjaer C. Increased contractility to noradrenaline and normal endothelial function in mesenteric small arteries from theGoto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *J Physiol Sci*. 2008; 58: 333-339.
- Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 2008; 7: 95-96.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89: 331-340.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-820.
- Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 4: 798-808.
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005; 42: 987-1000.

Bunker AK, Arce-Esquivel AA, Rector RS, Booth FW, Ibdah JA, Laughlin MH. Physical activity maintains aortic endothelium-dependent relaxation in the obese type 2 diabetic OLETF rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: 1889-1901.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000; 87: 840.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*. 2005; 68: 26-36.

Callera GE, Yeh E, Tostes RC, Caperuto LC, Carvalho CR, Bendhack LM. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2004; 141: 1151-1158.

Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation*. 2002; 106: 1783-1787.

Cardillo C, Nambi SS, Kilcoyne CM, Choucair WK, Katz A, Quon MJ, Panza JA. Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. *Circulation*. 1999; 100: 820-825.

Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32: 55-59.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes*. 1997; 46: 1950-1957.

Case N, Thomas J, Sen B, Styner M, Xie Z, Galior K, Rubin J. Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *J Biol Chem*. 2011; 286: 39450-39456.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 1985; 100:126-131.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch*. 2011; 459: 477-485.

Chan DC, Watts GF, Ng TW, Hua J, Song S, Barret PH. Measurement of liver fat by magnetic resonance imaging: relationships with body distribution, insulin sensitivity and plasma lipids in healthy men. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 698-702.

Chen K, Li G, Geng F, Zhang Z, Li J, Yang M, Dong L, Gao F. Berberine reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via activating AMPK and PI3K-Akt signaling in diabetic rats. *Apoptosis*. 2014; 19: 946-57.

Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22: 353-363.



Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, Mandarino LJ. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. 2004; 53: 1233-1242.

Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, Braun B. American College of Sports Medicine; American Diabetes Association. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care*. 2010; 33: 147-67.

Côté I, Ngo Sock ET, Lévy É, Lavoie JM. An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr*. 2013; 52: 1523-1532.

Craig BW, Hammons GT, Garthwaite SM, Jarett L, Holloszy JO. Adaptation of fat cells to exercise: response of glucose uptake and oxidation to insulin. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1981; 51: 1500-1506.

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: 785-789.

Curin Y, Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*. 2005; 57: 97-107.

da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Dos Santos Valença S, Pires KM, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012; 385: 1199-209.

da Nobrega AC. The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005; 33: 84-87.

de Bem GF, da Costa CA, de Oliveira PR, Cordeiro VS, Santos IB, de Carvalho LC, Souza MA, Ognibene DT, Daleprane JB, Sousa PJ, Resende AC, de Moura RS. Protective effect of Euterpe oleracea Mart. (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. *J Pharm Pharmacol*. 2014; 66: 1328-1338.

de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*. 2010; 100: 525-534.

de Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, Sousa PJ, da Silva AJ, Porto LC, Valença SS. Addition of açai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49: 855-863.

de Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, de Cavalho LC, de Souza MA, de Lemos Neto M, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. 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*. 2010; 56: 619-626.

de Souza MO, Souza E Silva L, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. The hypocholesterolemic activity of açai (*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: 976-984.

DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol.* 2011; 108: 3-24.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care.* 1992 ; 15: 318-368.

Delbin MA, Trask AJ. The diabetic vasculature: physiological mechanisms of dysfunction and influence of aerobic exercise training in animal models. *Life Sci.* 2014; 102: 1-9.

Deng YT, Chang TW, Lee MS, Lin JK. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 1059-1066.

Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie.* 2005; 87: 81-86.

Di Leo E, Lancellotti S, Penacchioni JY, et al. Mutations in MTP gene in abetaand hypobeta-lipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 2005; 180: 311-318.

