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

Paola Raquel Braz de Oliveira

Efeito do extrato *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre as alterações metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro
2014

Paola Raquel Braz de Oliveira

Efeito do extrato *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre as alterações metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Angela de Castro Resende

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Rio de Janeiro

2014

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

O48 Oliveira, Paola Raquel Braz de.
Efeito do extrato *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre as alterações metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica / Paola Raquel Braz de Oliveira – 2014.

107 f.

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

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

1. Açaí - Uso terapêutico - Teses. 2. Síndrome metabólica - Teses. 3. Plantas medicinais - Uso terapêutico - Teses. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Fígado gorduroso - Aspectos nutricionais - Teses. 6. Estresse oxidativo - Teses. 7. Camundongos Endogâmicos C57BL - Teses. I. Resende, Angela de Castro. II. Moura, Roberto Soares de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 615.89:613.262

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

_____ _____

Assinatura Data

Paola Raquel Braz de Oliveira

Efeito do extrato *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre as alterações metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica

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

Aprovada em 25 de agosto de 2014.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Angela de Castro Resende (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Ana Luisa Palhares Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro
2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha linda família e aos meus amigos

Porque melhor é a sabedoria do que as jóias; e de tudo o
que se deseja nada se pode comparar com ela.
Provérbios 8:11

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas grandes oportunidades concedidas na minha vida e principalmente por colocar pessoas abençoadas na minha caminhada , que tanto me ajudaram para a realização do meu sonho como o doutorado.

Agradeço a minha orientadora Professora Dr [a]. Angela de Castro Resende pela oportunidade da realização do doutorado, mas principalmente pela pessoa inspiradora, pois conduz suas obrigações com dedicação, amor, respeito e ética.

Agradeço ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro.

Agradeço aos meus pais Solange Monteiro Oliveira de Morais e José Elias de Morais por todo amor ofertado. Eles são minha base, minha inspiração e minha vontade de ir sempre além.

Agradeço a minha amada avó Inês Monteiro de Oliveira por todo sacrifício na vida para me proporcionar uma educação de qualidade e por sempre lembrar que conhecimento é algo que ninguém nos toma.

Agradeço ao meu esposo Rafael Béda Vasconcelos por ser um companheiro dedicado, paciente, amoroso, fiel a Deus e meu grande amigo para TODOS os momentos. Te amo muito minha vida!

Agradeço a minha irmã Viviane Monteiro Oliveira de Morais por todo amor dedicado, pelos meus sobrinhos que trouxeram mais luz, mais inspiração em minha vida. Obrigada por estar comigo sempre e por sermos amigas acima de tudo.

Agradeço em memória a minha mãe Elisa Leme Braz por todo amor dedicado e por ter sido um exemplo de mulher guerreira, honesta e sábia. Saudades!

Agradeço em memória ao meu pai Ozimar Monteiro de Oliveira por me ensinar que não devemos julgar as pessoas por mais tortas que pareçam ser, pois Deus eu seus mandamentos ensina que devemos amar ao próximo como a si mesmo.

Agradeço ao meu amado irmão Pablo Rodrigo Braz de Oliveira pelo amor e pelo cuidado nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus tios Júlio César Leme Braz, Márcio Daniel de Oliveira, Tadeu Leme Braz e Nadia Cristina Leme Braz por todo carinho e amor, principalmente nos momentos que nos parece faltar força.

Agradeço aos meus cunhados Leonardo Beda Vasconcelos, Michelle Vansconcelos e Alexandre Andrioni por todo carinho dedicado a mim.

Agradeço ao Professor Dr^{o}. Roberto Soares de Moura pela grande contribuição através de sua experiência e amplo conhecimento, sempre se mostrando um verdadeiro mestre.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Cristiane Aguiar da Costa, Graziele Freitas de Bem, Izabelle Santos Barcellos, Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Ana Paula Machado da Rocha, Andrea Fernandes Emiliano da Silva, Taline Amaral, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Lúcia Alves, Marcelo Augusto Vieira de Souza, Anict Okinga pela colaboração, pelo carinho e principalmente pela oportunidade de convivência, pois aprendo muito com essas pessoas.

Agradeço a minha amada amiga e comadre Cristiane Aguiar da Costa por todo amor ofertado, pois seu coração puro e sua imensa ajuda me sustentaram INÚMERAS vezes ao longo do doutorado. Não há eternidade para agradecer por tanta benevolência dedicada a minha pessoa. Te amo muito minha amiga!

Agradeço a minha amiga e comadre Andreza Maia Vieira pela grande amizade dedicada ao longo desses 11 anos. Obrigada de coração pelo amor, carinho e compreensão.

Agradeço a minha amiga Graziele Freitas de Bem pelo amor, amizade, orações e pela IMENSA colaboração ao longo do doutorado. Obrigada por ter um coração tão generoso e por sempre estender aos mãos.

Agradeço a amiga Izabelle Barcelos pela imensa ajuda e pelas orações ao longo do doutorado. Obrigada por ser uma pessoa maravilhosa.

Agradeço a Ana Paula Machado da Rocha pela grande colaboração e pelos conselhos ao longo do doutorado.

Agradeço as minhas amigas Lenize Costa dos Reis Marins, Lúcia Alves e Andréa Fernandes Emiliano pelo carinho e amizade. Nunca me esquecerei de vocês, pois moram no meu coração.

Agradeço as minhas amigas Amanda Regina da Fé, Carla Freitas e Natale Figueiredo pela amizade e carinho em todos os momentos.

Agradeço ao meu amigo Acacio Barreto de Mello Neto pela amizade de 17 anos. Obrigada pelo amor que nos uni todo esse tempo.

Agradeço a amiga Ellen Santos pela amizade, pela ENORME colaboração e pela paciência durante o doutorado. Obrigada por tudo.

Agradeço aos amigos do Ginásio Experimental Olímpico pela amizade e cuidado na finalização do meu doutorado.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia pela fundamental colaboração na minha formação e principalmente a coordenadora professora Dr ª.Thereza Christina Barja-Fidalgo pela imensa cooperação na finalização do meu doutorado.

RESUMO

OLIVEIRA, Paola Raquel Braz. **Efeito do extrato *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre as alterações metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica**. 2014. 107 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Evidências crescentes tem demonstrado que uma dieta rica em polifenóis reduz o risco cardiovascular. Nossos estudos sugerem que o extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí (ASE), rico em polifenóis melhora muitos dos aspectos da síndrome metabólica (SM) induzidos por uma dieta hiperlipídica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito preventivo do ASE sobre as alterações do metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Camundongos machos C57BL/6 de 30 dias de idade foram divididos em 4 grupos e receberam as seguintes dietas por 12 semanas: grupo controle (C): dieta padrão; grupo controle+ASE (C+ASE): dieta padrão+ASE; grupo hiperlipídico (H): dieta hiperlipídica; grupo hiperlipídico + ASE (H+ASE): dieta hiperlipídica + ASE. Foram avaliadas: ingestão alimentar, peso corporal, quantidade da massa visceral, níveis de leptina plasmática, glicemia, tolerância à glicose, resistência à insulina, expressão da adiponectina no tecido adiposo epididimal, perfil lipídico plasmático, triglicerídeos e colesterol hepáticos, histologia hepática, glicogênio hepático, expressão de proteínas envolvidas na cascata da insulina (IR, pIRS1, PI3K,pAKT e GLUT2), na síntese de triglicerídeo (SREBP-1c, FAS e pACC) e colesterol (HMG CoA-R e pAMPK) hepáticos e na excreção de colesterol (ABCG5 e ABCG8), danos em lipídeos e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no fígado e tecido adiposo, dosagem de oxidação de proteínas no fígado, expressão da SOD-2 e formação de nitrito hepáticos. O tratamento com ASE reduziu a massa corporal, o consumo alimentar, a tolerância à glicose, a sensibilidade à leptina, esteatose hepática, o acúmulo de colesterol e triglicerídeo hepático, a expressão de proteínas lipogênicas, como: SREBP-1c e da HMG CoA-R e normalizou a sinalização da insulina. Além disso, aumentou sensibilidade à insulina, a expressão de adiponectina no tecido adiposo, da pAMPK, do transportador de colesterol- ABCG8 e apresentou um efeito antioxidante em tecido adiposo e hepático ao diminuir a formação do subproduto da peroxidação lipídica (MDA) e a carbonilação de proteínas e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. Assim, o ASE pode modular a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina, assim como, as envolvidas na via da lipogênese, e na homeostase do colesterol. A síntese de NO, a ação antioxidante e o aumento da sensibilidade à insulina devem exercer um papel central no efeitos do ASE.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. *Euterpe oleracea Mart*. Camundongo C57BL/6. Dieta hiperlipídica. Fígado.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Paola Raquel Braz**. Effect of the extract *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) on metabolic changes in C57BL / 6 mice subjected to a high fat diet.** 2014. 107 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

An Increased evidence has shown that a diet rich in polyphenols reduce cardiovascular risk. Our studies suggest that the hydro-alcoholic extract of the seed of the acai (ASE), rich in polyphenols improves many aspects of the metabolic syndrome (MS) induced by a high fat diet. The aim of this study was to evaluate the preventive effect of ASE on changes in hepatic metabolism of glucose and lipids, as well as the molecular mechanisms involved in these effects in C57BL / 6 mice fed high fat diet. Male C57BL / 6 mice 30 days of age were divided into 4 groups and received the following diets for 12 weeks: control group (C): standard diet; control group + ASE (C + ASE): standard diet + ASE; hyperlipidic Group (H): fat diet; hyperlipidic group + ASE (ASE + H) + ASE fat diet. Were evaluated: food intake, body weight, amount of visceral fat mass, plasma leptin levels, glucose levels, glucose tolerance, insulin resistance, adiponectin expression in epididymal adipose tissue, plasma lipids, liver triglycerides and cholesterol, liver histology, glycogen hepatic expression of proteins involved in the cascade of insulin (IR pIRS1, PI3K, pAKT and GLUT2) triglyceride synthesis (SREBP-1c, FAS and pACC) and cholesterol (HMG CoA R and pAMPK) and hepatic excretion cholesterol (ABCG5 and ABCG8), damage to lipids and activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) in liver and adipose tissue, serum protein oxidation in the liver, expression of SOD-2 and formation of liver nitrite. Treatment with ASE reduced the body weight, food intake, glucose tolerance, leptin sensitivity , hepatic steatosis, the accumulation of cholesterol and hepatic triglyceride, expression of lipogenic proteins, such as SREBP-1c and HMG CoA-R and normalized insulin signaling. Furthermore, increased insulin sensitivity, expression of adiponectin in the adipose tissue of pAMPK, carrier-cholesterol and ABCG8 showed an antioxidant effect on adipose tissue and liver to reduce the formation of byproduct of lipid peroxidation (MDA) and protein carbonyls and increase the activity of antioxidant enzymes. Thus, the ASE can modulate the expression of proteins in the insulin signaling pathway, and the pathway involved in lipogenesis, and cholesterol homeostasis. The synthesis of NO, the antioxidant activity and increased insulin sensitivity should play a central role in the effects of ASE.

Keywords: Metabolic syndrome. *Euterpe oleracea Mart*. Mouse C57BL / 6. Fat diet. Live.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 Componentes da síndrome metabólica segundo *NCEP-ATPIII*..... 21

Figura 1 Obesidade e desordens metabólicas 23

Figura 2 Tecido adiposo como órgão endócrino..... 24

Figura 3 Dislipidemia e mudanças no metabolismo lipoprotéico associado a resistência à insulina..... 28

Figura 4 Regulação do metabolismo da glicose..... 31

Figura 5 Regulação do metabolismo lipídico no fígado..... 34

Figura 6 Diagrama demonstrando como a redução univalente do oxigênio, na presença de um elétron livre, forma O_2^-, H_2O_2 e $^{\cdot}OH$..... 39

Figura 7 Foto da palmácea e do fruto da *Euterpe oleracea* Mart (açaí)..... 41

Figura 8 Processamento do extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (ASE)..... 44

Quadro 2 Composição das dietas padrão e hiperlipídica..... 46

Figura 9 Consumo alimentar dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 56

Figura 10 Peso corporal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 57

Figura 11 Massa de gordura visceral representada pelo peso de tecido epididimal (A) e tecido retroperitoneal (B) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 58

Figura 12 Níveis de leptina plasmática dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.... 59

Figura 13 Níveis de glicose inicial e final dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 60

Figura 14 Níveis plasmáticos e área sobre a curva de glicose durante TOTG dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 61

Figura 15 Níveis plasmáticos de insulina e índice de HOMA dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 62

Figura 16 Expressão da adiponectina em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 63

Figura 17 Níveis de MDA em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 64

Figura 18 Atividade da SOD, CAT e GPx em amostras em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 65

Figura 19 Níveis plasmáticos de colesterol (A), triglicerídeos(B), VLDL(C) e LDL(D) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 66
Figura 20 Níveis hepáticos de colesterol (A) e triglicerídeos (B) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 67
Figura 21 Esteatose hepática nos grupo C (A) , C + ASE (B), H (C) e H+ASE (D)..... 68
Figura 22 Expressão da IR (A), pIRS (B), pAKT (C), PI3-K (D), GLUT2 (E) e em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 69
Figura 23 Níveis de glicogênio hepático dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 71
Figura 24 Expressão de SREBP-1c (A), FAS (B) e pACC (C) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 72
Figura 25 Expressão do HMG CoA-R (A) e pAMPK (B) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 73
Figura 26 Expressão do ABCG8 (A), e ABCG5 (B) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 74
Figura 27 Níveis de MDA e carbonilação de proteínas em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 75
Figura 28 Níveis de nitrito em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 76
Figura 29 Atividade da SOD, CAT e GPx em homogenato de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 77
Figura 30 Expressão da SOD-2 em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAcE/ ACE	American Association of Clinical Endocrinology / American College of Endocrinology
ABCG5 e ABCG8	transportadores da sub-família G
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	American Institute of Nutrition
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
Apo	Apolipoproteína
Apo B	apolipoproteína B
ASE	Extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
C	Grupo controle
C+ASE	Grupo controle + ASE
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catlase
CE	Colesterol éster
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CL	Colesterol livre
CT	Colesterol total
CYP7A1	Colesterol-7-alfa-hidrolase
DCV	Doença cardiovascular
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Ácido graxo sintase
FL	Fosfolipídeos
GLUT	Transportador de glicose
GMPc	3’, 5’ guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutationa peroxidase
GSE	Extrato da casca de uva
GSH	Glutationa
GSK3	Glicogênio- sintase- quinase 3
GTP	Guanosina trifosfato
H	Grupo hiperlipídico
H+ASE	Grupo hiperlipídico + ASE
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol- HDL
HF	alto teor de gordura
HMG CoA-R	3-hidróxi-3-metil-guataril CoA redutase
HOMA	Modelo de avalição da homeostase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	International Diabetes Federation
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-6	interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IR	receptor da insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LP	Lipoproteínas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitôgeno
MDA	Malondialdeído
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio

NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NCEP ATPIII	Third Report of the National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
NO	Óxido nítrico
NO_2	Nitrito
O_2^-	Ânion superóxido
OH^-	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
pACC	Acetil- CoA carboxilase fosforilada
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
pAMPK	Proteína quinase ativada por AMP fosforilada
PCT	Patent Cooperative Treaty
PI3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
pIRS	Substrato do receptor da insulina fosforilado
PNSN	Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR	Receptor ativado por proliferadores do peroxissoma
QM	Quilomícron
RI	Resistência a insulina
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido desmutase
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis
TAE	Tecido adiposo epididimal
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TITI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	20
1.1	**Síndrome metabólica**	20
1.2	**Obesidade**	22
1.3	**Lipídeos e dislipidemia**	27
1.4	**Insulina e resistência à insulina**	29
1.5	**Alterações hepáticas**	32
1.6	**Estresse oxidativo**	36
1.7	**Modelo experimental da síndrome metabólica**	39
1.8	**Pólifenóis e o Extrato hidro-alcoólico do caroço da *Euterpe oleracea* Mart**	40
2	**OBJETIVOS**	43
2.1	**Objetivo geral**	43
2.2	**Objetivos específicos**	43
3	**METODOLOGIA**	44
3.1	**Obtenção do extrato hidro-alcoólico do caroço do Açaí (Euterpe oleracea Mart)**	44
3.2	**Animais utilizados e dieta experimental**	45
3.3	**Ingestão alimentar e massa corporal**	46
3.4	**Análises bioquimicas**	47
3.4.1	Perfil lipidico	47
3.4.2	Glicemia e insulina	47
3.4.3	Análise da sensibilidade à insulina	48
3.4.4	Leptina	48
3.5	**Teste oral de tolerânica à glicose (TOTG)**	48
3.6	**Medida da massa de gordura visceral**	48
3.7	**Medida de gligogênio hepático**	49
3.8	**Ensaios pró-oxidantes**	49
3.8.1	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)	49
3.8.2	Carbonilação de proteínas	50

3.9 **Medidas de nitrito**..... 51
3.10 **Atividade enzimática antioxidante**..... 51
3.10.1 Atividade da superóxido desmutase (SOD)..... 51
3.10.2 Atividade da catalase (CAT)..... 52
3.10.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)..... 52
3.11 **Western Blotting**..... 52
3.12 **Histologia do fígado**..... 54
4 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**..... 55
5 **RESULTADOS**..... 56
5.1 **Ingestão alimentar**..... 56
5.2 **Peso corporal**..... 57
5.3 **Massa de gordura visceral**..... 58
5.4 **Níveis plasmáticos de leptina**..... 59
5.5 **Glicemia**..... 60
5.6 **Teste Oral de tolerância à glicose (TOTG)**..... 61
5.7 **Resistência à insulina**..... 62
5.8 **Expressão de adiponectina em tecido adiposo epididimal**..... 63
5.9 **Níveis de MDA em tecido adiposo epididimal**..... 64
5.10 **Atividade da SOD, CAT e GPx em tecido adiposo epididimal**..... 65
5.11 **Perfil lipídico plasmático**..... 66
5.12 **Triglicerídeos e colesterol hepáticos**..... 67
5.13 **Histologia hepática**..... 68
5.14 **Expressão de IR, pIRS1, pAKT ,PI3K e GLUT2 hepáticos**..... 69
5.15 **Níveis de glicogênio hepático**..... 71
5.16 **Expressão de SREBP-1c, FAS e pACC hepáticos**..... 72
5.17 **Expressão de HMG CoA-R e pAMPK hepáticos**..... 73
5.18 **Expressão de ABCG5 e ABCG8**..... 74
5.19 **Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no fígado**..... 75
5.20 **Níveis de nitrito no fígado**..... 76
5.21 **Atividade de SOD, CAT e GPx em homogenato de fígado**..... 77
5.22 **Expressão da SOD-2 hepática**..... 78
6 **DISCUSSÃO**..... 79
CONCLUSÃO..... 89

REFERÊNCIAS..... 90

INTRODUÇÃO

Os duros tempos de fome e miséria que marcaram a humanidade, sobretudo na idade média (GMM e Andrade., 2013), induziram ao pensamento que a obesidade era um sinal de riqueza ou fertilidade, permitindo que aqueles que se tornavam facilmente obesos atrairiam mais companheiros e consequentemente teriam mais sucesso em gerar descendentes (Wells., 2006). A arte, muitas vezes, retratou mulheres com corpos obesos sendo consideradas símbolos da fertilidade (Seshadri., 2012). Porém, a ciência trouxe clareza à questão da obesidade sendo considerada um sério problema de saúde pública e uma das principais causas de morte evitável em todo o mundo (RPP Francischi e cols., 2000).

Dados do Ministério da Saúde revelam que, pela primeira vez, o percentual de pessoas com excesso de peso supera mais da metade da população brasileira. A pesquisa Vigitel 2012 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) mostra que 51% da população (acima de 18 anos) está acima do peso ideal. Em 2006, o índice era de 43%. Entre os homens, o excesso de peso atinge 54% e entre as mulheres, 48% (Ministério da saúde, 2013).

Esse aumento da obesidade em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, como é o caso do Brasil é influenciada pelo estilo de vida. O consumo de frutas e hortaliças está sendo deixado de lado por uma boa parte dos brasileiros. Há uma maior ingestão de "fast foods" e menor prática de atividades físicas, ou seja, há mudanças no consumo de energia e/ou gasto de energia (J Naukkarinen e cols., 2012).

A obesidade tem um papel importante no desenvolvimento de doenças metabólicas, o que inclui hiperinsulinemia, hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Chen e cols., 2011). Todas essas desordens metabólicas combinadas fazem parte da chamada síndrome metabólica (SM) e a obesidade é considerada a causa central dessas anormalidades metabólicas (Cao e cols., 2014). Dieta rica em gordura é uma condição nutricional que conduz a uma grande incidência de SM no mundo (Buettner e cols., 2007) e leva a hipertrofia dos adipócitos, ocasionando disfunção na produção de adipocinas (Takashi e cols., 2003). Além disso, é verificado aumento do

fluxo de ácidos graxos para o fígado (Akagiri e cols., 2008). A consequência fisiopatológica da infiltração de gordura é o aumento de ácidos graxos nos hepatócitos e diminuição da beta-oxidação, resultando no acúmulo de triglicerídeos (Pessayre., 2007).

Evidências crescentes têm atribuído aos polifenóis um efeito sobre o catabolismo de lipídios, transporte de glicose e a função do receptor de insulina. (Klaus e cols., 2005, Kim e cols., 2004). Os frutos de açaí são ricos em polifenóis como (-) epicatequina,(+) catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo), entre outros e ainda apresentam intensa ação antioxidante (Rocha e cols., 2007), melhora da função endotelial, redução da RI e melhora no perfil lipídico em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com extrato hidro-alcóolico do caroço do açaí (ASE) (de Oliveira e cols., 2010). Além disso, estudos têm demonstrado que o açaí promove uma melhora nos marcadores de risco de doença metabólica (Souza e cols., 2012).

Diante do exposto, o presente estudo visa investigar a ação do ASE sobre as alterações no metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos, em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura. Pretendemos avaliar a contribuição dos polifenóis presentes no açaí para a melhora das desordens metabólicas associdas a um estado nutricional excessivo, e uma possível utilização do ASE, na prevenção das alterações metabólicas que caracterizam a SM.

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 **Síndrome metabólica**

Em 1936 Harold Himsworth deu início ao conceito de resistência à insulina (RI) ao observar que um grupo de adolescentes era mais resistente à insulina exógena. Na década de 1940, o francês Jean Vague reconheceu a existência de dois tipos de obesidade e as classificou em dois tipos: ginoide e androide. A obesidade ginoide é característica do sexo feminino, em que a gordura se distribui nas coxas, glúteo e quadril, e está associada a alterações circulatórias e hormonais. A obesidade androide, cuja gordura se distribui no abdômen e está presente, sobretudo no sexo masculino é associada a vários distúrbios metabólicos como dislipidemias, hipertensão, patologias cardíacas e intolerância a glicose. Gerald Reaven, em 1988 introduziu o termo síndrome X para descrever as inter-relações propostas entre resistência à insulina, hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia e associou-as ao risco de doenças ateroscleróticas. As terminologias síndrome de resistência à insulina e/ ou síndrome X passaram a ser utilizadas indistintamente, surgindo em meados da década de 1990 a terminologia “síndrome metabólica” (SM). Reaven reconheceu a obesidade como um componente da SM, em publicação posterior (Godoy-Matos, 2005).