Dinh CH, Szabo A, Camer D, Yu Y, Wang H, Huang XF. Bardoxolone methyl prevents fat deposition and inflammation in the visceral fat of mice fed a high-fat diet. *Chem Biol Interact.* 2015. Article in press.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

Dong H, Wang JH, Lu FE, Xu LJ, Gong YL, Zou X. Jiaotai Pill enhances insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in skeletal muscle of diabetic rats. *Chin J Integr Med.* 2013; 19: 668-674.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 421-431.

Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010; 59: 459-469.

Eguchi K, Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2013; 15: 152-158.

Eid HM, Lyberg T, Arnesen H, Seljeflot I. Insulin and adiponectin inhibit the TNFalpha-induced ADMA accumulation in human endothelial cells: the role of DDAH. *Atherosclerosis.* 2007; 194: 1-8.

Embrapa. [Internet] [acesso em 2012 abr 2]. Disponível em: [http://www.embrapa.br/noticias/banco\\_de\\_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra-\\_noticia](http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra-_noticia).

Emiliano AF, de Cavalho LC, da Silva Cristino Cordeiro V, da Costa CA, de Oliveira PB, Queiroz EF, Col Moreira DD, Boaventura GT, de Moura RS, Resende AC. 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: 319-328.

Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2039-2044.

Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 2: 83-92.

Ferreira AL, Matsubara LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Méd Brasil.* 1997; 43: 61-68.

Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 6384-6390.

Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda).* 2013; 28: 330-358.

Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly.* 2010; 1-12.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 114-121.

Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry.* 1957; 226: 497-509.

Forcheron F, Abdallah P, Basset A, del Carmine P, Haffar G, Beylot M. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17: 1381-1389.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341: 454-457.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 847-850.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763–770

Friigolet ME, Torres N, Tovar AR J. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *Nutr Biochem*. 2013; 24: 2003-2015.

Fröjdö S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792: 83-92.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.

Furuta M, Yano Y, Gabazza EC, Araki-Sasaki R, Tanaka T, Katsuki A, Hori Y, Nakatani K, Sumida Y, Adachi Y. Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002; 56: 159-171.

Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). *Cromatografia*. 2004; 59: 739-743.

Gandhi GR, Stalin A, Balakrishna K, Ignacimuthu S, Paulraj MG, Vishal R. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR $\gamma$  and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830: 2243-2255.

Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2004; 18: 2024-2034.

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, Nieman DC, Swain DP; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011; 43: 1334-1359.

Godoy-Matos AF de. Síndrome metabólica. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 1995; 95: 2195-204.

Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, et al. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 2002; 110: 659-669.

Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22: 394-403.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum S. Analyses of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126: 131-138.

- Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, Edwards JG. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2008; 7: 34.
- Grossman E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? *Diabetes Care*. 2008; 31: 185-189.
- Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Investig*. 1996; 97: 2152–2157.
- Guo H, Xia M, Zou T, Ling W, Zhong R, Zhang W. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *J Nutr Biochem*. 2012; 23: 349-360.
- Guo R, Liu B, Zhou S, Zhang B, Xu Y. The protective effect of fasudil on the structure and function of cardiac mitochondria from rats with type 2 diabetes induced by streptozotocin with a high-fat diet is mediated by the attenuation of oxidative stress. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 430791.
- Guo Z, Zheng C, Qin Z, Wei P. Effect of telmisartan on the expression of cardiac adiponectin and its receptor 1 in type 2 diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2011; 63: 87-94.
- Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007; 3: 853-876.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). Oxford University Press. 1999.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997; 2153-2157.
- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39:1423-1434.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001; 2: 239-254.
- Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1203: 120-125.
- Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev*. 1995; 75: 47-76.
- Hinder LM, Vivekanandan-Giri A, McLean LL, Pennathur S, Feldman EL. Decreased glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates coincide with peripheral nervous system oxidative stress in a murine model of type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 2013; 216:1-11.

- Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1984; 56: 831-838.
- Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF, Dela F. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: 294-305.
- Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30: 1091-1095.
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1543-1549.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259: 87-91.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006; 440: 944-948.
- Hu C, Su Q, Li F, Zhang G, Sun D, Han H, Liu S, Hu S. Duodenal-jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM rat model. *Obes Surg.* 2014; 24: 1453-1462.
- Ibrahim MA, Islam MS2. Anti-diabetic effects of the acetone fraction of *Senna singueana* stem bark in a type 2 diabetes rat model. *J Ethnopharmacol.* 2014; 153: 392-399.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 9265-9269.
- Ishak NA, Ismail M, Hamid M, Ahmad Z, Abd Ghafar SA. Antidiabetic and Hypolipidemic Activities of *Curculigo latifolia* Fruit:Root Extract in High Fat Fed Diet and Low Dose STZ Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 601838.
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999; 99: 3092-3095.
- Iyer A, Fairlie DP, Prins JB, Hammock BD, Brown L. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6:71-82.
- Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222: 283-292.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 1990; 268: 69-71.
- Jørgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaulont S, Neuffer PD, Richter EA, Pilegaard H. Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J.* 2005; 19:1146-1148.

Jornayvaz FR, Shulman GI. Diacylglycerol activation of protein kinase C $\epsilon$  and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* 2012; 15: 574-584.

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: 6184-6223.

Kägi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1997; 186: 989-997.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Investig.* 2000, 106: 473-481.

Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS, Garner CC, Lienhard GE. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22115-22118.

Kanzanki M, Mora S, Hwang JB, Saltier AR, Pessin JE. Atypical protein kinase C is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol.* 2004; 164: 279-290.

Kesavanarayanan KS, Sathiya S, Kalaivani P, Ranju V, Sunil AG, Saravana Babu C, Kavimani S, Prathiba D. DIA-2, a polyherbal formulation ameliorates hyperglycemia and protein-oxidation without increasing the body weight in type II diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013; 17: 356-369.

Kielstein JT, Becker B, Graf S, Brabant G, Haller H, Fliser D. Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2003, 42: 62-66.

Kim MJ, Ryu GR, Chung JS, Sim SS, Min DS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH. Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. *Pancreas.* 2003; 26: 292-299.

King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 2008; 79: 1527-1534.

Klip A, Ramlal T, Young DA, Holloszy JO. Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett.* 1987; 224: 224-230.

Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004; 11: 1041-1064.

Konrad RJ, Kudlow JE. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med.* 2002; 10: 535-539.

Kouidhi S, Jarboui S, Clerget Froidevaux MS, Abid H, Demeneix B, Zaouche A, Benammar Elgaaid A, Guissouma H. Relationship between subcutaneous adipose tissue expression of leptin and obesity in Tunisian patients. *Tunis Med.* 2010; 88: 569-572.

Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, Medlow P, Davison G, Susta D, Boreham C, Newsholme P, O'Donnell M, Murphy C, De Vito G. The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. *Eur J Appl Physiol.* 2014; 114: 251-260.

Kuriyama H, Yamashita S, Shimomura I, et al. Enhanced expression of hepatic acyl-coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. *Hepatology.* 1998; 27: 557-562.

Lally S, Tan CY, Owens D, Tomkin GH. mRNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann Pick C1-like 1, ABCG5 and G8 and microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia.* 2006; 49: 1008-1016.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001; 12: 455-461.

Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2011; 46: 200-215.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 2013, 34: 1-11.

Lee S, Park Y, Zhang C. Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice. *Am J Biomed Sci.* 2011; 3: 241-252.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008; 51: 216-226.

Lesmana CR, Hasan I, Budihusodo U, Gani RA, Krisnuhoni E, Akbar N, Lesmana LA. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis.* 2009; 10: 201-206.

Levine RI, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 464-478.

Liang Y, Sheng S, Fang P, Ma Y, Li J, Shi Q, Sui Y, Shi M. Exercise-induced galanin release facilitated GLUT4 translocation in adipocytes of type 2 diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 100: 554-559.

Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of diponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 219: 9-15.

Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev.* 2005; 6: 13-21.



- Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002; 106: 987-992.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2005; 280: 4617-4626.
- Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: 1668-1678.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.
- Loukides S, Bakakos P, Kostikas K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets*. 2011; 12: 469-477.
- Lu CW, Xiong Y, He P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 overexpression improves impaired nitric oxide synthesis of endothelial cells induced by glycated protein. *Nitric Oxide*. 2007; 16: 94-103.
- Lu YX, Zhang Q, Li J, Sun YX, Wang LY, Cheng WM, Hu XY. Antidiabetic effects of total flavonoids from *Litsea Coreana* leave on fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Am J Chin Med*. 2010; 38: 713-725.
- Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med*. 2009; 15: 846-847.
- Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014; 7: 55-64.
- Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascul Pharmacol*. 2011; 54: 68-74.
- Malerbi D, Franco LJ. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30 a 69 years. *Diabetes Care*. 1992; 15: 1509-1516.
- Malin SK, Solomon TP, Blaszczyk A, Finnegan S, Filion J, Kirwan JP. Pancreatic  $\beta$ -cell function increases in a linear dose-response manner following exercise training in adults with prediabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 305: 1248-1254.
- Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol*. 2005; 96:13-24.

- Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16: 77-84.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17: 24-38.
- Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: Effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2012; 49: 9-17.
- Masella R, Di Benedetto R, 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: 577-586.
- Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2014; pii: 1388-1981.
- Matheus ME, de Oliveira Fernandes SB, Silveira CS, Rodrigues VP, de Sousa Menezes F, Fernandes PD. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107: 291-296.
- Matsuura C, Brunini TM, Carvalho LC, Resende AC, Carvalho JJ, de Castro JP, Mendes-Ribeiro AC. Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine-NO pathway and vascular reactivity. *J Am Soc Hypertens*. 2010; 4: 7-13.
- Mattacks CA, Pond CM. Interactions of noradrenalin and tumour necrosis factor alpha, interleukin 4 and interleukin 6 in the control of lipolysis from adipocytes around lymph nodes. *Cytokine*. 1999; 11: 334-346.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-435.
- Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med* 2006; 6: 501-514.
- Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J*. 2000; 349: 353-356.
- Meissner M, Lombardo E, Havinga R, Tietge UJ, Kuipers F, Groen AK. Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*. 2011; 218: 323-329.
- Misra A, Alappan NK, Vikram NK, Goel K, Gupta N, Mittal K, Bhatt S, Luthra K. Effect of supervised progressive resistance-exercise training protocol on insulin sensitivity, glycemia, lipids, and body composition in Asian Indians with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1282-1287.
- Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27: 88-94.

- Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors*. 1999; 10: 157-167.
- Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014; 7: 25-34.
- Moraes AS de, Freitas ICM de, Gimeno SGA e Mondini L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. *Cad Saúde Pública*. 2010; 26: 929-941.
- Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, Souza PJ, Silva AJ, Borges RM, Porto LC, Valença SS. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012; 19: 262-269.
- Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*. 2001; 7: 1085-1094.
- Mueckler M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes*. 1990; 39: 6-11.
- Munir KM, Chandrasekaran S, Gao F, Quon MJ. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 305: 679-686.
- Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Nagasawa A, Tokimitsu I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: 708-715.
- Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290: 1550-1556.
- Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57: 881-887.
- Nakazato K, Song H, Waga T. Dietary apple polyphenols enhance gastrocnemius function in Wistar rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39: 934-940.
- Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev*. 2006; 27: 242-259.
- Niu Y, Yuan H, Fu L. Aerobic exercise's reversal of insulin resistance by activating AMPK $\alpha$ -ACC-CPT1 signaling in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010; 20: 370-380.

- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J: Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn.* 1990a; 13: 259-262.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J: Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* 1990b; 127: 161-165.
- Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10: 338-345.
- Osawa H, Yamada K, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Kawata H, Nishimiya T, Niiya T, Shimizu I, Nishida W, et al. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 678-686.
- Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, Hori O, Yamasaki Y, Ogawa S. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: 657-663.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004; 306: 457-461.
- Ozturk Y, Atlan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.* 1996; 48: 69-112.
- Paravicini T, Touyz R. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31: 170-180.
- Parveen K, Khan MR, Mujeeb M, Siddiqui WA. Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2010; 186: 219-227.
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR $\gamma$  activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 300: 472-476.
- Päth G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2281-2288.
- Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* 1998; 41: 1241-1248.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP- ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20: 171-181.

- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol*. 2012; 46: 272-284.
- Poniachik J, Csendes A, Díaz JC, Rojas J, Burdiles P, Maluenda F, Smok G, Rodrigo R, Videla LA. Increased production of IL-1alpha and TNF-alpha in lipopolysaccharide-stimulated blood from obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*. 2006; 33: 252-257.
- Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes & Metabolism* 2004; 30: 398-408.
- Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*. 2008; 34: 643-648.
- Posuwan J, Prangthip P, Leardkamolkarn V, Yamborisut U, Surasiang R, Charoensiri R, Kongkachuichai R. Long-term supplementation of high pigmented rice bran oil (*Oryza sativa* L.) on amelioration of oxidative stress and histological changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet; Riceberry bran oil. *Food Chem*. 2013; 138: 501-508.
- Powell K. obesity: the two faces of fat. *Nature*. 2007; 447: 525-527.
- Pozo-Insfran DD, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 1539-1545.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286: 327-334.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal*. 2010; 8: e002.
- Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50: 794-800.
- Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS. Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes*. 2006; 55: 3083-3090.
- Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 3540-3553.
- Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2007; 45: 51-62.
- Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC, Darley-Usmar V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Rad Biol Med*. 2002; 33: 1465-1434.
- Ramalingam L, Oh E, Thurmond DC. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 2815-2834.

- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992; 70: 593-599.
- Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.* 1983; 9: 281-296.
- Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3: 46-56.
- Raza H, John A, Howarth FC. Increased metabolic stress in Zucker diabetic fatty rat kidney and pancreas. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32: 1610-1620.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-1951.
- Resende AC, Ballejo G, Leite R, Salgado COM. Role of NO-dependent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. *Pharmacol Rev Commun.* 1997; 9: 269-278.
- Resende AC, Emiliano AF, Cordeiro VS, de Bem GF, de Cavalho LC, de Oliveira PR, Neto ML, Costa CA, Boaventura GT, de Moura RS. 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: 2119-2126.
- Rocha AP, Resende AC, Sousa MVA, Carvalho LCRM, Sousa PJC, Tano T, Criddle DN, Porto LC, Valença SS, Soares de Moura R. Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe Oleracea* Mart. (Açaí). *J Pharmacol Toxicol.* 2008; 3: 435-448.
- Rocha APM, Carvalho LCRM, Sousa MVA, Madeira SVF, Sousa PJC, Tano T, Schini-Kerth VB, Resende AC, Soares de Moura R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol.* 2007; 46: 97-104.
- Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press. 1991; 151-170.
- Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45777-45784.
- Rouyer O, Zoll J, Daussin F, Damgé C, Helms P, Talha S, Rasseneur L, Piquard F, Geny B. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Physiol.* 2007; 92: 1047-1056.
- Sachidanandam K, Hutchinson JR, Elgebaly MM, Mezzetti EM, Dorrance AM, Motamed K, Ergul A. Glycemic control prevents microvascular remodeling and increased tone in type 2 diabetes: link to endothelin-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296: 952-959.

- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414:799-806.
- Sampath S, Narasimhan A, Chinta R, Nair KR, Khurana A, Nayak D, Kumar A, Karundevi B. Effect of homeopathic preparations of *Syzygium jambolanum* and *Cephalandra indica* on gastrocnemius muscle of high fat and high fructose-induced type-2 diabetic rats. *Homeopathy*. 2013; 102: 160-171.
- Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem*. 2003; 278: 14599-14602.
- Sato Y, Nagasaki M, Nakai N, Fushimi T. Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med*. 2003; 228: 1208-1212.
- Schäfer A, Högger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 77: 41-46.
- Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280: 9887-9894.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes*. 1994; 43: 1326-1333.
- Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol*. 2012; 64: 273-82.
- Scott JA, King GL. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1031: 204-13.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278: 13740-13746.
- Seo E, Park EJ, Joe Y, Kang S, Kim MS, Hong SH, Park MK, Kim DK, Koh H, Lee HJ. Overexpression of AMPKalpha1 Ameliorates Fatty Liver in Hyperlipidemic Diabetic Rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009; 13: 449-454.
- Sharma AK, Bharti S, Goyal S, Arora S, Nepal S, Kishore K, Joshi S, Kumari S, Arya DS. Upregulation of PPAR $\gamma$  by *Aegle marmelos* ameliorates insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction in high fat diet fed-streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *Phytother Res*. 2011; 25: 1457-1465.
- Shelness GS, Ledford AS. Evolution and mechanism of apolipoprotein Bcontaining lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16: 325-332.
- Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 2498-2502.

- Shimizu M, Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Miyamoto Y. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactors*. 2000; 13: 61-65.
- Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N, Kikkawa R. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub><sup>-</sup> imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*. 1999; 48: 2437-2445.
- Sigal RJ, Kenny GP, Boulé NG, Wells GA, Prud'homme D, Fortier M, Reid RD, Tulloch H, Coyle D, Phillips P, Jennings A, Jaffey J. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007; 147: 357-369.
- Sjöholm A, Nyström T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22: 4-10.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol. Metab*. 2007; 92: 1023-1033.
- Slentz CA, Tanner CJ, Bateman LA, Durham MT, Huffman KM, Houmard JA, Kraus WE. Effects of exercise training intensity on pancreatic beta-cell function. *Diabetes Care*. 2009; 32: 1807-1811.
- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*. 2002; 54: 1515-1520.
- Soares de Moura R, da Costa GF, Moreira AS, Queiroz EF, Moreira DD, Garcia-Souza EP, Resende AC, Moura AS, Teixeira MT. *Vitis vinifera* L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol*. 2012; 64: 268-276.
- Soares de Moura R, Miranda DZ, Pinto ACA, Sicca RF, Souza MAV, Rubenich LMS, Carvalho LCRM, Rangel BM, Tano T, Madeira SVF, Resende AC. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and antihypertensive effect of brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44: 302-309 (b).
- Soares de Moura R, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia ML, de Carvalho LC. The role of bradykinin, AT<sub>2</sub> and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol*. 2004; 141: 860-866 (a).
- Sofue M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J: Uptake of nicotinamide by rat pancreatic beta cells with regard to streptozotocin action. *J Endocrinol*. 1991; 131: 135-138.
- Song C, Huang X, Lu K, Peng M, Yu S, Fang N. The rationality of the hypolipidemic effect of *alismatis rhizoma* decoction, a classical chinese medicine formula in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice. *Iran J Pharm Res*. 2014; 13: 641-649.



- Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007; 125: 451-472.
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005; 52: 313-320.
- Stanley CP, Wheal AJ, Randall MD, O'Sullivan SE. Cannabinoids alter endothelial function in the Zucker rat model of type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2013; 720: 376-382.
- Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology.* 2010; 51, 1820-1832.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2009; 89: 1025-1078.
- Stepp DW, Frisbee JC. Augmented adrenergic vasoconstriction in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: 816-820.
- Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 1569-1575.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500: 299-313.
- Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(3-4):243-70.
- Strasser B, Pesta D. Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 805217.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005; 365: 1333-1346.
- Sugano M, Yamato H, Hayashi T, Ochiai H, Kakuchi J, Goto S, Nishijima F, Iino N, Kazama JJ, Takeuchi T, Mokuda O, Ishikawa T, Okazaki R. High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16: 477-484.
- Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.* 2003; 3: 276-284.
- Sun W, Bi Y, Liang H, Cai M, Chen X, Zhu Y, Li M, Xu F, Yu Q, He X, Ye J, Weng J. Inhibition of obesity-induced hepatic ER stress by early insulin therapy in obese diabetic rats. *Endocrine.* 2011; 39: 235-41.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50: 537-546.
- Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis,

oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2013; 715: 246-255.

Tahergorabi Z, Khazaei M. The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA Atheroscler.* 2013; 9: 247-253.

Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Possible involvement of Akt activity in endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106: 600-608.

Tan BK, Tan CH, Pushparaj PN. Anti-diabetic activity of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in high fat diet fed-streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2005; 76: 2827-2839.

Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(38):4773-83.

Teixeira de Lemos E, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J, Mascarenhas-Melo F, Páscoa-Pinheiro J, Teixeira F, Reis F. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2011; 2011: 253061.

Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol.* 1990; 259: 279-285.

Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 1997; 46: 1733-1742.

Touyz R, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Res.* 2011; 34: 5-14.

Touyz RM, Schiffrin EL. AngII-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 34: 976-982.

Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7: 1302-1314.

Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: Whats is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44: 248-252.

Trevenzoli IH, Pinheiro CR, Conceição EP, Oliveira E, Passos MC, Lisboa PC et al. Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 2010; 298: 941-92010.

Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycaemic control with diet, sulphonylurea, metformin or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies. *JAMA.* 1999; 281: 2005-2012.

Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J*. 2011; 10: 45.

Umpierre D, Ribeiro PA, Kramer CK, Leitão CB, Zucatti AT, Azevedo MJ, Gross JL, Ribeiro JP, Schaan BD. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011; 305: 1790-1799.

Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14: 398-403.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44-84.

Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22: 98-107.

Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010; 211: 353-60.

Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Resistin: A new link between obesity and insulin resistance? *Clin Endocrinol*. 2001; 55: 437-438.

Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G, Thielemann L, Poniachik Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Clin Sci (Lond)*. 2004; 106: 261-268.

Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol*. 2006; 574: 41-53.

Vivekanadan-Giri A, Wang JH, Byun J, Pennathur S. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008; 9: 275-287.

Wadley GD, McConell GK. Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2007; 102: 314-320.

Wang C, Li J, Lv X, Zhang M, Song Y, Chen L, Liu Y. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. *Eur J Pharmacol*. 2009; 620: 131-137.

Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, Bapat P, Kwun I, Shen CLJ. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *Nutr Biochem*. 2014; 25: 1-18.

Watson RT, Pessin J. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*. 2001; 56: 175-194.

- Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2006; 281: 35137-35146.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1111-1119.
- Welsh N, Sandler S: Protective action by hemin against interleukin-1 beta induced inhibition of rat pancreatic islet function. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 103: 109-114.
- Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* 2003; 20: 255-268.
- Wilcox LJ, Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MWJ. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *Lipid Res.* 2001; 42: 725-734.
- Witczak CA, Sturek M. Exercise prevents diabetes-induced impairment in superficial buffer barrier in porcine coronary smooth muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2004; 96: 1069-1079.
- Wolf G. Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue. *Nutr Rev.* 2004; 62: 389-394.
- Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J.* 1987; 245: 243-250.
- World Health Organization (WHO). 2011; fact sheet n°312.
- World Health Organization. Diabetes: the cost of diabetes. WHO fact sheet. September 2002, n. 236.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98: 115-124.
- Xing XH, Zhang ZM, Hu XZ, Wu RQ, Xu C. Antidiabetic effects of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. gum, a novel food additive in China, on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125: 410-416.
- Yamagishi S, Ueda S, Nakamura K, Matsui T, Okuda S. Role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in diabetic vascular complications. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 2613-2618.
- Yamane T, Kobayashi-Hattori K, Oishi Y. A high-fat diet reduces ceramide synthesis by decreasing adiponectin levels and decreases lipid content by modulating HMG-CoA reductase and CPT-1 mRNA expression in the skin. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 2: 186-192.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002; 8: 1288-1295.

- Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun C, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Lee CH, Manning BD. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011; 14: 21-32.
- Yi X, Cao S2, Chang B3, Zhao D3, Gao H3, Wan Y3, Shi J3, Wei W3, Guan Y4. Effects of acute exercise and chronic exercise on the liver leptin-AMPK-ACC signaling pathway in rats with type 2 diabetes. *J Diabetes Res.* 2013; 2013: 946432.
- Yousif MH. Phosphoinositide 3-kinase contributes to diabetes-induced abnormal vascular reactivity in rat perfused mesenteric bed. *Cell Biochem Funct.* 2008; 26: 451-458.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews.* 1994; 74: 139-162
- Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, et al. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem.* 2005; 280: 8742 - 8747.
- Yu LF, Qiu BY, Nan FJ, Li J. AMPK activators as novel therapeutics for type 2 diabetes. *Curr Top Med Chem.* 2010; 10(4):397-410.
- Yu XH, Qian K, Jiang N, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2014; 428: 82-88.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998; 32: 488-495.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU et al. Oxidative stress in arterial hypertension: Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001; 38: 1395-1399.
- Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 2000; 101: 1539-1545.
- Zhang BC, Li WM, Li XK, Zhu MY, Che WL, Xu YW. Tesaglitazar ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development in diabetic low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Exp Ther Med.* 2012; 4: 987-992.
- Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhang D, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim.* 2003; 52: 401-407.
- Zhang H, Park Y, Zhang C. Coronary and aortic endothelial function affected by feedback between adiponectin and tumor necrosis factor  $\alpha$  in type 2 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2156-2163.
- Zhang L, Yang J, Chen XQ, Zan K, Wen XD, Chen H, Wang Q, Lai MX. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *J Ethnopharmacol.* 2010; 132: 518-524.

Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. Alteration of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skeletal muscle in a rat model of type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2009; 324: 147-155.

Zhang S, Zhang Q, Zhang L, Li C, Jiang H. Expression of ghrelin and leptin during the development of type 2 diabetes mellitus in a rat model. *Mol Med Rep.* 2013; 7: 223-228.

Zhou M, Xu A, Tam PK, Lam KS, Chan L, Hoo RL, Liu J, Chow KH, Wang Y. Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology.* 2008; 48: 1087-1096.

Zhu CF, Peng HB, Liu GQ, Zhang F, Li Y. Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition.* 2010; 26: 1014-1020.

Zhu KX, Nie SP, Li C, Gong D, Xie MY. Ganoderma atrum polysaccharide improves aortic relaxation in diabetic rats via PI3K/Akt pathway. *Carbohydr Polym.* 2014; 103: 520-527.

Zingg JM, Hasan ST, Meydani M. Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors.* 2013; 39: 101-121.

Zou F, Mao XQ, Wang N, Liu J, Ou-Yang JP. Astragalus polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of AMPK. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30: 1607-1615.

## ANEXO - Comitê de ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/058/2012 sobre “Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e o exercício físico sobre as alterações ocasionadas pelo diabetes tipo 2 induzido pela streptozotocina e dieta hiperlipídica em ratos Wistar”, sob a responsabilidade de Roberto Soares de Moura, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 11/10/2012. Este certificado expira em 11/10/2016.

Rio de Janeiro, 11 de Outubro de 2012.

Prof. Patricia Cristina Lisboa

CEUA/IBRAG/UERJ  
Prof. Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Prof. Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
/ass Matrícula 34765-8

Prof. Israel Felzenszwalb

CEUA/IBRAG/UERJ

(21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br