Embora não exista uma definição única que caracterize a SM, ela é comumente definida como um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina, devendo ser destacada a sua importância do ponto de vista epidemiológico, responsável pelo aumento da mortalidade cardiovascular estimada em 2,5 vezes (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005). Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS), propôs o primeiro critério diagnóstico para a SM como uma definição que poderia ser modificada quando mais dados estivessem disponíveis (Girman e cols., 2004). A definição da OMS apresenta a RI como característica central associada a duas ou mais alterações metabólicas (dislipidemia caracterizada por aumento dos triglicerídeos com ou sem aumento de colesterol, elevação da pressão arterial, obesidade e alteração renal mais avançada) (World Health Organization,

1999). Em 1999, o European Group For The Study Of Insulin Resistance (*EGIR*) que substituiu a determinação direta da resistência à insulina pela insulinemia de jejum, excluía a microalbuminúria como um dos componentes da SM, e avaliava a obesidade medindo circunferência da cintura e adotava a glicemia de jejum para medir a intolerância.

Em 2001, nos Estados Unidos, um grupo de cardiologistas e endocrinologistas do Third report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on detection evaluation and treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (*NCEP-ATP III*) propôs uma nova definição para SM que não enfatiza uma anormalidade metabólica específica e apresenta pontos de corte distintos para cada parâmetro em relação a OMS. Nota-se, porém, que ambas utilizam quatro domínios principais: glicose ou RI, lipídeos, pressão arterial e composição corporal. (*NCEP ATP III,* 2001). Pela praticidade e simplicidade, a definição do *NCEP-ATP III* é amplamente aceita e recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005) (quadro 1).

Em 2003, a American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology (*AACE/ACE*) ressaltou novamente a importância da inclusão dos testes de tolerância à glicose no diagnóstico, assim, como a diferenciação do risco de acordo com características específicas, tais como: índice de massa corporal (IMC) acima de 25 kg/m2

Quadro 1 – Componentes da síndrome metabólica segundo *NCEP-ATP III*

QUADRO 1 – COMPONENTES DA SÍNDROME METABÓLICA SEGUNDO O NCEP-ATP III

COMPONENTES	NÍVEIS
Obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL Colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL

A presença de *Diabetes mellitus* não exclui o diagnóstico de SM

ou circunferência central acima de 100 cm em homens e acima de 87,5 em mulheres, estilo de vida sedentário, idade acima de 40 anos, etnia, história familiar de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial (HAS) ou doença cardiovascular (DCV), história de intolerância à glicose ou diabetes gestacional, síndrome dos ovários policísticos e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Einhorn e cols., 2003).

Em 2005, a International Diabetes Federation (*IDF*) promoveu em Berlim, o I Congresso Internacional de Síndrome Metabólica e Pré-Diabetes, com a finalidade de unificar os critérios diagnósticos existentes. A recente definição da SM pela IDF considera a obesidade central, avaliada pela circunferência abdominal, um componente essencial para o diagnóstico da síndrome metabólica (*IDF*, 2005).

Todas estas desordens parecem ser decorrentes do estilo de vida moderno, ve Fonte: I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica

parcela de indivíduos cujos hábitos de dieta (consumo de alimentos do tipo "*fast-foods*" ricos em gordura) e de comportamento (sedentarismo) (Stelmach W e cols., 2005; Khan S e cols., 2005) tem contribuído para um aumento no número de mortes por doenças cardiovasculares, como por exemplo, acidente vascular cerebral e HAS, como também um elevado índice de obesidade e o desenvolvimento de diabetes, principalmente DM2 (OGDEN, 2007).

Não há estudos sobre prevalência da SM com dados representativos da população brasileira, mas sabe-se que a SM parece ser a maior responsável por eventos cardiovasculares na população (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

1.2 **Obesidade**

A obesidade representa um sério problema de saúde pública na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento por aumentar o risco de desenvolvimento de uma série de condições patológicas, incluindo a RI, DM2, dislipidemia, HAS e DHGNA (UJ e Myung-Sook., 2014) (figura 1). Apresenta alta prevalência e a incidência vem crescendo a cada ano. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada em parceria entre o IBGE e o Ministério da Saúde, analisando dados de 188 mil pessoas brasileiras em todas as idades,

mostrou que a obesidade e o sobrepeso têm aumentado rapidamente nos últimos anos. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres se encontram com excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade (IBGE, 2010).

As estimativas da OMS são ainda mais alarmantes, considerando a obesidade como uma epidemia e um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo. As projeções para 2030 estimam um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou seja, 57,8% da população adulta mundial terão sobrepeso ou obesidade, um terço desses nos países em desenvolvimento (OMS. Program and Projects: Diabetes in World, 2013).

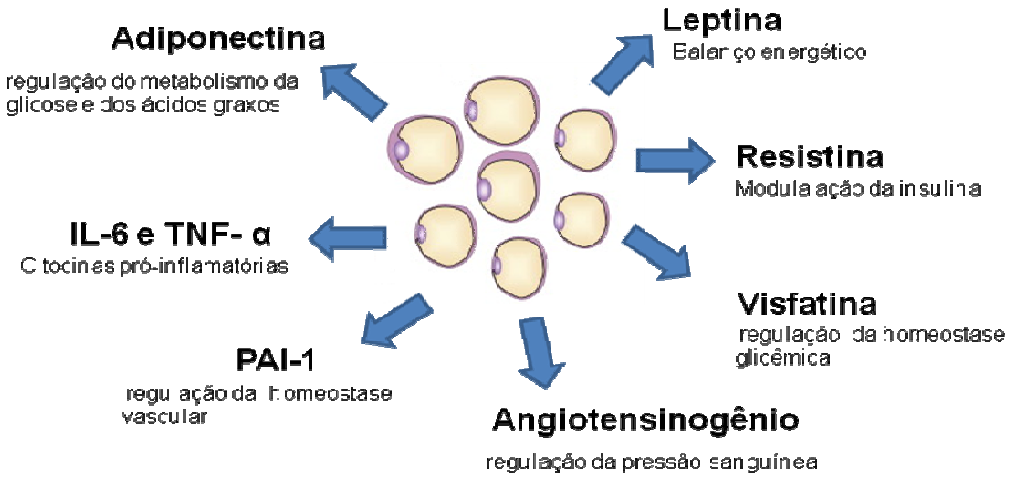
Figura 1 - Obesidade e desordens metabólicas associadas

Legenda: A obesidade caracterizada por desequilíbrio entre o consumo energético e o gasto energético gerando um quadro inflamatório sistemático de baixo grau, que inicia uma cascata de desordens metabólicas, aumentando o riso de doenças cardiovasculares. Fonte: Jung e Choi, 2014.

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

O tecido adiposo não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas pode ser considerado como um órgão endócrino que desempenha um papel central no metabolismo de lípidos e da glicose e produz um grande número de adipocinas, que podem influenciar profundamente os processos metabólicos que participam da inflamação e da resposta do sistema imune, além de serem sensores do balanço energético, como: adiponectina, leptina, resistina, visfatina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), inibidor do ativador de plaminogênio -1 (PAI-1) e angiotensinogênio, responsáveis por várias ações na homeostasia e em diferentes estados patológicos, como na SM (figura 2) (Hutley e Prins, 2005; Fonseca-Alaniz e cols., 2006).

Figura 2 - Tecido adiposo como órgão endócrino



Legenda: Adipócitos secretam diversas proteínas com funções endócrinas denominadas adipocinas que regulam o metabolismo glicídico e lipídico em tecidos periféricos, resposta inflamatória e pressão sanguínea, entre outros. Fonte: Vázquez-Vela e cols., 2008.

Dentre essas proteínas, serão destacas a leptina e adiponectina, adipocinas avaliadas nesse estudo. A leptina é uma proteína produzida principalmente pelo tecido adiposo branco e secretada na circulação em níveis proporcionais à massa desse tecido (Reseland e cols, 2001). Atua em células neuronais no sistema nervoso central, onde desempenha um papel importante na sinalização entre o hipotálamo e o tecido adiposo, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, com isso, o peso corporal (Friedmann e cols., 1998).

Além da sua ação nas células neuronais do hipotálamo, a leptina possui uma sinalização parácrina e/ou autócrina sobre o adipócito. A leptina estimula a lipólise e inibe a lipogênese, mecanismo esse considerado protetor contra a adipotoxicidade provocada pelo excesso de triglicerídeos (Fruhbeck GR., 2002). Estudos sugerem que o óxido nítrico (NO) é um importante regulador da lipólise induzida pela leptina (Frühbeck e Gómez - Ambrosi, 2001). Outros tecidos periféricos que apresentam os receptores da leptina Ob-R, também sofrem modulação pela leptina. No pâncreas há um estímulo na produção de insulina e no fígado ocorre um aumento na captação de glicose (La Cava e Matarese G, 2004).

Existe uma importante relação entre leptina e insulina, pois ambas utilizam duas vias de sinalização comuns, o que indica uma regulação dos efeitos fisiológicos de uma a partir da outra. Essa relação demonstra por que o aumento da sensibilidade nos receptores insulínicos pode melhorar a ação da leptina (Velloso, 2006). Acredita-se que a resistência à ação central destes dois hormônios possa ser o elo entre a obesidade e outras condições clínicas, como a resistência à insulina (Veloso, 2006).

A maioria dos indivíduos obesos apresenta hiperleptinemia, sendo o tratamento com leptina nesse caso ineficaz (Volpato e cols., 2012). Em animais de experimentação, o consumo de uma dieta hiperlipídica é capz de induzir obesidade e instalar um processo inflamatório no hipotálamo, que interfere com as vias de sinalização da leptina e insulina, resultando em desregulação no balanço de energia (Milanski e col., 2012).

Outra adipocina chave que tem sido associada a vários componentes da SM é a adiponectina, que é secretada exclusivamente pelos adipócitos (Berg e cols., 2001). Essa, em contraste com outras adipocinas, apresenta níveis plasmáticos inversamente proporcionais aos índices de gordura corporal (Shetty e col., 2009). O

papel fisiológico da adiponectina não está completamente elucidado, mas sabe-se que ela apresenta-se como potente agente anti-inflamatório e atua de forma favorável sobre a regulação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (Kubota e cols., 2007). Estudos têm mostrado que a adiponectina não só aumenta a sensibilidade à insulína, pela ativação da quinase ativada por AMP (AMPK) resultando numa diminuição da glicemia e da produção de glicose pelo fígado (Berg e cols., 2001; Combs e cols., 2001), como também aumenta a oxidação lipídica diminuindo a deposição ecotópica de gordura (Ravussin., 2002).

Na obesidade, a produção de adiponectina reduzida pode contribuir para a relação existente entre a deposição de gordura visceral e RI (Conp e cols., 2002). Estudos mostram que em adipócitos de ratos, *in vitro*, uma redução de 60% na expressão de adiponectina resultou em um aumento significativo da RI (Fonseca-Alaniz, 2006).

Uma das teorias para explicar a relação da gordura visceral com RI propõe que o influxo de ácidos graxos liberados pela adiposidade intra-abdominal seria responsável pela maior síntese de triglicerídeos, pelo aumento da gliconêogenese hepática e conseqüente RI e hiperinsulinemia compensatória (Fonseca-Alaniz e cols., 2006).

Estudos relatam que baixos níveis plasmáticos de adiponectina estão fortemente correlacionados com o desenvolvimento de obesidade, RI, DHGNA e, frequentemente podem progredir para DM2.O contrário também é verdadeiro, pois indivíduos com altas concentrações de adiponectina apresentam uma maior proteção contra o DM2, por sua ação moduladora da sensibilidade à insulina, e estímulo à utilização da glicose e oxidação dos ácidos graxos através do receptor ativador de proliferação peroxissomal (PPAR)-alfa (Shetty e cols., 2009)

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

1.3 **Lipídeos e dislipidemia**

Os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolipídeos, o colesterol, os triglicerídeos (TG) e os ácidos graxos (AG). Os fosfolipídeos formam a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é precursor dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D. Os TG são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular. Estas substâncias são insolúveis no meio aquoso, de modo que seu transporte na circulação linfática e sanguínea só é possível pela formação das lipoproteínas (LP**)** **(**V Diretriz brasileira de dislipidemias e Prevenção da aterosclerose, 2006).

As LP são classificadas de acordo com a sua densidade, em cinco classes: quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Guyton e Hall, 2006). O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TG, enquanto a LDL é composta principalmente de colesterol. Na circulação, os TG das VLDL são hidrolisados pela lipase lipoproteica. Os AG assim liberados são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados, como no tecido adiposo (V Diretriz brasileira de dislipidemias e Prevenção da aterosclerose 2006).

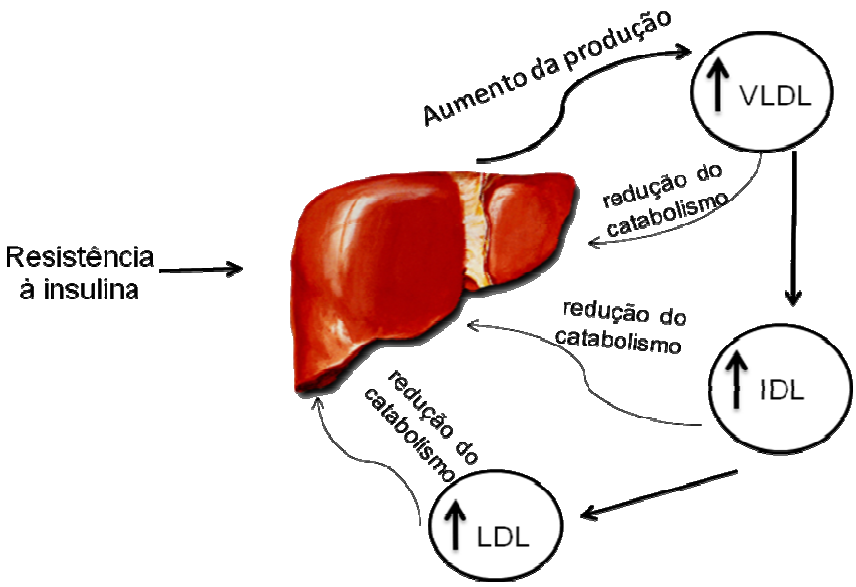
A dislipidemia associada a SM é uma importante causa do aumento do risco de doenças cardiovasculares e do início do desenvolvimento de aterosclerose (Raal e cols., 2009). Os componentes do núcleo da dislipidemia na SM são a tríade lipídica: níveis elevados de triglicerídeo plasmático, baixos níveis de colesterol-HDL e predominância de LDL pequenas e densas (NCEP ATP III, 2001).

Na SM a dislipidemia é caracterizada por desregulacão do metabolismo dos lipídeos no fígado com a produção aumentada de partículas de VLDL (Adies e cols., 2008). Em condições normais, a insulina inibe a produção de VLDL. Na vigência de RI ocorre não só, uma elevação da produção de VLDL, como também uma diminuição da captação hepática de VLDL, LDL e remanescentes, o que representa maior acúmulo destas lipoproteínas no plasma (figura 3). Além disso, o aumento do

fluxo de ácidos graxos livres (AGL) também aumenta a produção e secreção de VLDL e apoB, principal constituinte protéico do VLDL (Gill e cols., 2004).

Ácidos graxos livres plasmáticos estão elevados na RI (Kotronen A e Yki-Jarvinen, 2008) e essa elevação tem sido atribuída à saturação da capacidade dos adipócitos em armazenar triglicerídeos e ao aumento da lipólise de triglicerídeos no tecido adiposo, mediado pela enzima lípase hormônio-sensível, a qual é normalmente inibida pela insulina (Frederick e cols., 2009). A concentração plasmática de AGL está diretamente relacionada com o influxo dos mesmos para o fígado (Lewis, 1997). A elevação dos níveis de AGL associados a RI também causa disfunção endotelial, caracterizada por uma redução da resposta vascular a agentes vasodilatadores e a presença de aterosclerose (Koh e cols., 2005).

Figura 3 - Dislipidemia e mudanças no metabolismo lipoproteico associado a resistência à insulina



Legenda: A resistência à insulina está associada com um aumento da produção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); uma redução na taxa de catabolismo das liproteínas de densidade intermediária (IDL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Fonte:

Em 1970, Fraser e Zilversmit sugeriram que a aterosclerose seria um fenômeno pós-prandial, o qual é dependente da resposta metabólica ao consumo alimentar (Fraser, 1974; Zilversmit, 1979). Atualmente, sabe-se que uma dieta rica em gordura saturada causa aumento da concentração circulante de TG e radicais

livres. Subseqüentemente, esses radicais podem causar aterosclerose através da oxidação do LDL, resultando em partículas de LDL aterogênicas. (Kolovou e cols., 2006).

1.4 **Insulina e resistência à insulina**

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β 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 protéica, além de diminuir a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, e reduzir a lipólise e a proteólise (Saltiel e Kahn, 2001).

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

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

Além disso, com a diminuição na ação da insulina poderia haver também a ativação de fatores pró-inflamatórios, tais como, o fator de necrose tumoral alfa

(TNF-α) e a interleucina-6 (IL-6) secretados em excesso pelo tecido adiposo, assim como, o aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da disponibilidade de NO e baixa regulação de vias de sinalização intracelulares (Cubbon e cols., 2009), uma vez que, estudos *in vivo* revelaram que na RI induzida por AG em humanos ocorre redução das concentrações intracelulares de glicose, na presença de níveis elevados de AGL na circulação (Roden e cols.,1996; Dresner e cols.,1999).

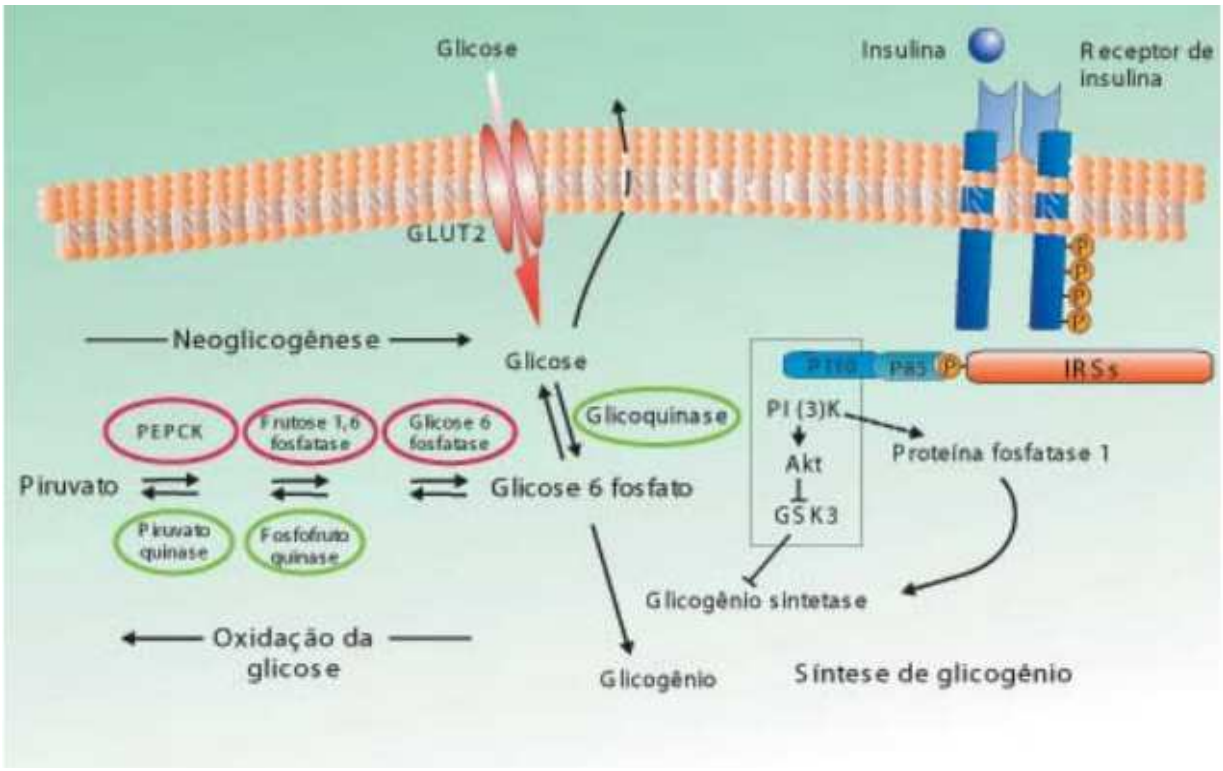
A insulina desempenha suas ações biológicas nos órgãos alvos, com a sua ligação a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR), composto por duas subunidades α e duas subunidades β. A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando à alteração conformacional e autofosforilação do receptor IR, nas subunidades β em vários resíduos de tirosina (Patti e Kahn,1998). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos proteicos em tirosina. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor da insulina, as proteínas IRS, tais como IRS-1 e IRS-2. Estes substratos interagem com a fosfotidilinositol 3- quinase (PI3-quinase), que consequentemente estimula uma proteína serina/ treonina quinase conhecida por AKT. Esta proteína estimula a captação de glicose por meio da translocação da proteína integral de membrana transportadora de glicose (GLUT) (Saltiel e Kahn, 2001; Sesti, 2006). Diferentes tecidos expressam diferentes subtipos de GLUT. O fígado e o pâncreas expressam o GLUT2, enquanto o tecido adiposo e a musculatura esquelética expressam o GLUT4 (Thorens e cols., 1990). Além disso, a insulina inibe a produção e a liberação de glicose no fígado por meio do bloqueio da neoglicogênese e da glicogenólise e estimula o acúmulo de glicogênio pelo aumento do transporte de glicose no músculo e a síntese de glicogênio no fígado e no músculo (Cross e cols., 1995). Este último efeito é obtido via desfosforilação da glicogênio sintetase. Após o estímulo com a insulina, a AKT fosforila e inativa a glicogênio-sintase-quinase 3 (GSK3), o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio sintase, aumentando sua atividade (figura 4) (Rayasam e cols., 2009).

A RI na obesidade é caracterizada por alterações na via de transmissão do sinal da insulina (figura 4), com redução da concentração e da atividade quinase do receptor de insulina, da concentração e da fosforilação de dois substratos de receptor de insulina (IRS): IRS-1 e IRS-2. A RI é caracterizada ainda por alterações

da atividade da fosfatidilinositol 3- quinase (PI3-quinase), da atividade das enzimas intracelulares e translocação de glicose (GLUT) (Pessin JE e Saltied AR, 2000).

Estudos têm demonstrado que as anormalidades nas respostas metabólicas na sinalização do receptor de insulina são em parte decorrentes do aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona nos tecidos insulino-sensíveis (Bramlage e cols., 2004; Griess e cols., 2000) e do aumento das EROs (Evans, 2007).

Figura 4 - Regulação do metabolismo da glicose



Legenda: A insulina estimula a utilização e armazenamento de glicose como glicogênio e inibe a síntese dessa hexose e sua liberação. A isulina estimula a expressão de genes da via glicolítica (verde) enquanto inibe a codificação daqueles que codificam enzimas da via da gliconeogênese (vermelho). A insulina também estimula a síntese de glicogênio através da inibição da GSK3 e proteína fosfatase 1. Fonte: Zecchin e cols., 2004.

Observa-se também que a sensibilidade à insulina possui influência da adiponectina que estimula tanto a secreção da insulina *in vivo e in vitro* (Okamoto e cols., 2008) quanto melhora a sensibilidade à insulina pela ativação da AMPK que estimula a translocação do GLUT4 no coração e no músculo esquelético (Yamauchi e cols., 2002; Tomas e cols., 2002) e do PPAR α e γ (Yamauchi e cols., 2001; Fruebis e cols., 2001).

Estudos têm demonstrado uma redução dos níveis de adiponectina plasmáticas, tanto em humanos quanto em modelos animais resistentes à insulina. (Hu e cols., 1996; Arita e cols., 1999).

O papel da RI é amplamente conhecido como elo entre obesidade central e demais alterações metabólicas (intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia e distúrbios da coagulação) (DeFronzo e Ferraninni, 1991; Reaven, 1994).

1.5 **Alterações hepáticas**

O fígado desempenha um papel central em desordens metabólicas relacionadas a obesidade (Truner e cols., 2009). Várias características adicionais foram sugeridas para tornarem-se componentes da SM, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Yaon e cols., 2011), o que corresponde ao acúmulo de lipídios (principalmente triglicerídeos) no fígado. A DHGNA engloba um amplo espectro de patologias hepáticas, variando desde uma esteatose simples, podendo progredir para sua forma mais grave, a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), até uma cirrose e um carcinoma hepatocelular, em sua forma mais avançada (Aguila e cols., 2010).

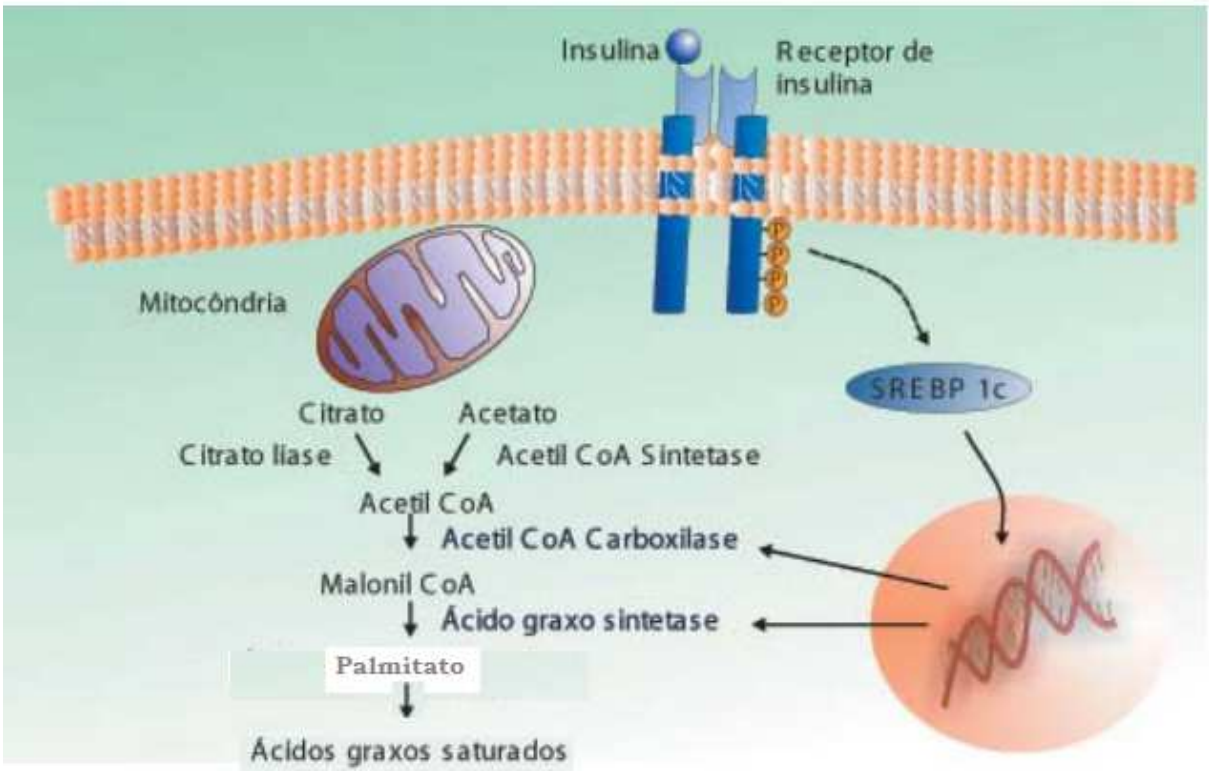
A DHGNA é a doença mais comum nos países ocidentais (Eickson., 2009) e já acomete 25% da população dos países onde a obesidade é mais prevalente (Marchesini e cols.,2001). É uma doença hepática relacionada à obesidde, RI e dislipidemia. Sugere-se que, na obesidade, uma vez ultrapassada a capacidade dos adipócitos de estocar TG, há um aumento do transporte de AGL para outros tecidos como o fígado; além de um estímulo da síntese hepática a partir da glicose por meio da lipogênese *de novo* resultando em aumento no conteúdo lipídico intra-hepático (Bays e cols., 2004). Esse processo pode promover resistência hepática à ação da insulina. (Adams e Ângulo., 2005; Videla e Pettinelli, 2012). O acúmulo de AG no fígado configura-se em um fator agravante na patogênese e progressão da SM e desordens associadas (Targher e cols., 2004).

Várias evidências sugerem que a insulina é provavelmente o principal fator hormonal que estimula a expressão de genes lipogênicos. Um dos mais importantes mediadores deste efeito é a SREBP-1c (proteína de ligação ao elemento de

regulação dos esteróis), um fator de transcrição, capaz de induzir a síntese de AG e TAG, regulando a sua estocagem no fígado (Postic e Girard., 2008). SREBPs ativam diretamente a expressão de aproximadamente 30 genes envolvidos na síntese e captação de colesterol, AG, TG e fosfolípideos (Foretz e cols., 1999). No fígado, a SREBP-1c regula a transcrição de genes lipogênicos, entre eles a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA (substrato derivado principalmente da glicose), em malonil-CoA. Subsequentemente, a malonil-CoA é convertida em palmitato através da última enzima chave na lipogênese, a ácido graxo sintase (FAS). Este palmitato pode formar AG (figura 5) que podem ser esterificados para TG e excretados na circulação como VLDL ou podem ser oxidados pela mitocôndria para gerar energia (Dullo e cols., 2004).

Evidências indicam que a esteatose hepática relacionada à RI é causada pelo acúmulo de SREBP-1c, que está elevada em resposta aos altos níveis circulantes de insulina (Shimomura e cols., 1999). De maneira semelhante, os níveis de SREBP-1c estão elevados no fígado de camundongos ob/ob, geneticamente obesos. Apesar da presença de RI nos tecidos periféricos, a insulina continua a ativar a transcrição do SREBP-1c no fígado desses camundongos. Este, por sua vez, aumenta a expressão de genes lipogênicos, e consequentemente a síntese de AG pela lipogênese *de novo* e reduzem a oxidação de AG na mitocôndria (Shimomura e cols., 2000).

Figura 5 - Regulação do metabolismo lipídico no fígado.



Legenda: A insulina estimula a SEBREP-1c, que por sua vez, modula a ativação transcricional de genes lipogênicos, tais como a ACC e a FAS.I Fonte: Zecchin e cols., 2004.

Outro ponto importante é a síntese e excreção do colesterol, pois o metabolismo hepático do colesterol influencia seus níveis no sangue e nos tecidos. A principal fonte de colesterol nas células advém da sua síntese a partir de acetil-CoA, em uma série de reações enzimáticas. A enzima chave controladora deste processo é a 3-hidróxil-3-metil-guatariil CoA redutase (HMG CoA-R). Quando a célula enriquece-se em colesterol são desencadeados processos de regulação que se refletem pela diminuição da atividade da HMG CoA-R (Godoy-Matos, 2005). A eliminação do excesso de colesterol no fígado pode ser catalisada diretamente pela secreção biliar, ou após sua conversão em ácidos biliares por meio de uma via enzimática dirigida pela enzima olesterol-7-alfa-hidrolase (CYP7A1) (Qi e cols., 2014). Além disso, os transportadores da sub-família G (ABCG5 e ABCG8) exercem um importante papel na excreção direta do colesterol na bile (Souza e cols., 2012). Esses transportadores são expressos exclusivamente na membrana apical dos hepatócitos e no intestino, sendo (Graf e cols., 2003) regulados transcricionalmente por um número de fatores implicados no desenvolvimento de resistência à insulina e

doença hepática não alcoólica e são responsáveis pelo efluxo do colesterol na bile (Kai e cols., 2012).

Rajabi e colaboradores em 2013 propuseram que elevados níveis hepáticos de colesterol livre decorrentes de uma dieta hiperlipídica desempenham um importante papel na progressão da esteatose hepática, visto que, o excesso de colesterol livre proporciona um aumento da formação de ácido biliar (Al Rajab e cols, 2013). O colesterol é um substrato para a síntese de ácidos biliares, que em excesso podem induzir lesão nos hepatócitos por comprometerem a integridade da estrutura de suas membranas, levando a formação de EROs (D Billington e cols, 1980), que induzem dano oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular (Sokol e cols, 2001). Ácidos biliares também podem ativar células de Kupffer, macrófagos do fígado, para produzirem EROs, aumentando o dano hepático (Ljubuncic e cols, 1996).

Importante é salientar o papel da AMPK no fígado, pois essa proteína atua sobre diversas cascatas celulares, estimulando a queima de gordura, bloqueando a produção hepática de glicose e inibindo a síntese de AG, TG e colesterol (Zang e cols., 2004). Animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentam redução da expressão e atividade da AMPKα e consequentemente níveis de ACC fosforilada diminuídos (pACC). A redução nos níveis de ACC fosforilada leva ao aumento da atividade da ACC, aumento do conteúdo de malonil-CoA e prejuízo na oxidação de ácidos graxos (Pauli e cols., 2009).

Dentre as causas mais frequentes do aumento da captação de AG há o consumo de dietas hiperlipídicas. Em 2011, Yao e colaboradores descreveram que uma dieta com alto teor de gordura leva ao desenvolvimento de DHGNA e Observou também que os níveis do subproduto da peroxidação lipídica chamado de malondialdeído (MDA) aumentaram, enquanto houve uma diminuição hepática do conteúdo de substratos, como de enzimas antioxidantes, como a glutationa (GSH) e superóxido dismutase (SOD). Acredita-se que a elevação do MDA e o declínio de SOD nos hepatócitos são devido à disfunção mitocondrial.

Umas das causas que levam à disfunção mitocondrial é a incapacidade de manutenção de fluidez da membrana mitocondrial (Yao e cols., 2011). Danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez dessa membrana. O ataque de algumas espécies reativas que removem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das

cadeias de ácidos graxos poliinsaturados inicia o processo de peroxidação lipídica (Halliweel e Guitteridge, 1991). Os radicais de carbono formados dessa maneira podem agir espontaneamente com o oxigênio, formando radical peroxila que propaga a cadeia de peroxidação lipídica, removendo átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas (Yaon e Grundy, 1992). De fato, um grupo de cientistas ao estudar possíveis alterações no perfil lipídico e no fígado de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica sugeriu que a disfunção mitocondrial contribui para a patogênese da EHNA em diferentes níveis, incluindo principalmente o comprometimento lipídico e a indução do processo de peroxidação lipídica (Jiayin e cols., 2011).

1.6 **Estresse oxidativo**

A produção de EROs é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas (Vasconcelos e cols., 2007). As EROs são moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou molecular (Halliwell e Gutteridge 1999). Estas são derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas, de curta duração, produzidas em todos os sistemas biológicos e reagem com as moléculas em torno do local de formação. Essas espécies, que incluem o ânion supéroxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^-), juntamente com as espécies reativas de nitrogênio desempenham um papel importante em processos fisiológicos e patológicos (Roberts e Sindhu, 2009).

As EROs em baixas concentrações são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo sinalização intracelular, diferenciação celular, apoptose (Ghost 1998) e defesa contra microorganismos (Bae e cols.1997; Lee e cols. 1998). Sob condições patológicas, a produção aumentada de EROs leva a disfunção endotelial, contratilidade aumentada, crescimento da célula do músculo liso vascular, peroxidação lipídica, inflamação e deposição aumentada de proteínas da matriz extracelular. A disfunção cardiovascular está associada a condições como hipertensão, diabetes e aterosclerose (Rao e Berk, 1992; Harrison, 1997; Zalba e cols., 2001; Duracková, 2010; Touyz & Briones, 2011).

Como demonstrado na figura 6, há várias fontes enzimáticas capazes de gerar EROS, como NADPH oxidase, xantina oxidase, citocromo p450 e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (Bessel e Estall., 2014). Enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), além de vitaminas antioxidantes e outras pequenas moléculas regulam os agentes pró-oxidantes (Stralin e cols., 1995; Halliwell, 1999; Channon e Guzik, 2002). Estes mecanismos de defesa antioxidantes mantêm a sobrevivência dos organismos contra o estrsse oxidativo. Um desequilíbrio entre a geração de EROs e proteção antioxidante resulta na alteração da biodisponibilidade de EROs levando a um estado de estresse oxidativo (Landmesser e Harrison, 2001; Zalba e cols, 2001) .O resultado patogênico do estresse oxidativo é o dano oxidativo (Schafer e Buettner, 2001).

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação das EROs, e sua função é vital para a célula. Além da membrana que envolve a célula, as membranas das organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo, entre outras, apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares. O dano celular resulta basicamente de ataque de ERO sobre as macromoléculas, tais como açúcares, DNA, proteínas e lipídios (Barreiros e cols., 2006).

Muitos biomarcadores vem sendo utilizados para avaliar o dano oxidativo, tais como, malondialdeído (MDA), dienos conjugados, gases etano e pentano, isoprostanos, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), modificações de proteínas e modificações no DNA (Esterbauer e cols., 1991; Foucaud e cols., 2010; Moller, 2010). O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação do malondialdeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (Bonnes & Guérin, 1992). A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante (Tiidus e cols., 1993). As EROs também podem levar ao dano de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril, que podem

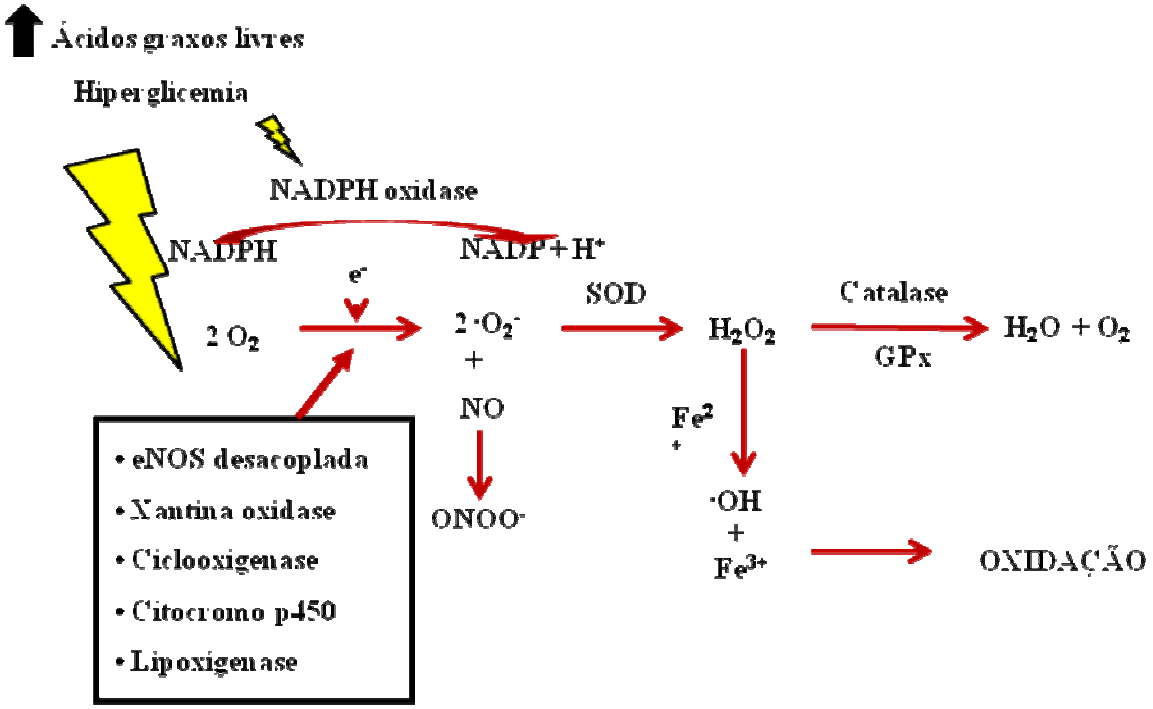
ser medidos pelo método de carbonilação de proteínas, além de poderem oxidar o DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Estudos têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante nas manifestações relacionadas com a SM, incluindo hipertensão, aterosclerose, RI e obesidade (Cerriello e Motz, 2004). Observou-se também que Indivíduos com SM apresentam dano oxidativo evidenciado pela diminuição da defesa antioxidante e pelo aumento dos níveis de MDA (Palmieri e cols., 2006; Armutcu e cols.2008;). As EROs agem na gênese da SM em humanos por afetar o metabolismo da insulina resultando em RI e no metabolismo de lipídios ocasionando, por exemplo, elevação dos TG plasmáticos e diminuição do colesterol-HDL (Grattagliano et al, 2007).

As mitocôndrias são uma importante fonte de EROs (Halliwell., 1999). O aumento dos AGL e a hiperglicemia derivados de uma dieta com alto teor de gordura podem levar ao aumento da atividade da NADPH oxidase e consequentemente maior produção de EROs (Carmiel-Haggai e cols., 2005), acarretando uma importante modificação na composição lipídica mitocondrial e levando à inibição da oxidação de AG (Vial e cols., 2011) (figura 6).

Em 2008, Naoto Matsuzawa-Nagata e colaboradores descreveram que uma dieta com alto teor de lipídeo induz estresse oxidativo, potencialmente através do aumento da expressão de genes envolvidos na produção de EROs, no fígado e tecido adiposo e este evento precede o aparecimento da RI e obesidade induzidas pela dieta hiperlipídica (Matsuzawa-Nagata e cols, 2008).

Figura 6 - Formação de espéceis reativas de oxigênio



Legenda: A redução univalente do oxigênio, na presença de um elétron livre, forma O_2^-, H_2O_2 e OH. Fonte: Adaptado de Toyuz RM, 2004.

1.7 **Modelo experimental de síndrome metabólica**

Para o estudo da SM e suas doenças associadas, muitos modelos animais experimentais têm sido utilizados atualmente, e o modelo que mais se aproxima da SM humana é aquele que utiliza uma dieta alimentar rica em gorduras, as chamadas *high-fat* (HF) ou dieta hiperlipídica (Buettner e cols., 2007; Matsuzawa-Nagata, 2008). Neste caso, uma dieta hiperlipídica usada em animais roedores, resulta em um fenótipo similar ao da SM, encontrando-se nestes animais uma RI e comprometimento da função das células β do pâncreas, além do aumento da massa corporal (Buettner e cols., 2007).

Segundo Buettner e cols. (2007), uma dieta constituída por frações entre 20% e 60% de gordura animal e vegetal é ideal para uma indução de desordens metabólicas, elevando-se os níveis de glicose sanguínea, em jejum, acompanhada por moderado aumento nos níveis de insulina plasmática.

Matsuzawa-Nagata e colaboradores (2008) demonstraram que na obesidade ocorre acumulo de EROs e podem induzir a RI em adipócitos de ratos cujas mães foram tratadas com uma dieta rica em gorduras, porém ainda não está clara a relação entre o consumo de uma dieta hiperlipídica e as mudanças nas ações da insulina. Em revisão, Taylor e Poston (2007) demonstram que a obesidade é observada em ratos cujas mães foram tratadas com uma dieta rica em gorduras, assim como hipertensão e hiperglicemia.

Muitos dos aspectos da SM podem ser induzidos em modelos experimentais, em que os animais apresentam elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de alterações metabólicas, como os camundongos C57BL/6J. A manipulação da dieta oferecida a estes animais pode ser realizada com o intuito de acelerar o desenvolvimento dessas alterações associadas à SM. Camundongos C57BL/6J quando alimentados com uma dieta rica em gordura são altamente adequados para identificar alguns dos aspectos dos componentes da SM, como desordem lipídica, obesidade e RI (Gallou-Kabani e cols., 2007).

1.8 **Pólifenóis e o Extrato hidro-alcoólico do caroço da *Euterpe oleracea* Mart.**

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

Frutas, vegetais e cereais integrais, que são regularmente consumidos na dieta humana, apresentam flavonóides que são um grande grupo de compostos polifenólicos (Davies, 2007; Middleton *e cols.*, 2000). Eles são descritos por possuírem efeitos biológicos benéficos como anti-inflamatórios (Gomes *e cols.*, 2008), antioxidantes (Butterfield *e cols.*, 2002; Liu *e cols.*, 2008), sequestro de radicais livres (Galvano *e cols.*, 2007), ação antiviral e antibacteriana (Havsteen,

2002), inibição da agregação plaquetária (Curin *e cols.*, 2006) e promoção da saúde cardiovascular (Chen *e cols.*, 2008; Lin *e cols.*, 2008). Como exemplo, a rutina, um bioflavonóide conhecido como vitamina P, diminui a fragilidade capilar associada a doenças hemorrágicas, reduz a pressão arterial elevada, diminui a permeabilidade dos vasos, possui um efeito antiedema, reduz o risco de arteriosclerose e tem forte atividade antioxidante (Chang *e cols.*, 2007; Sun *e cols.*, 2007).

Além disso, estudos recentes tem demonstrado uma importante ação benéfica de compostos polifenólicos nas alterações metabólicas associadas à obesidade e DM (Soares de Moura e cols, 2011; Souza e cols., 2012).

A planta *Euterpe oleracea Mart*. também conhecida pelo nome popular de açaizeiro, é uma palmácea da família *Arecaceae* (figura 7), é amplamente encontrada na região Amazônica principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá (Embrapa, 2010). A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumido no Brasil. Face ao seu grande emprego como alimento e significativo conteúdo polifenólico, o Açaí tem chamado a atenção dos cientistas e mais ainda das indústrias nacionais e estrangeiras que importam toneladas deste fruto de Belém do Pará para industrialização, principalmente nos Estados Unidos (Embrapa, 2004; Organização Pan-Americana da Saúde, 2009).

Figura 7 - Foto da palmácea e do fruto da *Euterpe oleracea* Mart (açaí)

Euterpe oleracea Mart.
(Palmácea conhecida como açaizeiro)

Fruto da Euterpe oleracea Mart.
(AÇAÍ)

Estudos químicos têm mostrado que o fruto do açaí (polpa) é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas, entre outros (Lichetenthaler, *e cols*., 2005; Rodrigues *e cols*., 2006). Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí obtido do fruto é rico em catequina e proantocianidinas poliméricas (Soares de Moura *e cols.*, 2012), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa, e ainda uma ação vasodilatadora mais potente e intensa do que a obtida com o extrato de polpa de açaí (Rocha et cols., 2007).

Nossos estudos demonstram ainda, que o extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí (ASE), cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), assim como, no exterior (Patent Cooperation Treaty -PCT), induz efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha e cols, 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha e cols., 2008). Uma redução do dano oxidativo e efeito antiinflamatório também foram demonstrados em lavado broncoalveolar de camundongos submetidos à fumaça de cigarro e tratados com ASE (Rocha e cols., 2008; de Moura e cols., 2011).

Finalmente, camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE exibiram uma melhora da função endotelial, redução da RI e melhora no perfil lipídico (de Oliveira *et al.*, 2010). Estes achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando uma importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas. Entretanto, se faz necessário o estudo do mecanismo pelo qual o ASE age no metabolismo glicídico e lipídico em órgãos como o fígado e sobre o estresse oxidativo nestes animais para ampliarmos o conhecimento sobre os mecanismos dos efeitos benéficos de ASE sobre a obesidade e DM e sua possível utilização como no tratamento dessas doenças.

Baseado no pressuposto acima, realizamos um estudo em camundongos com o objetivo de investigar o metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica, capaz de induzir obesidade, RI e NAFLD. Cabe enfatizar a relevância do estudo, uma vez que a SM caracteriza-se pela associação de uma série de comorbidades e o tratamento proposto deve atuar nesse conjunto de fatores, contribuindo para a melhora da crescente incidência de DM2, obesidade e DHGNA.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo geral**

Avaliar o efeito preventivo do extrato do caroço do açaí (ASE) sobre as alterações do metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 **Objetivos específicos**

- Acompanhar a evolução da massa corporal e da ingestão alimentar;

- Estimar a massa de gordura visceral, ao final do período experimental, e a expressão proteica da leptina e adiponectina em tecido adiposo;

- Avaliar a RI através da glicose plasmática de jejum; os níveis séricos de LDL, VLDL, TG e colesterol total, bem como, os níveis de glicogênio hepático;

- Determinar a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina em homogenato de fígado, avaliando uma possível interferência do ASE sobre esta via;

- Analisar o perfil lipídico hepático, a fim de estabelecer uma relação com esteatose hepática e avaliar o efeito do ASE;

- Analisar a expressão de proteínas chaves envolvidas na homeostase de lipídios em fígado, avaliando uma possível interferência do ASE na via biossintética dos AG;

- A expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 envolvidos na excreção de colesterol, avaliando uma possível interferência na excreção hepática;

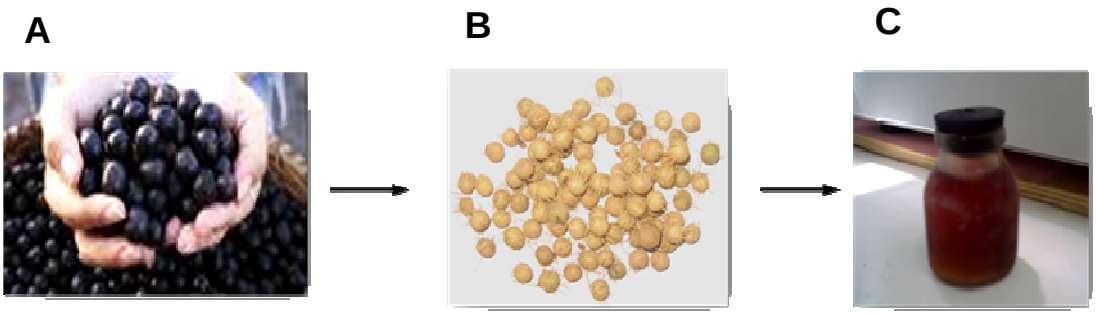
- Avaliar o dano oxidativo e a defesa antioxidante em homogenato de fígado;
- Analisar as alterações morfológicas e histológicas do fígado.

3 METODOLOGIA

3.1 **Obtenção do extrato hidro-alcoólico do caroço do Açaí (Euterpe oleracea Mart)**

Utilizamos frutos de açai, provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Prof. Pergentino José Cunha Souza da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Para a obtenção do extrato, 200 g do fruto do açaí são lavados e os caroços separados. Posteriormente são vigorosamente triturados, embebidos em 400 ml de água destilada e fervidos por 5 minutos. Após a fervura acrescenta-se 400 ml de etanol. O extrato hidro-alcoólico é acondicionado sob refrigeração e agitado periodicamente por 2 a 4 horas durante aproximadamente 10 dias. Em seguida, o extrato é filtrado em papel filtro e submetido à evaporação do etanol a baixa pressão. O resíduo é liofilizado e mantido a -20°C até o uso (Figura 8).

Figura 8 - Processamento do extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (ASE).



Legenda: (A) Fruto do açaí; (B) Caroço do açaí; (C) Extrato pronto, já evaporado e liofilizado em água destilada [100mg/mL].

A concentração de polifenóis no ASE, medida pelo procedimento de Folin-Ciocalteau para análise total de fenóis (Sirgleton e Rossi, 1965), foi de aproximadamente 250 mg/g de extrato. Usualmente 100 g do caroço proporciona aproximadamente 5 g de extrato liofilizado.

3.2 **Animais utilizados e dieta experimental**

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

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos de 30 dias de idade, obtidos no Centro de Desenvolvimento de modelos experimentais (CEDEME) – UNIFESP-SP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia/ IBRAG/ UERJ, em temperatura média de 21º C e com ciclo de luminosidade de 12 hs (claro e escuro).

Os camundongos foram alimentados com livre acesso à ração e água durante 12 semanas com uma dieta controle (dieta padrão para camundongos) ou dieta hiperlipídica (dieta experimental rica em banha de porco, fonte de ácidos graxos saturados). Ambas as dietas (quadro 2) experimentais foram elaboradas pela Rhoster® (Rhoster, SP, Brasil, www.rhoster.com.br), de acordo com as recomendações padrão para roedores nos estado gestacional e de manuntenção da American Institute of Nutrition (AIN-93G e AIN-93M). Dessa forma, os camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais:

a) Grupo Controle (C): receberam dieta padrão durante 12 semanas + gavagem intragástrica de água filtrada.

b) Grupo Controle + ASE (C+ASE): receberam dieta padrão durante 12 semanas e concomitantemente 300mg/kg do ASE sendo administrado por gavagem intragástrica, durante quatro semanas (Oliveira e cols., 2010).

c) Grupo hiperlipídico (H): receberam dieta experimental durante 12 semanas semanas + gavagem intragástrica de água filtrada.

d) Grupo hiperlipídico + ASE (H+ASE): receberam dieta experimental durante 12 semanas e concomitantemente 300mg/kg do ASE sendo administrado por gavagem intragástrica.

Quadro 2. Composição das dietas padrão e hiperlipídica

Nutrientes (U/Kg dieta)	Dietas	
	Padrão	Hiperlipídica
Caseína (g)	140	190
Amido de milho ((g)	620,7	250,7
Sacarose (g)	100	100
Óleo de soja (g)	40	40
Banha de porco (g)	0	320
Fibras (g)	50	50
Mistura de minerais (g)	35	35
Mistura de vitaminas (g)	10	10
L-cistina (g)	1,8	1,8
Colina (g)	2,5	2,5
Antioxidantes (g)	0,008	0,008
Energia (Kcal)	3.800	5.400
Carboidratos (%)	76	26
Proteína (%)	14	14
Lipídeo (%)	10	60

Mistura de vitaminas e minerais seguiram as recomendações para roedores da AIN- 93M

3.3 **Ingestão alimentar e massa corporal**

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

Ingesta (ração) = (Oferta – sobra)/ n

3.4 **Análises bioquímicas**

Ao final do período experimental (12 semanas) e após 6 horas de jejum,os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio intraperitoneal (0,42 mg/g) e o sangue foi coletado por punção cardíaca e colocado em tubos contendo heparina para posterior centrifugação a 2400rpm por 20 minutos. O plasma foi armazenado a 4ºC para análise bioquímica.

3.4.1 Perfil lipídico

Os triglicerídeos (TG), o colesterol total (CT), e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram avaliados no plasma através de Kit comercial (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) que se baseia em método colorimétrico. A lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi calculada pela fórmula: VLDL= triglicerídeos/5 (Friedewald e cols.,1972). As concentrações plasmáticas foram expressas em mg/dL.

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

3.4.2 Glicemia e Insulina

A dosagem de glicose foi realizada através de um glucômetro (Accu-check) nos animais em jejum por 6 horas. Os valores foram expressos em mmol/l. 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 Ul/mL.

3.4.3 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através do índice de HOMA (Homesostasis Model Assessment) calculado pela fórmula: insulina de jejum (µUI/mL) x glicose de jejum (mmol/L)/22,5 (Matthews, 1985).

3.4.4 Leptina

Amostras de plasma (ou soro) foram utilizadas para a determinação da leptinemia com kit comercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (Millipore, Missouri, EUA).

3.5 **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

TOTG foi avaliado duas semanas antes do sacrifício. A glicose (2g/Kg) foi administrado no tempo zero. O sangue caudal foi coletado nos tempos 0, 20, 40, 60, 80 e 120 e a glicemia foi dosada através de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche®), baseado na reação glicose-glicose oxidase. Os animais ficaram em jejum por 6 horas. As áreas sobre a curva (AUC; milimolar/minuto) foram calculadas.

3.6 **Medida da massa de gordura visceral**

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

3.7 **Medida de glicogênio hepático**

Após os animais serem sacrificados, os fígados foram isolados e pesados para análise do glicogênio hepático. Para 500 mg de fígado foi adicionado 1ml de

ácido tricloroacético (TCA 10 %), e em seguida foi feito um homogenato deste fígado. As amostras foram centrífugas a 2.000 rpm por 10 minutos. Foram coletados 600µl do sobrenadante em tubos de ensaio e adicionados 1,6 ml de etanol. As amostras foram deixadas em geladeira overnight e posteriormente foram centrifugadas novamente a 2.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µl de HCL 1N e deixados em banho maria a 100°C por 30 minutos. Finalmente, o glucox foi adicionado e as amostras foram lidas em leitor de Elisa a 510 nm.

3.8 **Ensaios pró-oxidantes**

3.8.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

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

Foram utilizados 200 µl de homogenato de tecido adiposo epididimal (TAE) e fígado para 400 µl de TCA. Para o plasma, foram utilizados 200 µl de amostra, diluídos em 600µl de TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4ºC. Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa aos quais foram adicionados 500µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100ºC) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Para o cálculo foi utilizado:

- Fator de Correção (FC) médio do TBA → FC = $\frac{[nmol.TMP]}{Abs.\ ptn}$
- Abs. da amostra x FC médio = nmol de TBARS
- nmol de TBARS ÷ quantidade de proteína da amostra (nmol de TBARS/mg de proteína).

3.8.2 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 proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente 22.0000 $Molar^{-1}$em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 200µl de homogenato de TAE e 100µl de fígado e 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 600g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitropheniylhydrazine e outra parte incubada com HCL 2M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60ºC por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro (370 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.9 **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_2), 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 adicionados100 µl da amostra em 50 µl da solução 1. Após um tempo de 10 minutos foram adicionados 50 µl da solução 2. Após a homogeneização, a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro ou leitor de ELISA. O resultado foi dado em µM (ou mMol)/ mg proteína.

3.10 **Atividade Enzimática Antioxidante**

3.10.1 Atividade da superóxido desmutase (SOD)

Foi utilizado 20, 40 e 60µl de cada amostra (TAE e fígado), em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 20µl de catalase (0,0024g/ml de água destilada – C9322, SIGMA) + 970µl de tampão glicina (0,75g em 200ml de água destilada – 32ºC) + 40 µl de norepinefrina (95 mg em 5ml de água destilada + 15µl/ml de HCl fumegante).

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do excel. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

3.10.2 Atividade da catalase (CAT)

Foram utilizados 200 µl de homogenato de TAE e fígado em cubetas separadas (quartzo). Em cada cubeta foi adicionado 1 ml de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (25ml de tampão para 40µl de H_2O_2). O comprimento de

onda utilizado foi 240nm e a leitura foi feita nos tempos 0, 30 e 60 segundos (Aebi, 1984).

3.10.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

Foram utilizados 200 µl de homogenato de TAE e fígado em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 1800 µl de tampão fosfato (PBS) com glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase (GR) e azida sódica (20ml de tampão para 4ml de GSH + 4ml GR + 1ml de azida sódica) e incubada por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µl de NADPH e a leitura realizada por 3 minutos. Posteriormente a esta leitura foi adicionado 200 µl de peróxido de hidrogênio e lido por 5 minutos . Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e cols. (1984) e adaptada para os tecidos vascular, renal e cardíaco.

3.11 **Western Blotting**

O TAE (240 mg) foi homogeneizado em 700 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM , EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifulgados (13000 rpm, 4°C por 25 min).

O tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado com 2 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel inibidor de proteases, centrifugados (13000 rpm, 4°C for 20 min) e sonicados (3 vezes com 10 segundos de pulse on e 15 segundos de pulse off).

A concentração protéica foi determinada usando ensaio colorimétrico 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 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% bromofenol azul) e aquecidas a 95 °C por 5 min. As amostras foram analisadas pelo método SDS-PAGE. Foram pipetados 20 µg

de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (overnight, a 5ºC): anti-IR (1:1000); anti-pIRS-1 (1:500); anti-pAKT (1:1000); anti-SOD-2 (1:1000)**;** anti-PI3K (1:1000); anti-GLUT2 (1:1000); anti-SREBP-1c (1:1000)**;** anti-FAS (1:1000); anti- pACC (1:1000); anti- HMG CoA-R (1:1000)**;** anti-pAMPK (1:1000); anti-ABCG8 (1:1000) e anti- ABCG5 (1:1000) para o homogenato de tecido adiposo; anti-LEPTINA (1:1000) e anti-ADIPONECTINA (1:1000) para o homogenato de TAE; e anti-tubulina (1:1000) para os homogenatos de todos os tecidos (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:5000) por 1 h (25ºC) 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).

3.12 **Histologia do fígado**

Amostras de fígado de 5 camundongos foram fixadas em formalina (1.27 mol/L formaldeído 0.1M tampão fosfato-salina, pH 7.2) e embebidos em parafina para realização de cortes não seriados de 5 µm. Os cortes foram alocados em lâminas histológicas para a coloração com hematoxilina/eosina a fim de identificar a arquitetura do fígado (Bancroft & Stevens, 1990). Foram tiradas 10 fotografias aleatórias por animal para avaliar a esteatose e a arquitetura do fígado. Todas as

imagens foram escolhidas ao acaso (formato JPG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) com câmera Olympus DP71 e com Olympus BX40 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).

4 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

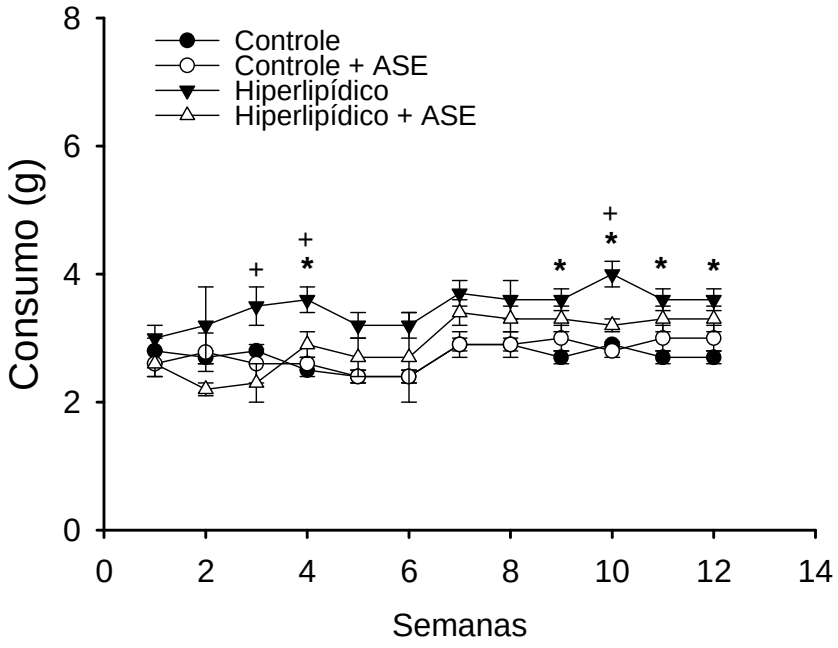
Todos os resultados foram analisados por meio de “Two-way analysis of variance” (ANOVA) utilizada para comparar diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Bonferroni, sendo consideradas significativas, quando o valor de $p<0,05$.

5 **RESULTADOS**

5.1 **Ingestão alimentar**

Durante o fornecimento das dietas, a quantidade de ração (g) consumida pelos animais do grupo hiperlipídico (H) foi maior ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles (C e C+ASE). O tratamento com ASE preveniu o aumento do consumo do grupo hiperlipídico nas primeiras semanas (figura 9).

Figura 9 - Consumo alimentar dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE

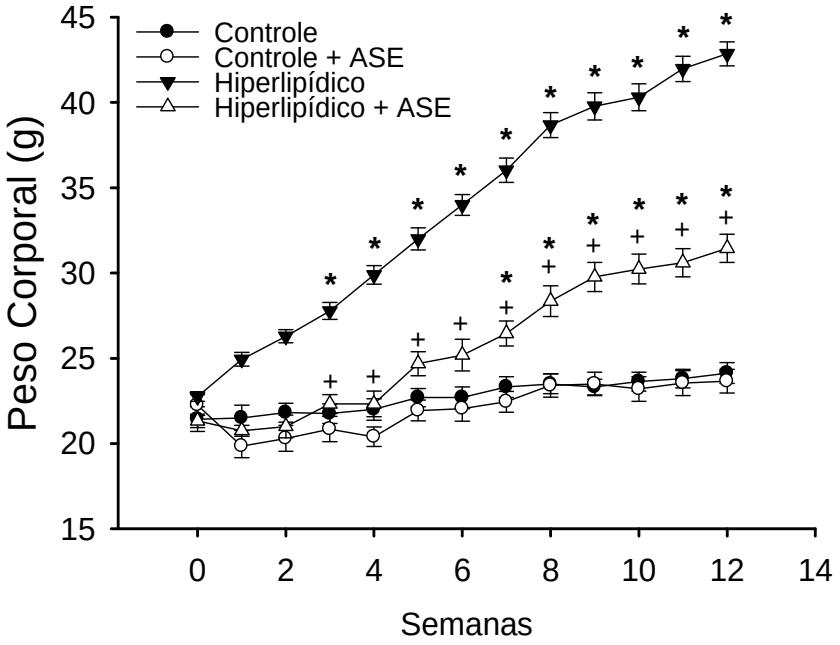


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. *p <0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H +ASE

5.2 **Peso corporal**

No início do estudo, os animais não apresentaram diferença estatística em seu peso corporal entre os grupos. A partir da terceira semana até o término do período de estudo, o peso corporal do grupo que recebeu dieta rica em ácidos graxos (AG) saturados foi significativamente maior (p<0,05) comparado ao controle, confirmando a indução de obesidade neste modelo animal. Ao longo do tratamento com ASE, o peso corporal do grupo H+ASE foi significativamente menor que do grupo hiperlipídico, apresentando uma redução de 24% ao final de 12 semanas de tratamento (*p*<0,05). O grupo H+ASE apresentou um peso corporal significativamente maior (p<0,05) em relação aos grupos controles a partir da sétima semana até o término do estudo (figura 10).

Figura 10 - Peso corporal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

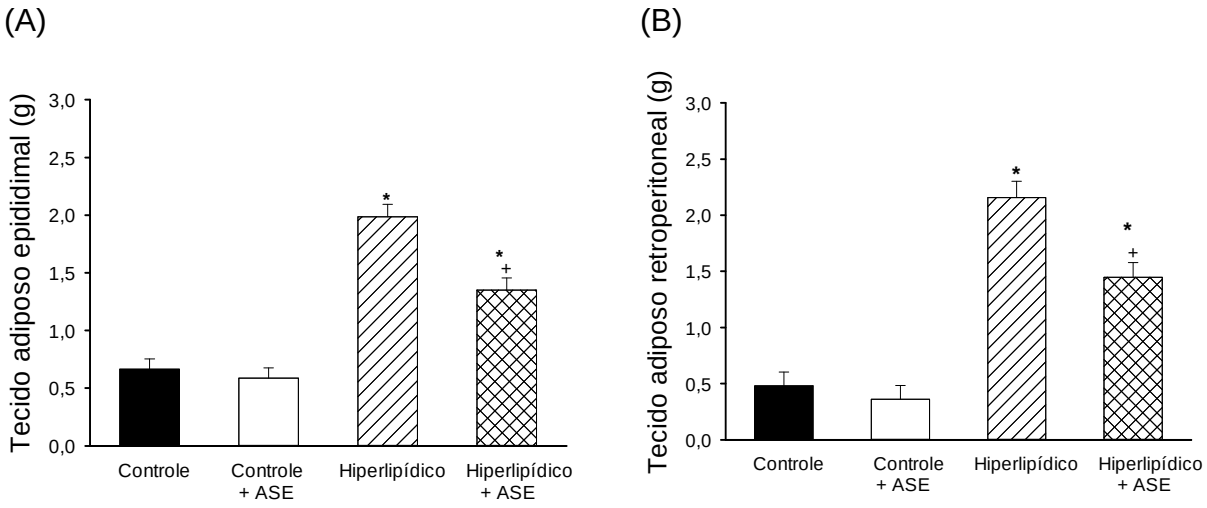


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. *p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e +p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.3 **Massa de gordura visceral**

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

Figura 11 - Massa de gordura visceral representada pelo peso de tecido epididimal (A) e tecido retroperitoneal (B) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

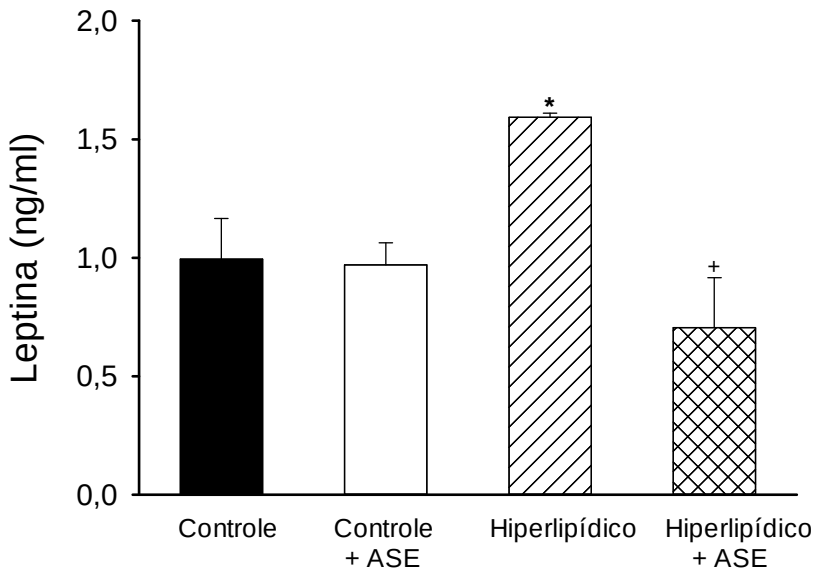


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.*$p < 0,05$ em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.4 **Níveis plasmáticos de leptina**

Os níveis plasmáticos de leptina foram significativamente maiores ($p<0,05$) no grupo H, quando comparados aos grupos controles. Esse achado estabele uma correspondência com os resultados de peso corporal e ingestão alimentar envolvidos na ação da leptina. O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p<0,05$) os níveis plasmáticos de leptina nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (figura 12).

Figura 12 - Níveis de leptina plasmática dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

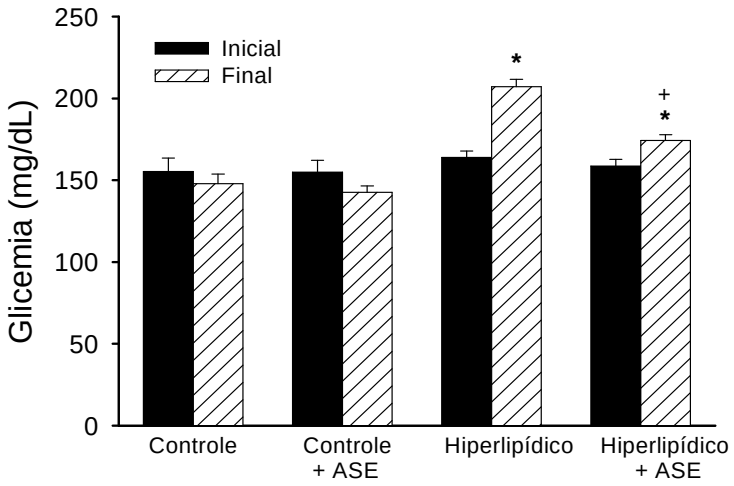


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.*$p < 0,05$ em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.5 **Glicemia**

Os níveis plasmáticos de glicose foram maiores nos grupos H e H+ASE ($^{*+}p<$ 0,05) em relação aos demais grupos. O Tratamento com ASE reduziu o aumento da glicose no grupo H+ASE ($^{+}p<$ 0,05) em relação ao grupo H (figura13).

Figura 13 - Níveis de glicose inicial e final dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

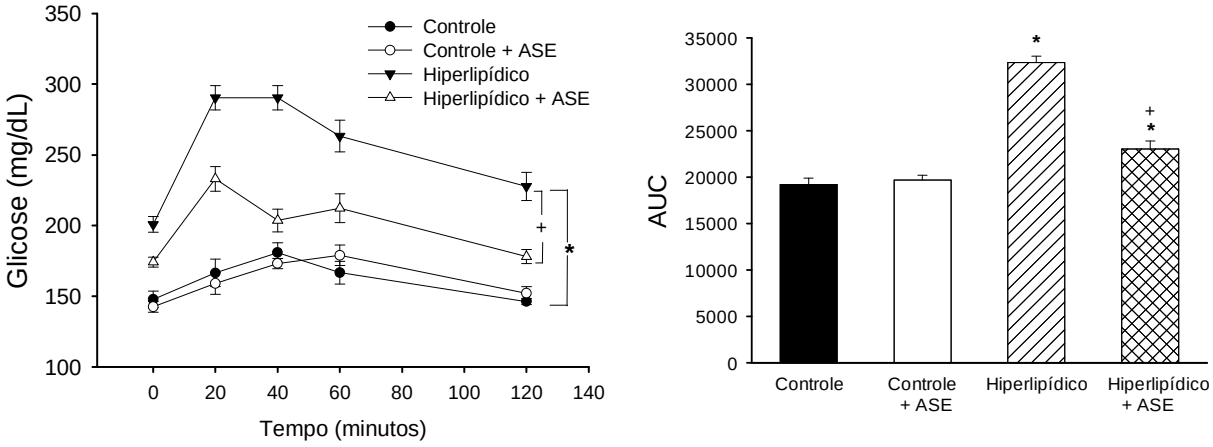


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.*p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}$p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.6 **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

A intolerância à glicose foi observada nos grupos H e H+ASE em relação aos grupos controles (p<0,05). No grupo H os picos dos níveis plasmáticos de glicose foram de 20 e 40 minutos após o desafio com glicose e o aumento na área sobre a curva (AUC), indica uma demora na redução dos níveis de glicose plasmática após a sobrecarga, o que sugere intolerância à glicose nesses animais. O tratamento com ASE diminuiu a intolerância à glicose no grupo H+ SE (*p*<0,05) em relação ao grupo H (Figura 14).

Figura 14 - Níveis plasmáticos e área sobre a curva de glicose durante TOTG dos dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

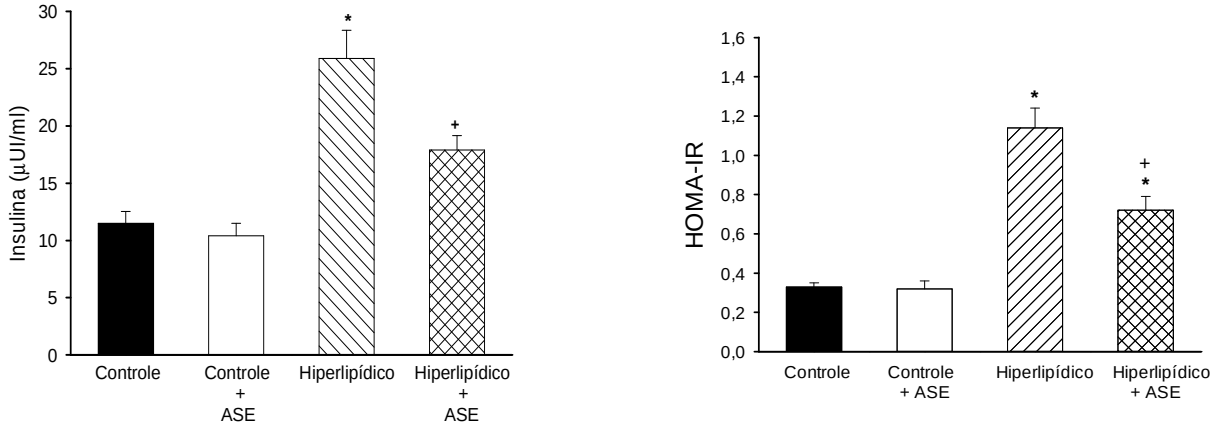


Legenda: Valores estão expressos como como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos
* p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}$p < 0,05 em relação ao grupo

5.7 **Resistência à insulina**

Além de hiperglicêmicos os grupos H (25,9 ± 2,44) e H+ASE (17,9 ± 1,27) apresentaram hiperinsulinemia em relação aos grupos C (11,5 ± 1,02) e C+ASE (10,4 ± 1,1) (P<0,05). Por conseguinte, esta desregulação na homeostase da glicose resultou em elevados valores de HOMA-IR comparados aos grupos controles ($p \leq 0,05$), o que é consistente com o resultado da intolerância à glicose. Entretanto, o tratamento com ASE reduziu os níveis de insulina em relação ao grupo H ($p \leq 0,05$). A resistência à insulina determinada pelo índice de HOMA foi maior nos animais do grupo H ($p \leq 0,05$), em relação aos controles, e o tratamento com ASE reduziu esse índice ($^{+}p \leq 0,05$), permanecendo entretanto, maior que os controles (figura 15).

Figura 15 - Níveis plasmáticos de insulina e índice de HOMA dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

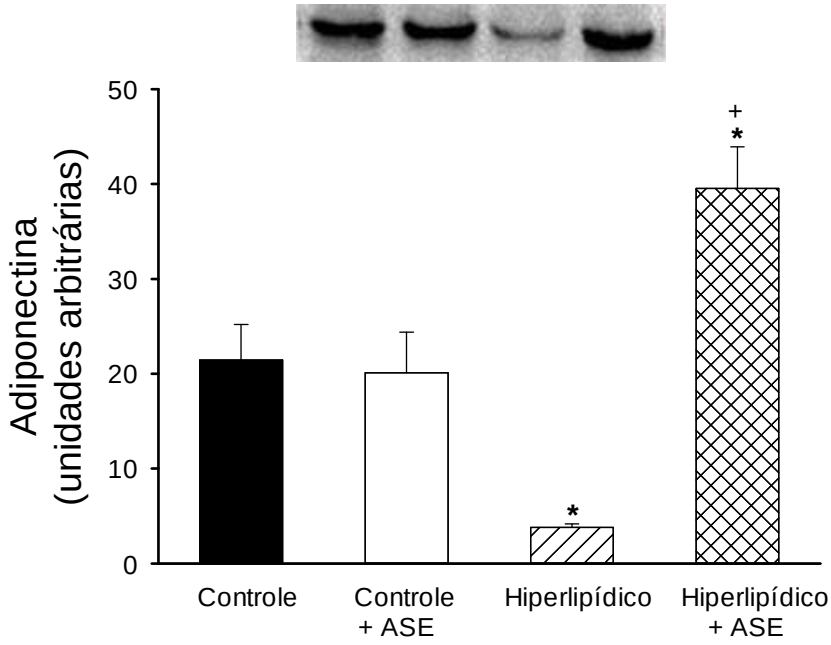


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. * p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.8 **Expressão de adiponectina em tecido adiposo epididimal.**

A expressão da adiponectina foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor em homogenato de tecido adiposo do grupo H, quando comparada aos grupos C e C+ASE. O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) a expressão desta proteína no grupo H+ASE (Figuras 16). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina através de vários mecanismos, corroborando com os resultados anteriores referentes à resistência à insulina.

Figura 16 - Expressão da adiponectina em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

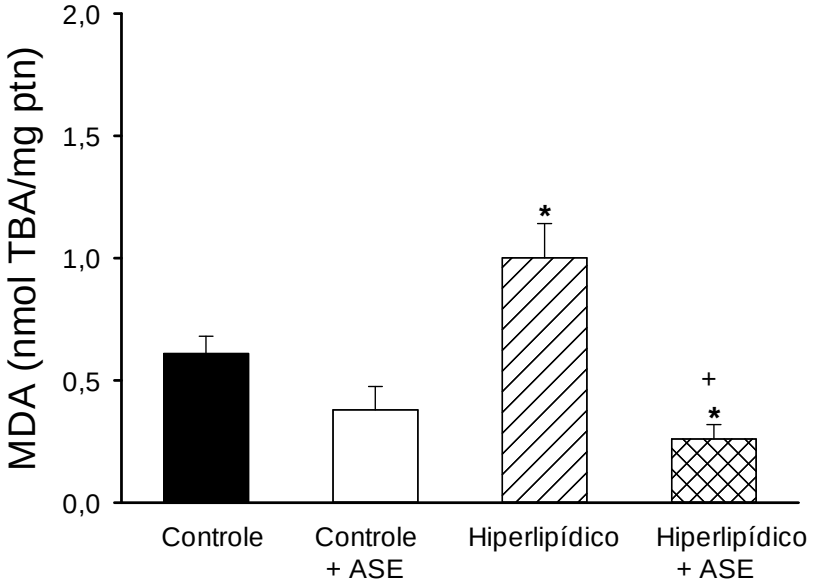


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos. *p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e +p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.9 **Níveis de MDA em tecido adiposo epididimal**

Observou-se um aumento significativo na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (MDA) em amostras de tecido adiposo epididimal do grupo H, quando comparado com os animais controles. O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p<0,05$) os níveis de MDA nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (figura 17).

Figura 17 - Níveis de MDA em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H + ASE

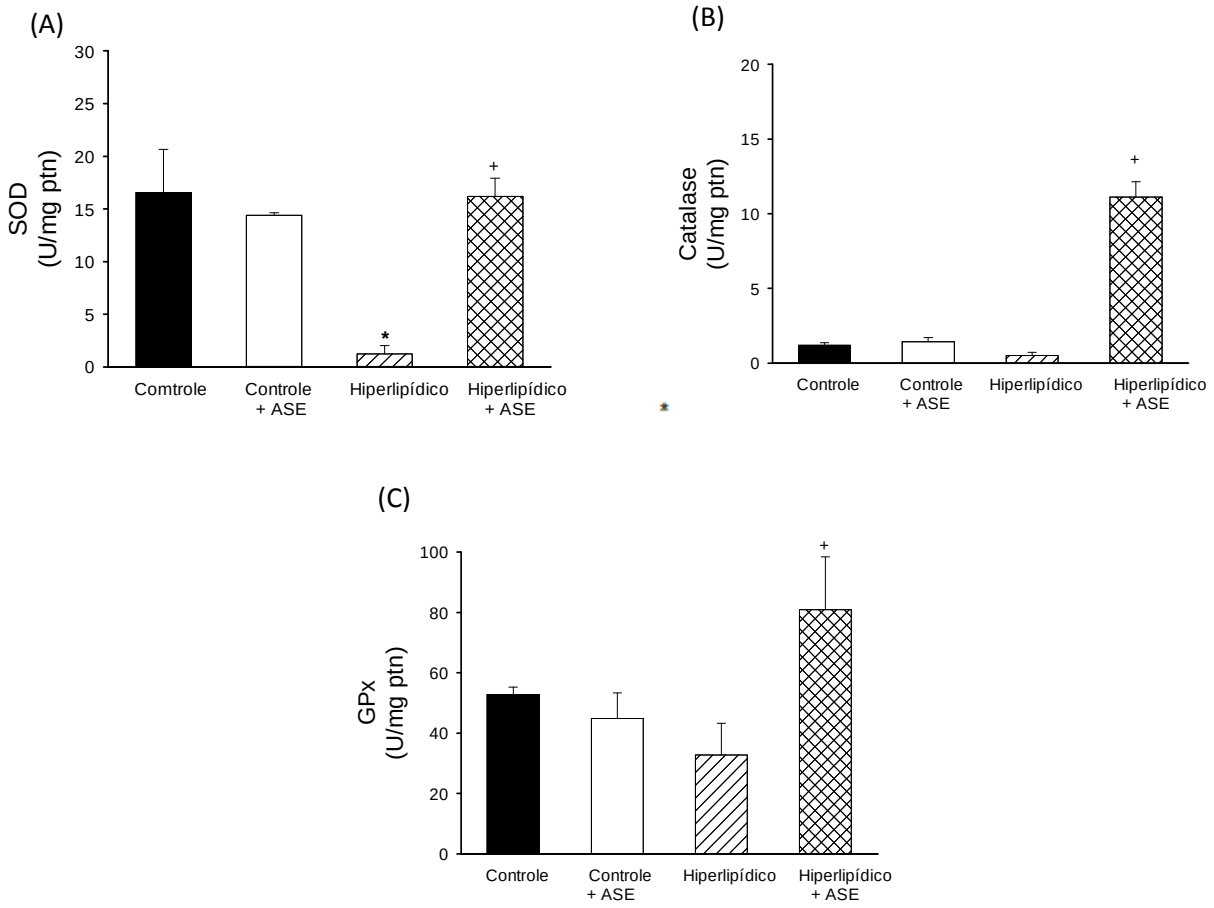


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=6 animais por grupo.* $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.10 **Atividade da SOD, CAT e GPx em tecido adiposo epididimal**

A atividade da enzima antioxidante SOD foi significativamente (p<0,05) menor em amostras de tecido adiposo no grupo H quando comparada aos grupos controles. Não houve diferença significativa entre as atividades da CAT e GPx em amostras de tecido adiposo no grupo H quando comparadas aos controles. No entanto, o tratamento com ASE aumentou significativamente (p<0,05) as atividades destas enzimas no grupo H+ ASE (figura 18 A ,B e C).

Figura 18 - Atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em amostras em tecido adiposo epididimal dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE

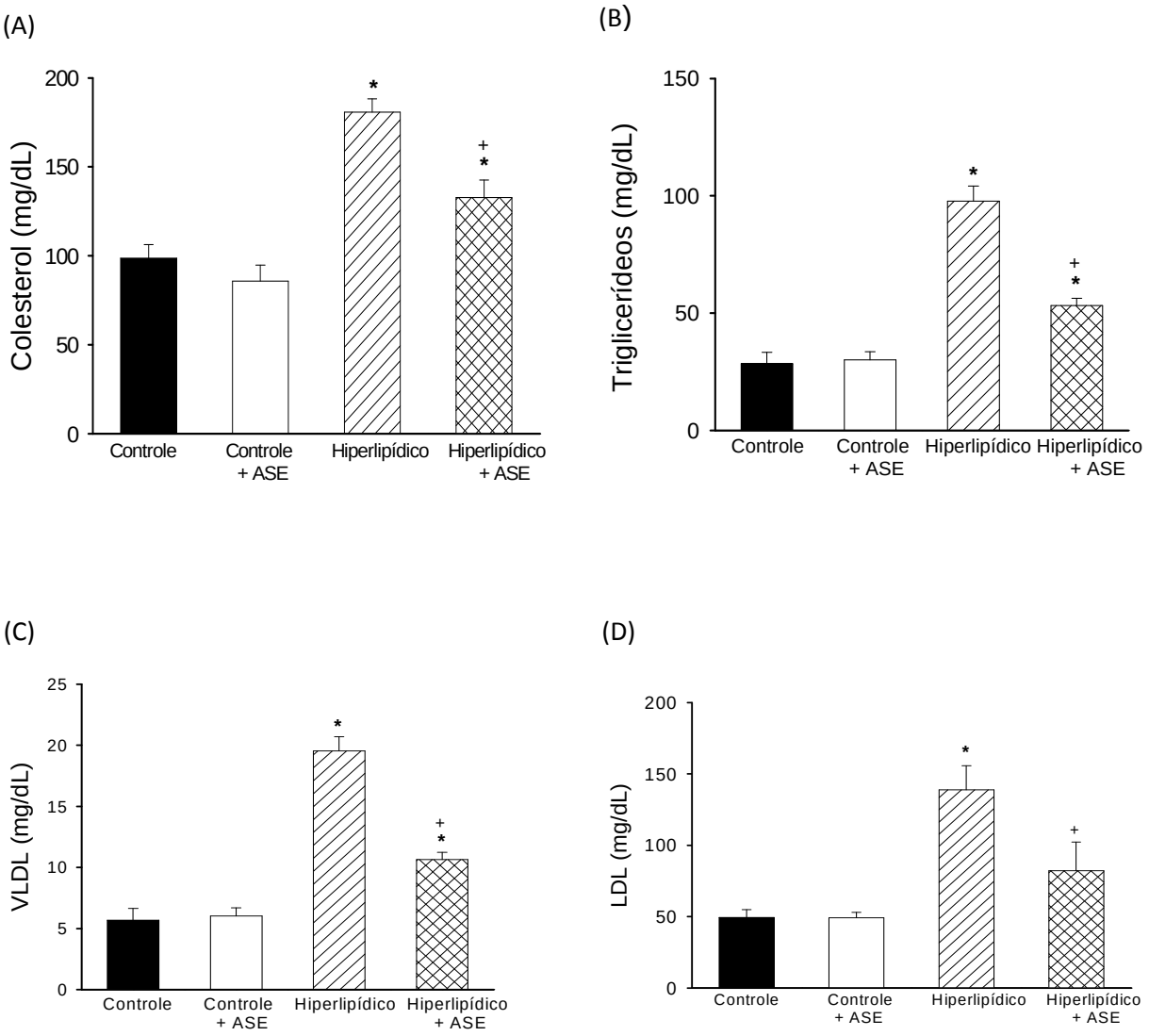


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=6 animais por grupo.* p < 0,05 em relação aos grupos C e C + ASE e +p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.11 **Perfil lipídico plasmático**

As análises do colesterol, triglicerídeos, VLDL e LDL plasmáticos demonstraram que os grupos H e H+ASE apresentaram valores mais elevados (*$p \leq 0,05$) quando comparados aos grupos C e C+ASE. Entretanto, o tratamento com ASE reduziu os níveis lipídicos no grupo H+ASE comparados ao s do grupo H ($^{+}p \leq 0,05$) (figura 19 A, B, C e D).

Figura 19 - Níveis plasmáticos de colesterol (A), triglicerídeos(B), VLDL(C) e LDL(D) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE

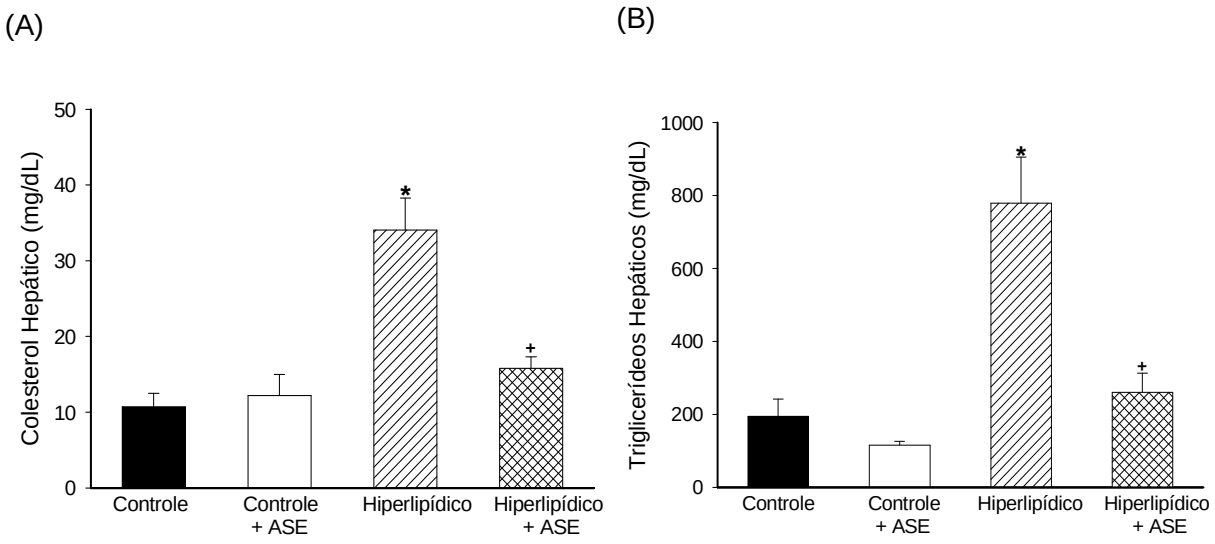


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.
*p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}$p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.12 **Triglicerídeos e colesterol hepáticos**

As análises dos níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos demonstraram que o grupo Hiperlipídico apresentou valores mais elevados (*$p \leq 0,05$) quando comparados aos grupos C e C+ASE. O tratamento com ASE normalizou os valores ($^{+}p \leq 0,05$), no grupo H+ASE (figura 20 A e B).

Figura 20 - Níveis hepáticos de colesterol (A) e triglicerídeos (B) dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.



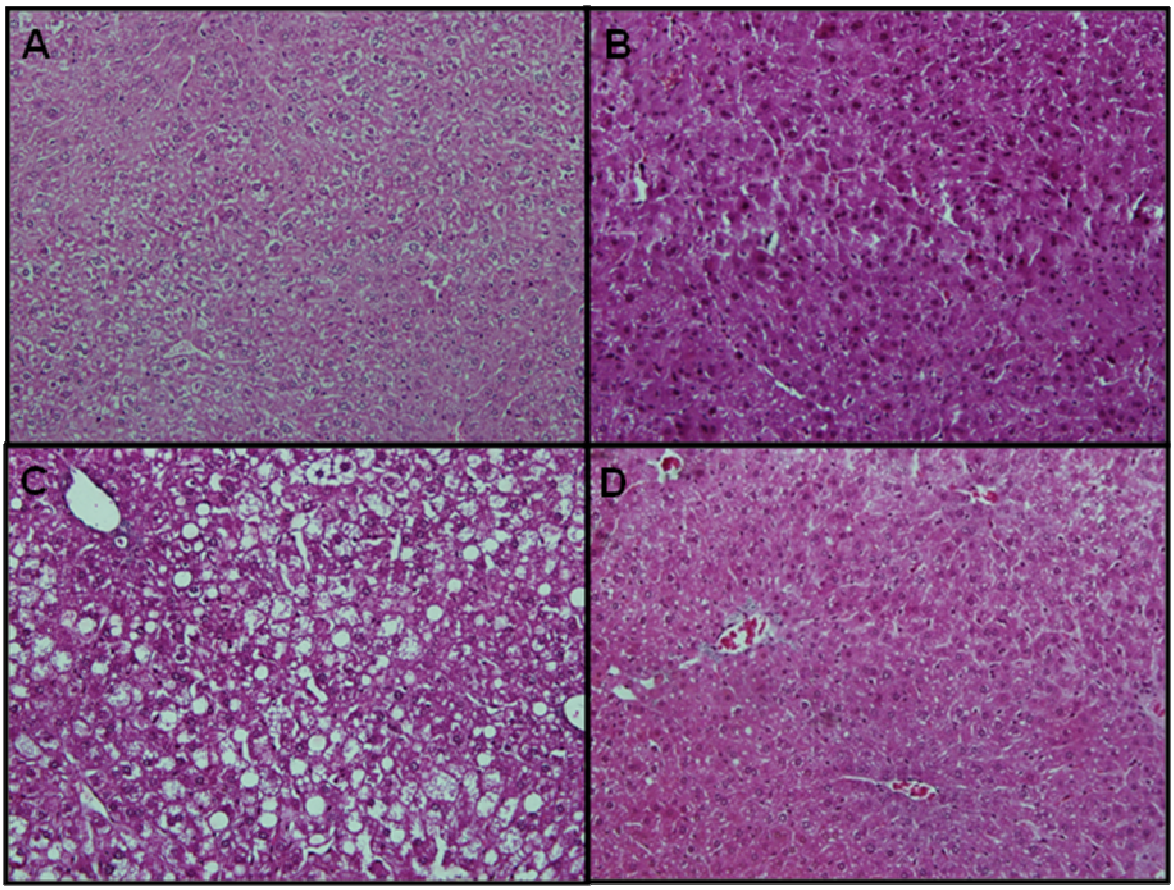
Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.*p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.13 **Histologia hepática**

A ingestão de uma dieta excessiva em gordura determinou um aumento da massa do fígado (mg) no grupo H não tratado em relação aos grupos C e C +ASE (+p ≤ 0,05). C: 1092± 6,21; C+ASE: 882,55± 25; H: 1277,25± 91,8; H+ASE: 887,34± 98,35.

A análise histológica do fígado pelo método de hematoxilina/eosina evidenciou maior quantidade de gotículas de lipídios nos hepatócitos do grupo Hiperlipídico quando comparado aos controles, caracterizando um quadro de esteatose hepática. O tratamento com ASE reduziu o conteúdo lipídico dos hepatócitos do grupo H+ASE (figura 21)

Figura 21 - Esteatose hepática. Cortes representativos do fígado corados com hematoxilina e eosina

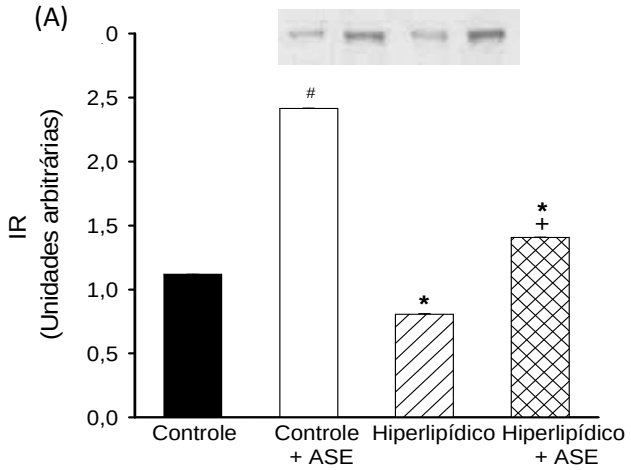


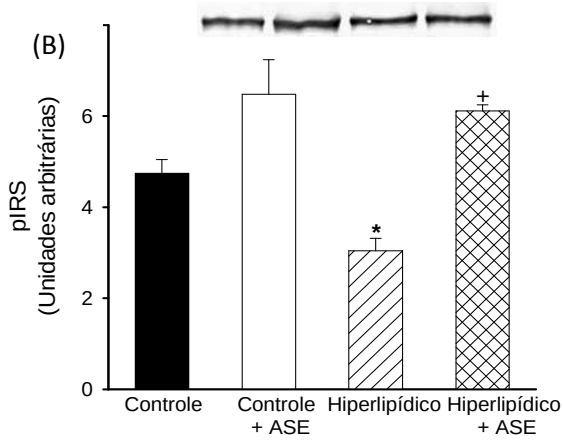
Legenda: Mesma ampliação em todas as imagens. Em (A) grupo controle, (B) controle ASE, (C) hiperlipídico e (D) hiperlipídico ASE.

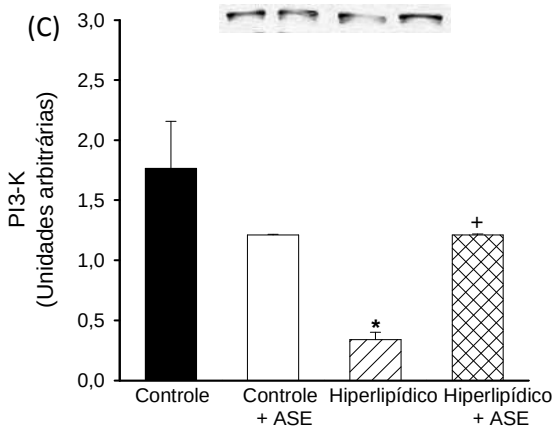
5.14 **Expressão de IR, pIRS1, pAKT ,PI3K e GLUT2 hepáticos**

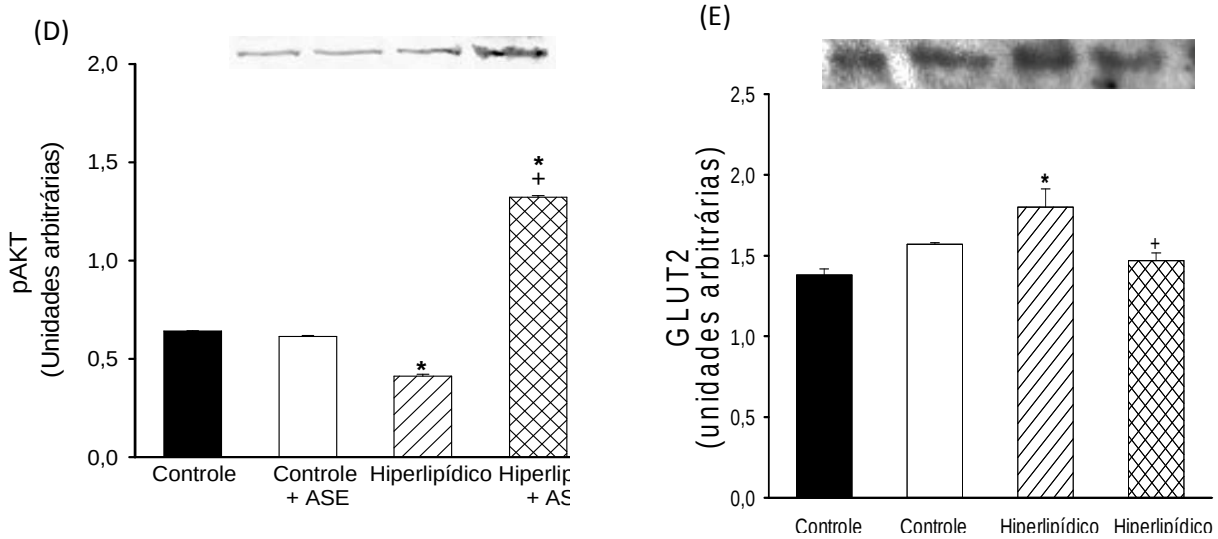
A expressão das proteínas da via de sinalização da insulina, IR, pIRS1, PI3K e pAKT foi significativamente (p<0,05) menor em homogenato de fígado do grupo hiperlipídico, quando comparadas aos controles. O tratamento com ASE aumentou significativamente (p<0,05) as expressões de todas estas proteínas no grupo hiperlipídico +ASE (Figura 22 A, B, C, D). A glicose produzida pela via da gliconeogênese é liberada pelo hepatócito através do GLUT2, cuja expressão foi aumentada no grupo H e normalizada pelo tratamento com ASE (Figura 22 E). O ASE no grupo controle promoveu elevação da expressão da proteína IR em relação aos demais grupos (figura 22 A).

Figura 22 - Expressão da IR (A), pIRS(B),PI3-K (C), pAKT (D), PI3-K (E) e GLUT2 (F) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.







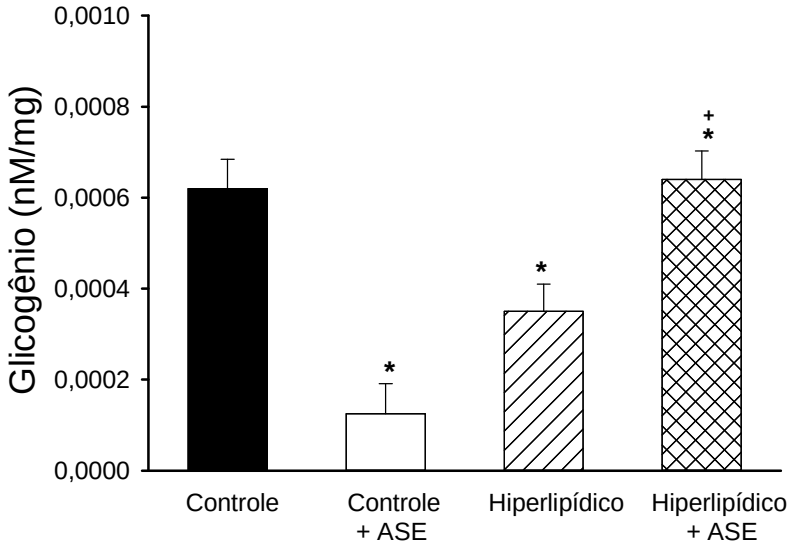


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo.* $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e +$p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.15 **Níveis de glicogênio hepático**

Os níveis de glicogênio foram menores (p<0,05) no Grupo H em relação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com ASE aumentou (p<0,05) os níveis de glicogênio no grupo H+ ASE. Já o ASE no grupo controle promoveu a redução dos níveis de glicogênio (figura23).

Figura 23 - Níveis de glicogênio hepático dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

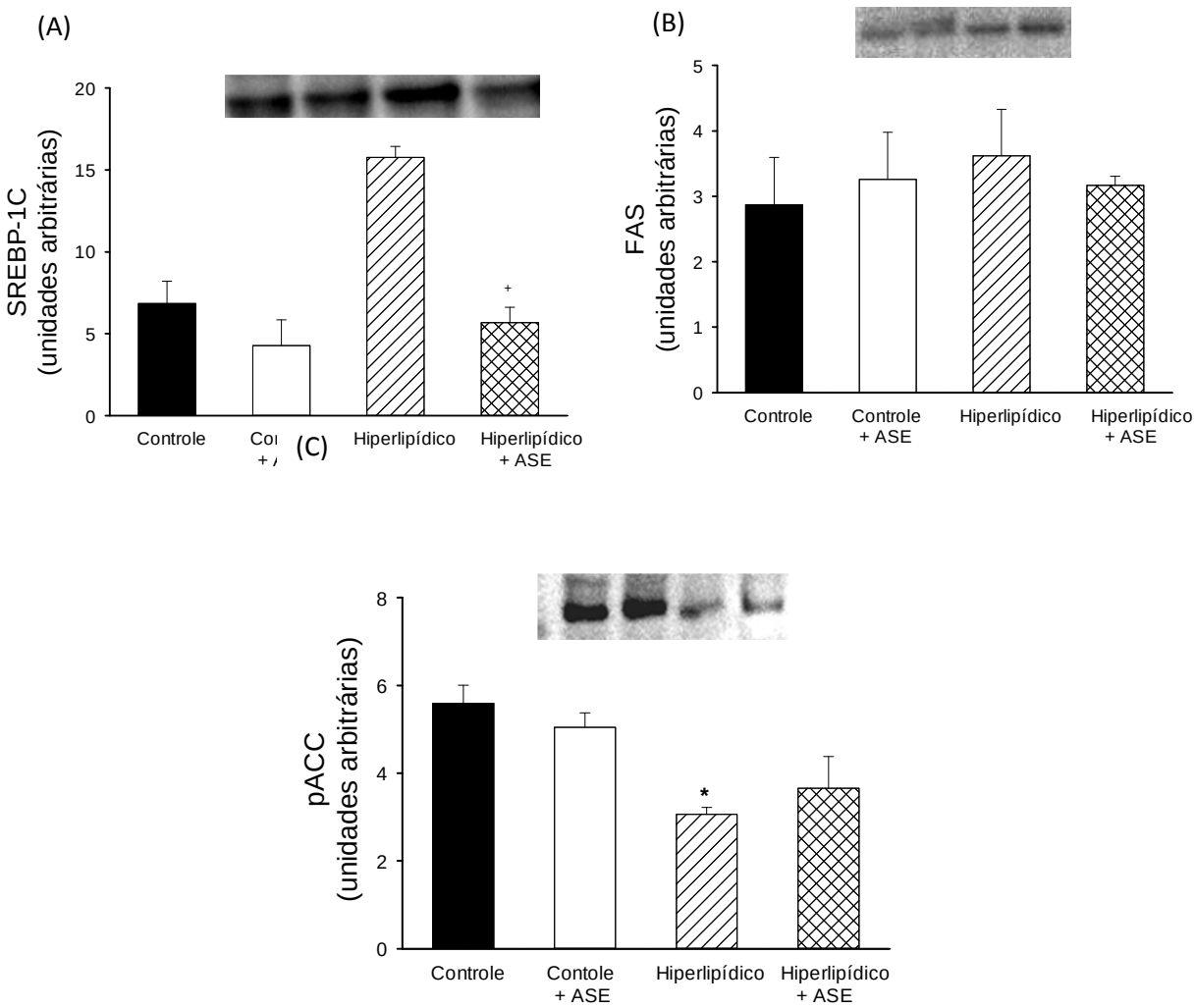


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * p < 0,05 em relação aos grupos C e C + ASE e +p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.16 **Expressão de SREBP-1c, FAS e pACC hepáticos**

A expressão proteica de SREBP-1c (lipogênese) foi significativamente ($p<0,05$) maior em homogenato de fígado do grupo H, enquanto a expressão da proteína pACC foi menor quando comparada aos controles (figura 24 A e C). Não houve diferença significativa na expressão da proteína FAS regulada pela SREBP-1c, no grupo H quando comparado aos controles. O tratamento com ASE reduziu significativamente ($p<0,05$) a expressão da proteína SREBp-1c no grupo H+ASE, mas não alterou de forma significativa a expressão das proteínas FAS e pACC (Figura 24 B).

Figura 24 - Expressão de SREBP-1c (A), FAS (B) e pACC (C) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

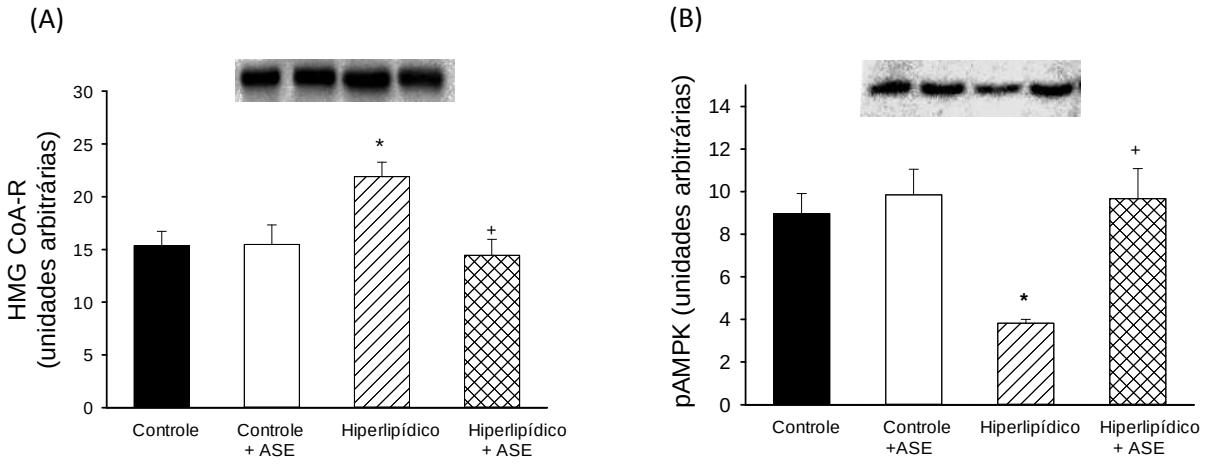


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo.* $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e +$p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.17 **Expressão de HMG CoA-R, pAMPK hepáticos**

A expressão da proteína HMG CoA-R, envolvida na síntese de colesterol foi significativamente maior ($p<0,05$) em homogenato de fígado do grupo hiperlipídico, quando comparada aos controles. Enquanto a expressão da proteína pAMPK, proteína que atua inibindo a síntese de colesterol foi significativamente menor no grupo hiperlipídico quando comparado aos controles. O tratamento com ASE alterou significativamente ($p<0,05$) as expressões de todas estas proteínas no grupo hiperlipídico +ASE (Figura 24 A e B).

Figura 25 - Expressão do HMG CoA-R (A) e pAMPK (B) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

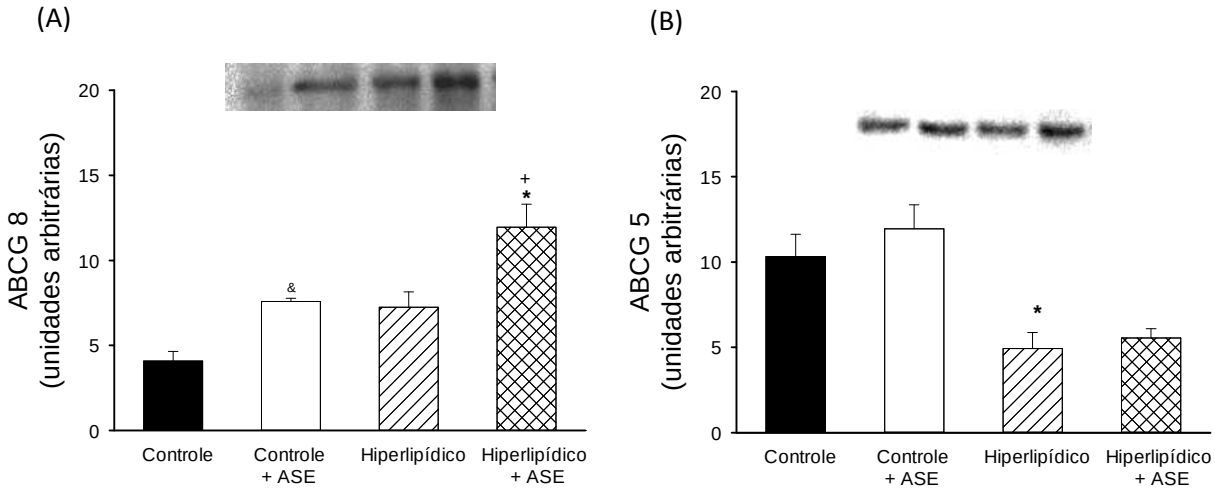


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo.* $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5.18 **Expressão de ABCG5 e ABCG8**

A expressão do transportador ABCG5 envolvido na eliminação hepática de colesterol foi significativamente (p<0,05) menor em homogenato de fígado do grupo H, quando comparada aos controles. Não houve diferença significativa da expressão de ABCG8 no grupo H quando comparado aos controles. O tratamento com ASE aumentou significativamente (p<0,05) a expressão da proteína ABCG8 no grupo H+ASE (Figura 26 B), entretanto, não alterou de forma significativa a expressão de ABCG5 (Figura 26 A).

Figura 26 - Expressão do ABCG8 (A), e ABCG5 (B) em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

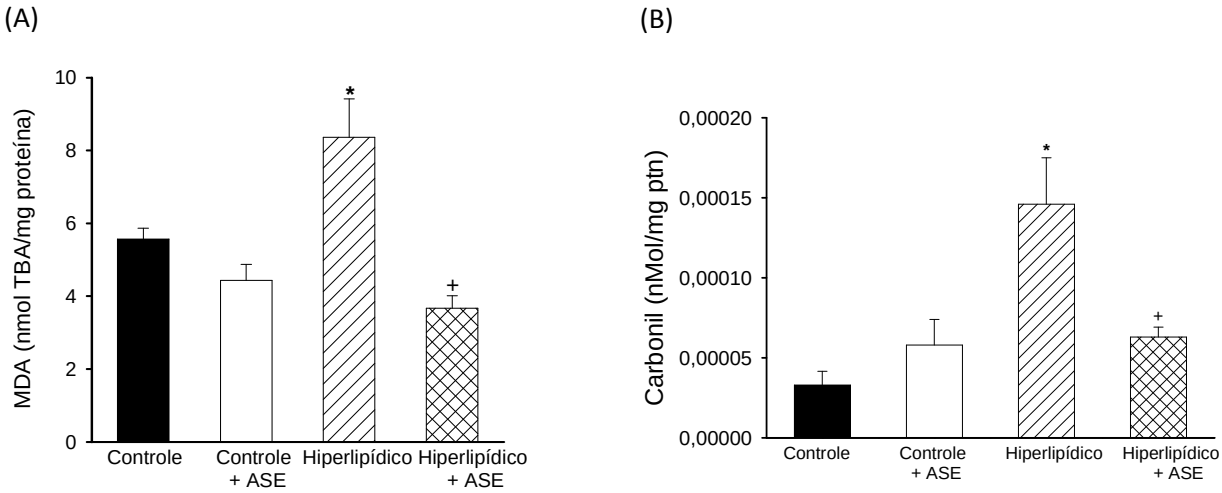


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * p < 0,05 em relação aos grupos C e C + ASE , +p < 0,05 em relação ao grupo H e & p < 0,05 em relação ao grupo C.

5.19 **Níveis de MDA e carbonilação de proteínas no fígado.**

Observou-se um aumento significativo (p<0,05) na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (MDA) e na carbonilação de proteínas em amostras de fígado do grupo H, quando comparados com os animais controles. O tratamento com ASE reduziu significativamente (p<0,05) os níveis de MDA e de carbonilação de proteínas no grupo H+ASE (figura 27 A e B).

Figura 27 - Níveis de MDA e carbonilação de proteínas em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE

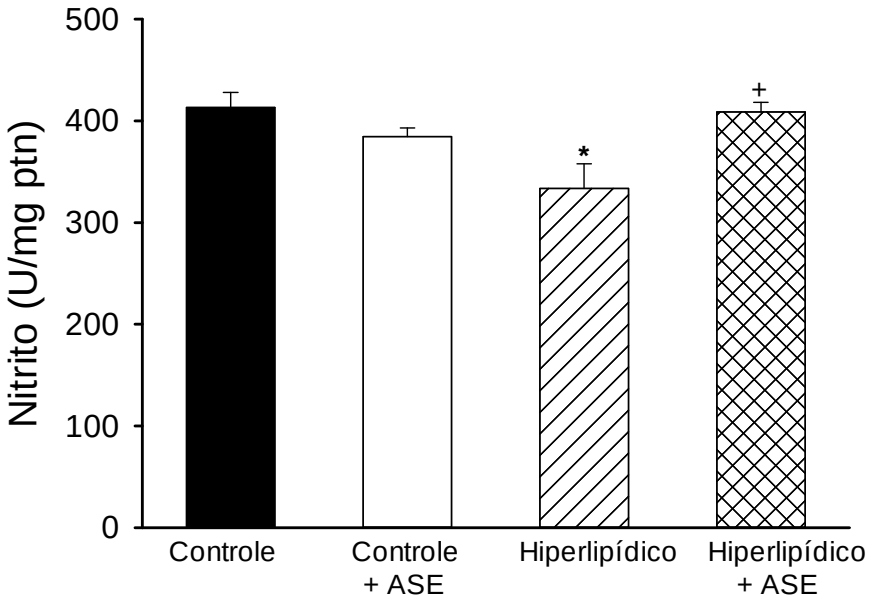


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * p < 0,05 em relação aos grupos C e C + ASE e +p < 0,05 em relação ao grupo H.

5.20 **Níveis de nitrito no fígado**

Os níveis de nitrito foram significativamente menores em amostras de fígado do grupo H, quando comparado com os grupos controles. O tratamento com ASE aumentou significativamente os níveis de nitrito no grupo H+ASE.

Figura 28 - Níveis de nitrito em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

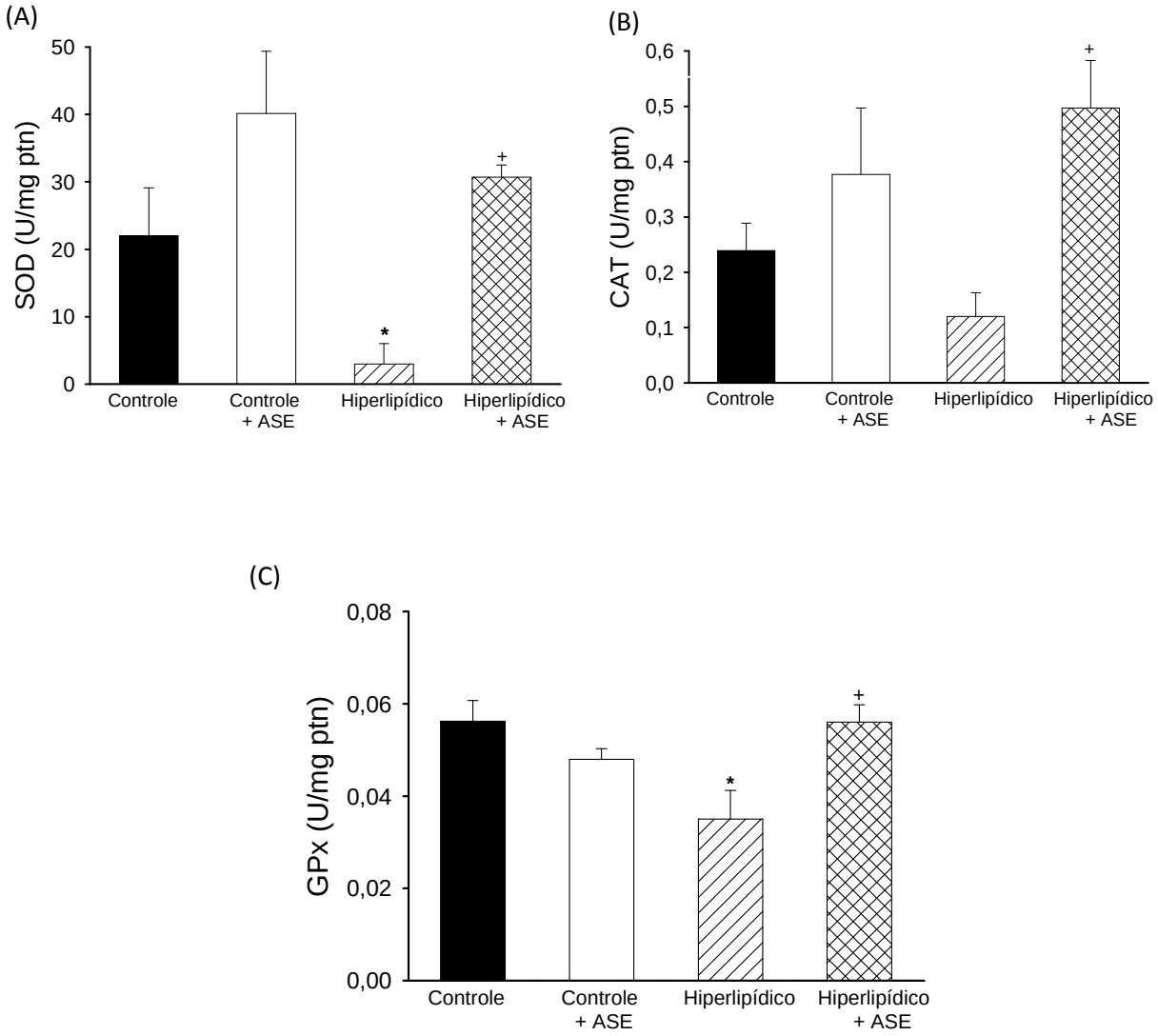


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H

5.21 Atividades de SOD, CAT e GPx em homogenato de fígado.

As atividades das enzimas SOD, CAT e GPx foram significativamente ($p<0,05$) menores em amostras de fígado no grupo H quando comparado aos controles. O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p<0,05$) as atividades destas enzimas no grupo H+ASE (figura 29 A, B e C).

Figura 29 - Atividade da SOD, CAT e GPx em homogenato de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.

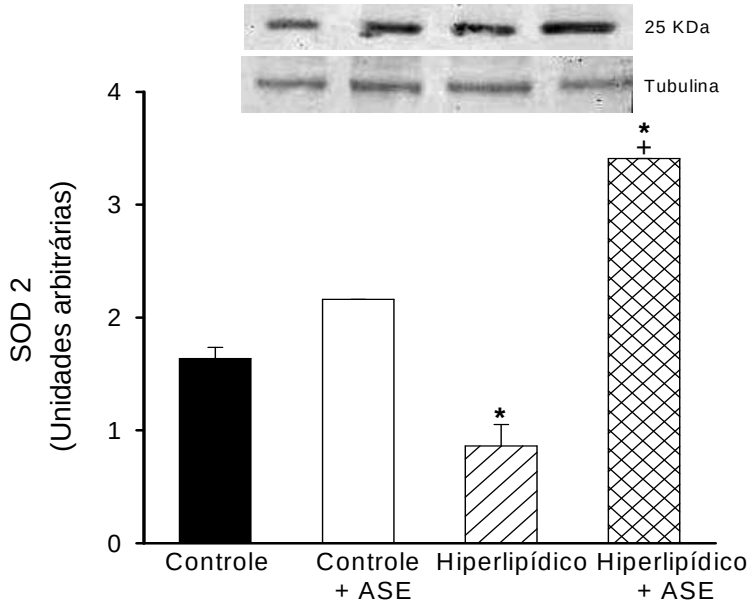


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

5. 22. Expressão da SOD-2 hepática

A expressões de SOD-2 foi significativamente ($p<0,05$) menor em homogenato de fígado do grupo hiperlipídico, quando comparada aos controles. O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p<0,05$) a expressão de SOD-2 no grupo hiperlipídico +ASE (Figura 30).

Figura 30 - Expressão da SOD-2 em amostras de fígado dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE.



Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e +$p < 0,05$ em relação ao grupo H.

6 **DISCUSSÃO**

Estudos prévios realizados pelo nosso laboratório demonstraram que o ASE, um extrato hidro-alcoólico obtido do caroço do açaí rico em polifenóis *(Euterpe oleracea Mart*.), possui atividade vasodilatadora dependente de endotélio (Rocha e cols., 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha e cols., 2008). Em virtude do aumento da prevalência da SM (Mokdad e cols., 2003), identificada como uma associação de fatores de risco, como a obesidade, RI, HAS e dislipidemia (Putnam e cols., 2012), resolvemos investigar essas alterações e suas graves consequências para o fígado, como a DHGNA, assim como, o efeito do ASE sobre as mesmas, em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

Nossos resultados demonstram que o grupo hiperlipídico, durante o fornecimento da dieta, consumiu maior quantidade de ração e recebeu uma grande quantidade de energia e, consequentemente, apresentou, não só um peso maior após o término do período de estudo, como também um aumento da massa de gordura visceral. Estes dados corroboram estudos anteriores que observaram a suscetibilidade do camundongo C57Bl/6 alimentado com uma dieta com 60% de gordura em desenvolver alguns componentes da SM (Gallou-Kabani *et al*., 2005), assim como, outros modelos animais de desordens metabólicas utilizando dietas ricas em gordura (Buenttner *et al*., 2007). O maior consumo de ração hiperlipídica e ganho de massa croporal e adiposidade explica o aumento dos níveis plasmáticos de leptina observado no grupo hiperlipídico. A leptina é um dos principais hormônios envolvidos nas complicações clínicas da obesidade, sendo produzido e secretado na circulação, principalmente pelo tecido adiposo branco, em níveis proporcionais à massa desse tecido.

O principal sítio de ação da leptina é o hipotálamo, onde este hormônio atua como fator de saciedade estimulando a liberação de neuropeptídios anorexigênicos e inibindo neuropeptídios orexigênicos (Willians e cols., 2004). A leptina possui ainda uma sinalização parácrina e/ou autócrina sobre o adipócito inibindo a lipogênese (Fruhbeck GR., 2002). As concentrações plasmáticas de leptina aumentadas no grupo hiperlipídico devem ser decorrentes de uma maior síntese e secreção dessa adipocina pelo tecido adiposo. A hiperleptinemia na obesidade está geralmente relacionada com uma resistência ao efeito anorexigênico da leptina (Considini e

cols., 1996). Portanto, a hiperleptinemia observada nos animais obesos reflete seus depósitos de gordura aumentados e predispõe ao desenvolvimrento de resistência central à leptina (Faria e cols., 2013).

Notavelmente, o tratamento com ASE reduziu significativamente os níveis séricos de leptina, proporcionando também o restabelecimento da sensibilidade à leptina, demosntrado pela redução do consumo de energia e pelo menor acúmulo de gordura. O mecanismo preciso desse efeito ainda não está estabelecido, podendo envolver os circuitos de balanço energético associados à diminuição de peptídeos orexigênicos ou aumento do peptídeo anorexigênico POMC, no núcleo arqueado (de Kloet e cols., 2009).

verificamos o aumento da formação de MDA e uma atividade reduzida da SOD, a enzima da linha de frente da defesa antioxidante, responsável pela remoção do O_2^- em tecido adiposo epididimal de animais do grupo hiperlipídico. De fato, estudos tem demosntrado que o aumento de EROs nos adipócitos provoca desregualação na produção de adipocinas como a leptina na obesidade (Otani., 2011). Outros estudos sugerem que o NO é um importante regulador da lipólise induzida pela leptina (Frühbeck & Gómez - Ambrosi, 2001). A biodisponibilidade de NO depende não somente de sua síntese como também de sua inativação, mediada por EROs. Dessa forma o NO liberado pode ser inativado ao reagir, principalmente, com o O_2^- (Zhang e cols., 2009). Então, presumi-se que a atividade lipolítica nos adipócitos esteja diminuida em parte pelo quadro de estresse oxidativo observado no grupo hiperlipídico.

O ASE reduziu o peso corporal e a massa de gordura visceral no grupo hipelipídico +ASE, indicando que este extrato rico em catequina e proantocianidinas poliméricas (Soares de Moura e cols., 2012), proporciona um efeito benéfico sobre a obesidade. Como a gênese da obesidade é multifatorial, não há como inferir uma única hipótese que contribua para a compreensão desse achado, mas provavelmente o ASE ao promover uma redução na secreção da leptina e ao diminuir a formação de MDA e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes contribuiu para a redução da lipogênse e para uma maior sensibilidade à leptina. Estudo anterior demonstrou que a antocianina extraída do milho roxo normalizou a hiperleptinemia e obesidade em camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta

hiperlipídica sugerindo que a antocianina que também é antioxidante apresenta um efeito anti-obesidade (Tsuda e cols., 2003).

Outro aspecto importante encontrado nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica foi a expressão reduzida de adiponectina em tecido adiposo epididimal, o que reflete uma sensibilidade à insulina prejudicada, através de vários mecanismos, incluindo a diminuição no gasto de energia e oxidação de ácidos graxos, elevação na produção de glicose hepática e redução na utilização da glicose muscular (de Kloet e cols., 2010). A hipoadiponectinemia é uma característica clínica da DHGNA, geralmente associada ao quadro de RI. O papel crítico desse hormônio foi reforçado por um estudo demonstrando esteatose hepática espontânea em camundongos deficientes de adiponectina (Zhou e cols., 2008). Neste estudo, os animais do grupo hiperlipidico tratados com ASE apresentaram aumento da expressão da adiponectina. Esta dado é reforçado por estudos sobre a regulação do tecido adiposo por polifenóis que demonstraram que as antocianinas apresentam um efeito anti-obesidade e melhoram a função dos adipócitos por aumentar a expressão da adiponectina, *in vitro* e em sistemas *in vivo* (Tsuda., 2008).

Os níveis de glicose verificados pelo método de dosagem da glicemia em jejum do grupo hiperlipídico, assim como a quantidade de insulina secretada estão aumentados, o que está de acordo com trabalhos previamente publicados (Gallou-Kabani e cols., 2005; Pauli e cols., 2007; Buttner e cols., 2007; Matsuazawa-nagata e cols., 2008; Bose e cols., 2008; Tao e cols., 2009), demonstrando que uma dieta com alto teor de gordura é capaz de induzir hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI. A intolerância à glicose vista no grupo hiperlipídico pode ser desencadeada por um aumento na secreção de insulina na tentativa de compensar a hiperglicemia. Porém, a concentração plasmática de glicose continua a subir, pela diminuição da captação por tecidos periféricos e pelo aumento da produção de glicose hepática (Veloso e cols., 2006).

Observamos também alteração na sinalização da insulina no fígado, demosntrado pela redução do conteúdo de IR, pIRS1, PI3K, e pAKT. De modo semelhante, Araújo e colaboradores em 2007, observaram alterações em todas as etapas da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos submetidos á dieta hiperlipídica. A RI é uma anormalidade chave associada à SM (Devaskar & Thamotharan., 2007), pois a secreção de insulina pelas células β pancreáticas

representa o efeito hormonal mais determinante na manutenção do equilíbrio metabólico de carboidratos, lipídeos e proteínas.

Além disso, a insulina é um hormônio que exerce efeito antioxidante pela supressão da geração de EROs. Entretanto, com o prejuízo na ação da insulina, provocado pela resistência a este hormônio, quadro frequentemente encontrado em obesos, pode ocorrer aumento das EROs (Dandona e cols., 2005). Esse quadro foi observado no presente estudo, em que houve, não só o aumento significativo nos níveis de MDA em amostras de fígado do grupo hiperlipídico, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica, como também o aumento da carbonilação de proteínas, processo em que as proteínas sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EROs, e que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais (Yu, 1994). Outro aspecto que corrobora esse achado é a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e a redução do conteúdo da SOD2, enzima antioxidante encontrada na mitocôndria, mais precisamente na matriz mitocondrial, observada no fígado do grupo hiperlipídico. Há evidências que sugerem que o estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo precede o aparecimento da RI e obesidade induzidas pela dieta hipelipídica (Naoto e cols., 2008).

Prejuízo na ação da insulina, incluindo a ativação da AKT e captação de glicose (Evans, 2007) pelo aumento de EROs, pode levar a ativação da Gicogênio-sintase- quinase 3 (GSK3), e uma menor atividade da enzima glicogênio sintase, diminuindo assim, a quantidade de glicogênio hepático, observado no grupo hiperliídico. A elevação da expressão do GLUT2 no fígado pode ser em decorrência do aumento da gliconeogênese, verificada no estado de RI, em que há uma elevada produção e liberação de glicose para o plasma (Seyer e cols., 2013). Portanto, essa associação poderia explicar a etiologia da RI desencadeada pela obesidade.

O ASE reduziu os níveis de glicose e insulina plasmáticos, sugerindo que o extrato apresenta efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperinsulinêmico, reforçando estudos prévios de nosso grupo neste modelo experimental (Oliveira e cols., 2010). Os achados obtidos no presente estudo sugerem que este efeito benéfico de ASE deve-se em grande parte ao aumento da expressão das proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina no fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica proporcionando uma melhora da sensibilidade à insulina.

A diminuição do peso corporal e adiposidade induzida pelo ASE também poderiam explicar em parte a melhora da RI pelo extrato, já que a obesidade pode levar à RI, intolerância à glicose e diabetes (Bastard e cols., 2006). Grassi, em 2008 mostrou que polifenóis aumentam a sensibilidade à insulina e a função das células beta. Além disso, sabe-se que os polifenóis podem melhorar a RI aumentando a biodisponibilidade de NO e diminuindo a formação de EROS (Grassi, 2008). Nossos resultados demonstram que o tratamento com ASE reduziu os níveis de MDA e a carbonilação de proteínas no fígado, e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes e do conteúdo de SOD2 no grupo hiperlipídico+ASE, sugerindo que o efeito antioxidante do ASE deve contribuir para a redução da RI.

O NO parece modular a sensibilidade à insulina, uma vez que inibidores da NOS diminuem (Roy e cols, 1998) e os doadores de NO aumentam o transporte de glicose no músculo esquelético (Balon 1997). Além disso, o NO aumenta a expressão de GLUT-4 no músculo esquelético por mecanismos dependentes de GMPc e AMPK (Lira e cols., 2007). Portanto, como o ASE estimula a síntese de NO (Rocha e cols., 2007, 2008) sugerimos que a sensibilidade à insulina induzida pelo tratamento com o ASE também poderia ser mediada, em parte, pelo NO. No presente estudo verificamos o aumento dos níveis de NO_2 hepático no grupo hiperlipídico+ASE, indicando que há maior disponibilidade de NO.

Houve um aumento significativo dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, VLDL e LDL plasmáticos no grupo dos camundongos C57BL/6 que receberam dieta hiperlipídica. O resultado do perfil lipídico plasmático também foi observado por alguns estudos que demonstram que esse modelo animal submetido à dieta rica em ácidos graxos saturados desenvolve alterações no perfil lipídico caracterizado pela elevação dos níveis plasmáticos destes lipídeos (Tao e cols., 2009; Gallou-Kabani e cols., 2007; Molnar e cols., 2005). Em 1978, Bernstein e colaboradores sugeriram um mecanismo patogênico para o desenvolvimento da dislipidemia, em que um estado de resistência à captação de glicose conduz à hiperinsulinemia que, por sua vez, aumentaria a secreção de VLDL e consequentemente de lipoproteínas de baixa densidade ricas em triglicerídeos, aumentando assim as concentrações plasmáticas desses lipídeos. Além disso, uma menor captação hepática de VLDL, LDL e remanescentes pode também representar um acúmulo destas lipoproteínas no plasma (Gill e cols., 2004).

Em nosso estudo demonstramos que o ASE reduziu o colesterol total, triglicerídeos, VLDL e LDL. Provavelmente esse efeito se deve aos polifenóis presentes no extrato, uma vez que, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com extrato da polpa do açaí (Souza e cols., 2012) ou extrato do caroço do açaí (Oliveira e cols., 2010) houve redução dos níveis de colesterol sérico. Da mesma forma, polifenóis provenientes do limão proporcionou redução dos níveis de triglicerídeos e da RI (Fukuchi., 2008), neste modelo. Além disso, os polifenóis provenientes da casca da uva protegem a prole adulta de ratas submetidas à dieta com alto teor de gordura durante a lactação, reduzindo os níveis de triglicerídeos (Emiliano e cols., 2011).

É amplamente aceito que o excesso nutricional, principalmente através do consumo de uma dieta rica em gordura saturada, pode ocasionar danos ao fígado pelo acúmulo de colesterol e triglicerídeos hepáticos (Hanley e cols., 2005). A enzima HMGCoA redutase é o principal ponto de regulação na via de síntese do colesterol (Nelson & Cox, 2006). A atividade dessa enzima pode ser regulada pela proteína AMPK, que em seu estado fosforilado e ativo, promove inativação da enzima HMGCoa-redutase (Hardie e cols., 1997). Um estudo recente, realizado em camundongos alimentados com uma dieta com 60% de gordura durante 5 semanas, demonstrou um aumento significativo da expressão e da atividade da enzima HMGCoA redutase, que pode desempenhar um importante papel no acúmulo de colesterol no fígado (Wu e cols., 2013).

Em nosso estudo, ao avaliarmos a influência da dieta hiperlipídica e a ação do ASE sobre o metabolismo lipídico hepático, observamos um aumento significativo da expressão da HMGCoa-redutase e uma menor expressão da AMPK fosforilada no grupo hiperlipídico. Estes dados sugerem que em animais obesos ocorre uma redução da regulação negativa exercida pela pAMPK sobre a síntese de colesterol, resultando no aumento significativo do colesterol hepático. Todas essas alterações foram corrigidaspelo tratamento com ASE.

É importante ressaltar que em estudo recente realizado em camundongos submetidos à dieta hipérlipídica, o tratamento com extrato da polpa do açaí (Souza e cols., 2012), nãointerferiu com a expressão da HMGCoa-redutase, o que sugere que o extrato realizado a apartir da polpa apresenta propriedades distintas daquele realizado a partir do caroço do açaí. Esta distinção se deve provavelmente ao

conteúdo polifenólico dos extratos, já que, Kwon e cols. (2010) demonstraram que a cianidina, principal componente presente no extrato da polpa, mas não no extrato do caroço do açaí que pe rico em catequina e proantocianidinas não inibiu a HMGCoa-redutase *in vitro*. A remoção do excesso de colesterol do corpo é imprescindível para a manutenção da sua homeostase. Os transportadores ABCG5 e ABCG8 são responsáveis pelo efluxo do colesterol na bile (Souza e cols., 2012). No presente estudo verificamos que existe uma correlação entre a diminuição na expressão do transportador ABCG5 e o aumento do colesterol hepático no grupo hiperlipídico em relação ao grupo controle. Então, podemos presumir que a maior síntese e menor excreção de colesterol contribuam para o seu acúmulo no fígado. Essa análise é corroborada por Yamazaki e colaboradores ao demonstrarem em 2011, que camundongos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura apresentam uma menor expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8, além de maior concentração de colesterol no fígado. É possível que o ASE possa interferir com o transporte de colesterol através do transportador ABCG8 no fígado, já que a expressão do mesmo foi significativamente aumentada, corroborando com os achados de Souza e cols. (2012), em camundongos obesos tratados com extrato da polpa do açaí.

Também foi demonstrado no presente estudo que os animais do grupo hiperlipídico apresentaram hepatomegalia, acúmulo de triglicerídeos e esteatose hepática. A explicação convencional para esse quadro é que a obesidade e a RI alteram a síntese e o transporte de triglicerídeo, além de aumentar a taxa de lipólise no tecido adiposo e o transporte de ácidos graxos livres para dentro do fígado (Milanski e cols., 2012). Portanto, o aparecimento de DHGNA pode decorrer do aumento da expressão de SREBP-1c favorecendo a lipogênese *de novo* (Byrne e cols., 2009), como observado nos animais que se alimentaram com dieta hiperlipídica.

O SREBP-1c permanece sensível à insulina levando a um aumento do RNA mensageiro para importantes enzimas lipogênicas tais como ACC e FAS (Postic & Girard., 2008). Além disso, sabe-se que a pAMPK no fígado atua inibindo a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, através da inativação da enzima ACC (Zang e cols., 2008). No presente estudo foi observado um aumento da expressão da proteína SREBP-1c e redução da expressão da enzima pACC (forma inativa de

ACC), no grupo hiperlipídico. Portanto, é possível que o aumento dos níveis de insulina aumente a ativação de SREBP-1c e a redução da pAMPK leve a redução da pACC. Consequentemente, o aumento da atividade da ACC não fosforilada (forma ativa) resulta no aumento da lipogênese. Apesar de não ter sido observado aumento da enzima FAS no grupo hiperlipídico, estudos demonstram que a dieta rica em lipídios saturados ocasiona uma maior expressão de enzimas lipogênicas (Soy e cols, 2014).

Nosso estudo demonstrou que o ASE pode melhorar de forma surpreendente os níveis de triglicerídeos e colesterol hepático, além de ocasionar um menor acúmulo de gordura no fígado. Tomando em conjunto nossos resultados até aqui, podemos sugerir que este efeito benéfico do ASE no fígado de animais do grupo hiperlipídico+ ASE, pode ser explicado por uma melhora na RI, e subseqüente, redução da expressão de SREBP-1c, da HMGCoA-R (Qi e cols., 2014) e maior expressão de AMPK fosforilada, reduzindo a lipogênese, além da maior expressão do transportador ABCG8, o qual exerce um importante papel na excreção direta do colesterol na bile (de Souza e cols., 2012). Nossa hipótese é reforçada por evidências recentes de que a polpa de açaí pode modular a expressão dos genes envolvidos na homeostase do colesterol no fígado e aumentar a excreção fecal, reduzindo assim o colesterol sérico (de Souza e cols., 2012). Previamente, Bose e cols. (2008), demonstraram que a catequina extraída do chá verde diminui de forma significativa os triglicerídeos hepáticos em camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta hiperlipídica sugerindo que a catequina apresenta um efeito benéfico contra o acúmulo de lipídios no fígado.

Outro ponto importante da regulação do metabolismo lipídico no fígado é a função oxidativa da mitocôndria. Vários estudos em modelos animais apontam para uma importante relação entre acúmulo de triglicerídeos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Beriche e cols., 2006; Perez-Carretas e cols., 2003). Acredita-se que a hiperglicemia e elevados níveis de ácidos graxos saturados podem promover maior ativação da NADPH oxidade e consequentemente maior geração de EROs (Carmiel-Haggai e cols., 2005). As mitocôndrias continuamente expostas a altos níveis de EROS podem sofrer consequências deletérias, como dano na cadeia respiratória, no genoma mitocondrial e nos lipídios e proteínas de membrana (Ricci e cols., 2008). Essas alterações estruturais e funcionais nas mitocôndrias podem

contribuir para a redução das atividades realizadas por essa organela como a beta oxidação levando a um maior acúmulo de ácidos graxos livres (Rector e cols., 2010). Associado a este processo há uma menor formação de enzimas antioxidantes (Carmiel-Haggai e cols., 2005) levando a um desequilíbrio entre formação de EROS e proteção antioxidante caracterizando o estresse oxidativo.

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

O efeito do ASE na redução dos níveis de triglicerídeos parece envolver sua ação antioxidante. As EROs afetam o metabolismo da insulina resultando em RI e consequentemente desencadeia uma série de anormalidades, como maior expressão de SREBP-1c e consequentemente maior expressão de genes lipogênicos levando a maior síntese de ácidos graxos (Shimomura e cols., 2000). O tratamento com ASE foi capaz de melhorar o sistema de defesa antioxidante e de reduzir o dano oxidativo de forma expressiva, o que provavelmente levou a uma melhora na sensibilidade insulínica e nas ações subsequentes, ou seja, uma menor expressão do fator SREBP-1c, ocasionando menor síntese de triglicerídeos. Estes dados corroboram com um estudo anterior que avaliou o efeito do polifenol extraído da lichia sobre o estresse oxidativo e metabolismo lipídico em um modelo de diabetes tipo 2, onde foi observada uma redução significativa da peroxidação lipídica, tanto no plasma quanto no fígado, assim como, do conteúdo lipídico hepático e da expressão da enzima SREBP-1c (Noh e cols., 2011).

Além disso, a menor síntese de triglicerídeos e diminuição da glicemia deve ter modulado positivamente o estado redox da cadeia respiratória na mitocôndria hepática restabelecendo a beta oxidação dos ácidos graxos para a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e diminuindo, assim, o seu acúmulo e consequentemente a síntese de triglicerídeos. De fato, Park e colaboradores (2013) investigaram a influência do extrato da casca de uva rico em polifenóis (GSE) sobre a esteatose hepática em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e constataram que a suplementação com GSE reduziu significativamente os lipídeos hepáticos e reverteu as alterações induzidas pela dieta hiperlipídica na expressão de genes envolvidos na lipogênese e na β-oxidação no fígado. Nosso

estudo mostrou que o ASE previni diversas alterações metabólicas que podem ser induzidas por uma dieta rica em gordura saturada.

CONCLUSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito do ASE nas alterações metabólicas que caracterizam a SM, em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Pode-se concluir que o tratamento com ASE foi eficaz de previnir o aumento da massa corporal e o consumo de alimento. Ainda, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina e leptina, normalizando a sinalização da insulina.Também reduziu significativamente a esteatose hepática e o acúmulo de colesterol e triglicerídeo hepático. Assim, o estudo sugere que o ASE atenua o remodelamento adverso no fígado de camundongos obesos com DHGNA e RI induzidas por dieta.

Os principais mecanismos propostos para os efeitos benéficos decorrentes do tratamento com ASE são os seguintes: (i) diminuição na ingestão alimentar e redução no ganho de massa corporal (ii) redução dos níveis plasmáticos de leptina e aumento da expressão de adiponectina no tecido adiposo; (iii) restauração da sinalização da insulina (via IRS-1/PI3-K/pAkt) no fígado; (iv) redução da lipogênese (redução da expressão de SREBP-1c, da HMGCoA-R e maior expressão de pAMPK) e aumento da excreção de colesterol pelo transportador ABCG8; e (v) efeito antioxidante em tecidos adiposo e hepático.

Portanto, o ASE modula a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina, assim como, as envolvidas na via da lipogênese, e na homeostase do colesterol. A síntese de NO, a ação antioxidante e o aumento da sensibilidade à insulina parecem exercer um papel central nos efeitos do ASE. Este estudo abre uma possibilidade para a utilização de ASE, na prevenção das alterações características da obesidade.

REFERÊNCIAS

Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty disease. Diabet Med. 2005 Sep;22(9): 1129-33.

Adies M, Olofsson S-O, Taskinen M-R, Boren J. Overproduction of very low- desity lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28: 1225-1236.

Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105: 121-126.

Akagiri, S., Naito, Y., Ichikawa, H., Mizushima, K., Takagi, T., Handa, O., Kokura, S., and Yoshikawa, T.: A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue preceds the development of fatty liver and insulin resistance in high fat diet fed male KK/ta mice. J. Clin. Biochem Nutr., 42, 150-157, 2008.

Al Rajabi A 1, Castro GS , da Silva RP , Nelson RC , Thiesen A , H Vannucchi , Vine DF , Proctor SD , Campo CJ , Curtis JM , Jacobs RL . Choline supplementation protects against liver damage by normalizing cholesterol metabolism in Pemt/Ldlr knockout mice fed a high-fat diet. J Nutr 2014 Mar; 144 (3) :252-7. doi: 10.3945/jn.113.185389. Epub 2013 Dez 24.

Andriantsiohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, Schini-Kerth VB, Laher I. Molecular mechanism of the cardiovascular protective effects of poplyphenols. Br J Nutr. 2012 Nov 14;108(9):1532-49

Araújo, E. P.; Souza, C. T.; Ueno, M.; Cintra, D. E.; Bertolo, M. B.; Carvalheira, J. B.; Saad, M. J.; Veloso, L. A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. Endocrinology, v.148, n.12, p. 5991-5997, 2007.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N e cols. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 257:79–83.

Armutuc F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative Stress markes, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2008; 46(6): 785-790.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor–mediated tyrosine phosphorylation. Journal of Biological Chemistry. 1997; 272:271-221.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Diabet Med. 1999; 16:442–443.

Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1997;82:359-363.

Bannitster JV., Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal. 1982; 32:131-138.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim*. *Nova* 2006, *29*, 113.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw. 2006;17:4–12.

Bays H, Mandarino L, DeFronzo R. Role of the adipocyte, free acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroximal proliferator-actived receptor agonist provide a rational therapeutic approach.J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(2): 463-478.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med. 2001;7:947–953.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Sherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enchances hepatic insulin action. Nat Med 2001;7: 947-953.

Bernstein RM, Davis BM, Olefsky JM and Reaven GM. Hepatic insulin Butterfieldresponsiveness in patients with endogenous hypertriglyceridaemia. Diabetologia.1978; 14:149-253.

Besse-Patin A, Estall JL. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. Int J Cell Biol. 2014;2014:519153.
Bonnes T, Guèrin T. Is malonaldeyde a valuable of peroxidation? Biochemical Pharmacology. 1992; v.44, n.5, p. 985-988.

Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. J Nutr. 2008;138(9):1677-1683.

Bramlage P, Pittrow D, Wittchen HU, Kirch W, Boehler S, Lehnert H, Hoefler M, Unger T, Sharma AM. Hypertension in overweight and obese primary care patients in highly prevalent and poorly controlled. Am j Hypertens. 2004; 17(10):904-910.

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.

Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini, Calabrese V. Nutritional approachs to combat oxidative stress in Alzheime`s disease. J Nutr Biochem. 2002 Aug; 13(8):444.

Byner CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond). 2009 Apr;116(7): 539-64.

C.E.M Romero, A Zanesco. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. Rev Nutr, 19(1):85-91, jan./fev., 2006.

Cao K, Xu J Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, Li H, Li H, Szeto IM, Shi Y, Long J, Liu J, Fengz. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obses mice. Free Radical Biol Med. 2014 Feb; 67:396-407.

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

Ceriello A, Motz E. Is oxidative Stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Aterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(5):861-823.

Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. J physiol Pharmacol. 2002; 53:515-524.

Chen H, Montagnain M, Funashashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 2003; 278(45): 45021-6.

Chen Q, Wang E, Ma L, Zhai P. Dietary resveratrol increases the expression of hepatic 7α- hydroxylase and ameliorates hypercholesterolemia in high -fat-fed C57BL/6J mice. Lipids Health Dis. 2012 May 20;11:56.

Cnop M, Havel PJ, Utvschneider KM, Carr DB, Retzlaff BJ, Knopp RH, Kahn SE: Gender based differences in adiponectin and leptin levels are related to differences in body fat distribution (Abstract). *Diabetes* 51 (Suppl. 2) :A404 ,2002.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest. 2001;108:1875–1881.2**.**

Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento - Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher White adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. Horm Metab Res. 43(7): 513-516, 2011

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996 Feb 1; 334(5):292-5.

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;378:785-9.

Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. Clin Sci. 2009; 117:173–190.

Curin Y and Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. Pharmacological Reports. 2005; 57:97-107.

D Billington, C E Evans, P P Godfrey, and R Coleman. Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. Biochem J. May 15, 1980; 188(2): 321–327.

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

Devaskar SU and Thamotharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. Rev Endocr Metab Disord.2007; 8(2):105-13.

Dulloo AG, Gubler M, Montani JP, Seydoux J, Solinas G. Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. Int J Obes Relat Metab Disord. 2004 Dec;28 Suppl 4:S29-37.

Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. Physiol Res. 2010; 59(4):459-69.

Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. Endocrinol Pract. 2003; 9: 237-52.

Embrapa – www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra_noticia**.**

Emiliano AF, de Carvalho LCRM, Cordeiro VSC, da Costa CA, de Oliveira PRB, Queiroz EF, Moreira DDC, 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 (ACH 09) extract. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2011; 58: - 328.

Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. **J** Lipid Res. 2009 Apr;50 Suppl:S412-6.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Free radical biol. Med.1991; 11,81.

Evans JL. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? Indian J Med Res. 2007; 125(3):355-72.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001; 285:2486–97.

Faria TS, Pereira- Silva DC, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2013. Adipocytes: biology, regulation and health impact. In: Weber MJ, Hoffmann JM, editors. Adipocytes: biology, regulation and health impact. New York: Nova Science Publisher.p 188.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006; 50(2):216-229.

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis- related genes. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:12737-42.

Foucaud L, Goulaouic S, Bennasroune A, Laval-Gilly P, Brown D, Stone V, Falla J. Oxidative stress induction by nanoparticles in THP-1 cells with 4-HNE production: stress biomarker or oxidative stress signalling molecule? Toxicol In Vitro. 2010 Sep;24(6):1512-20. Epub 2010 Jul 16.

Fraser R. The role of dietary triglycerides in cholesterol metabolism. Atherosclerosis. 1974; 19:327-336.

Friedmann J M, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395(22):763-70.

De Fronzo RA, Ferraninni E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care. 1991; 14:173-94.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98:2005–2010.

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. Cell Signal. 2001 Nov;13(11):827-33.

Fruhbeck GR. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. Nut Rev. 2002;60:47-55.

Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okaba M, Hayashi S, Nabeno Y, Osawa T, Naito M. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by Up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in beta-oxidation in mouse white adipose tissue. J Clin Biochem Nutr. 2008; 43(3):201-9.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, Rabès JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tomé D, Jais JP, Junien C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. Obesity (Silver Spring). 2007; 15 (8): 1996-2005.

Galvano F, La Fauci L, Vitaglione P, Fogliano V, Vanella L, Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. Ann Ist Super Sanita. 2007;43(4):382-93.

Ghosh JMC. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate câncer cells. Proc Nat Acad Sci USA. 1998; 95:13182-13187.

Ghosh D , Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. Asia Pac J Clin Nutr. 2007;16(2):200-8.

Gill JM, Brown JC, Bedford D, Wright DM, Cooney J, Hughes DA, Packard CJ, Caslake MJ. Hepatic Production of VLDL1 but not VLDL2 is related to insulin resistance in normoglycaemia midle-aged subjects. Atherosclerosis. 2004; 176:49-56.

Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M, Pyorala K, Kjekshus J, Pedersen TR. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevetion Study (AFCAPS/TexCAPS). Am J Cardiol. 2004; 93:136-41.

GMM de Oliveira, W de Andrade Martins. O Preço da Obesidade. Rev Bras Cardiol, 2013.

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

Gomes A , Fernandes E, Lima JL, Mira L, Corvo ML. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. Curr Med Chem. 2008;15(16):1586-605.

Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard RD, Turma PL, cohen JC, Hoobs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and bibliary cholesterol excretion. Jbiol chem 2003; 278: 4875-82.

Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB and Ferri C. Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects after 15 Days of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate. The Journal of Nutrition. 2008; 138:1671-1678.

Grattagliano I , Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G.. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. The Journal of Nutritional Biochemistry . 2008 Aug;19(8):491-504.

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

Griess TW , Nieto FJ, Shahar E, Wofford MR, Brancati FL.. Hypertension and antihypertensive therapy as risck factors for type 2 diabetes mellitus: Atherosclerosis Risk in Communities Study. N Engl J Med. 2000; 342:905.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica.Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Halliwell B, Guitteridge JMC. Free radicals in biology and Medicine. 2 ed. New York: Clarendon Press. 1991; p.198.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in biology and Medicine (3rd Ed.). Oxford University Press .1999.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanism: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radical Reserch 31, 261-272, 1999.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes. 2005 Nov;54(11):3140-7.

Hardie DG Corton J, Ching YP, Davies SP, Hawley S. Regulation of lipid metabolism by the AMP-activated protein kinase. Biochem Soc Trans. 1997 Nov;25(4):1229-31.

Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. Diabetes Metab Res Rev. 2000 Jul-Aug;16(4):230-6.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest. 1997; 100(9):2153-2157.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202.

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, Lan F, Walsh K, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA, Zang M. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. J Biol Chem. 2008 Jul 18;283(29):20015-26.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. J Biol Chem. 1996; 271:10697-10703.

Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. Am J Med Sci. 2005 Dec;330(6):280-9.

IBGE- www.ibge.gov.br/home/estatistica/.../pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf

I Diretriz brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Sindrome Metabólica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2005; 84.

International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. [Citado em 2006 set 15]. Disponível em: http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Metasyndrome_ definition.pdf (acessado em 15/Set/2006).

Jialal I, Grundy SD. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences, New York. 1992; v.669, n.30, p.239-248.

J Naukkarinen, A Rissanen, J Kaprio and K H Pietiläinen. Causes and consequences of obesity: the contribution of recent twin studies. International Journal of Obesity 36, 1017-1024 (August 2012).

JungUJ, ChoiMS.Obesity andits metabolic complications:the role of adipokines andth e relationship between obesity,inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and non alcoholic fatty liver disease. Int J Mol Sci. 2014 Apr 11;15(4):6184-223.

Kai Sui, Nadezhda S. Sabeva, Jinging Liu, Yuhuan Wang, Saloni Bhatnagar, Deneys R. Van der Westhuyzen, and Gregory A. Graf. The ABCG5 ABCG8 Sterol Transporter Opposes the Development of Fatty Liver Disease and Loss of Glycemic Control Independently of Phytosterol Accumulation. J Biol Chem. Aug 17, 2012; 287(34): 28564–28575.

Keller, KB and Lemberg L. Obesity and the metabolic syndrome. American Journal of critical care. 2003; 12(2):167-70.

Khan MT, Furchgott RF. Similarities of behavior of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in a prefusion cascade bioassay system. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.1987; 46: 385P.

Khan S, Cleanthis M, Smout J, Flather M, Stansby G. Life-style modification in peripheral arterial disease. Eur J Vasc Endovasc Surg.2005; 29(1): 2-9.

Klaus S , Pültz S, Thöne-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. Int J Obes (Lond). 2005 Jun;29(6):615-23.

De Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. Endocrinology. 2009 Sep;150(9):4114-23.

De Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. Physiol Behav. 2010 Jul 14;100(5):525-34.

Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and that metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. J Am Coll Cardiol. 2005; 46(11):1978-1985.

Kolovou DG, Anagnostopoulou KK, Pavlidis AN, Salpea KD, Iraklianou SA, Hoursalas IS, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Metabolic syndrome and gender differences in postprandial lipemia. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2006; 13(4): 661-664.

Kotronen A, Yki-Jãrvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28(1):27-38.

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itons S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP- activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. Cell Metab. 2007 jul; 6(1): 55-68.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol. 2004;4(5):371-9.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. Coron Artery Dis. 2001; 12(6):455-461**.**

Langenberg C, Bergstrom J, Scheidt- Nave C, Pfeilschifter J, Barrett- Connor E. Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers. Diabetes Care. 2006; 29(6): 1363-9.

Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. J Biol Chem. 1998; 273 (9): 5294-9.

Levine, R.l.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici A.; Climent, I., Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Meth Enzymol. 1990; 186: 464-478.

Lichtenthäler R, Rodrigues RB, Maia JG, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. Int J Food Sci Nutr. 2005 Feb;56(1):53-64.

Kwon EK, Lee DY, Lee H, Kim DO, Baek NI, Kim YE, Kim HY. Flavonoids from the buds of Rosa damascena inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and angiotensin I-converting enzyme. J Agric Food Chem. 2010 Jan 27;58(2):882-6.

Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. Curr Opin Lipidol.1997; 8(3):146-153.

Lira VA et al. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 29: E1062-1068.

Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. Gut. 1996 Sep;39(3):475-8.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001 Aug;50(8):1844-50.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Metabolism Clinical and Experimental. 2008; 57(8):1071-1077.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985; 177:21-30.

Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. Curr Mol Med 2006; 6(5):501–514.

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

Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, Romanatto T, Pascoal LB, Caricilli AM, Torsoni MA, Prada PO, Saad MJ, Velloso LA. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. Diabetes. 2012 Jun;61(6):1455-62.

Ministério da saúde: http://portalsaude.saude.gov.br..

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. JAMA. 2003 Jan 1;289(1):76-9.

Moller P, Loft S. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. Environ Health Perspect. 2010;118(8):1126-36. Epub 2010 Apr 27.

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshnev I, Dansky HM. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. Circ Res. 2005; 96:1178-1184.

de Moura RS, Pires KM, Santos FT*, et al.* Addition of acai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. Food Chem Toxicol 2011; 49 (4):855-63.

Nelson, D. L.; Cox, M.M. Biossíntese do colesterol, dos esteróides e dos isoprenóides. Lehninger Princípios de Bioquímica. Cap.21, 807-820.4 ed. São Paulo: Sarvier. 2006.

Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. Endocr Rev. 2006; 27:242–259.

Noh JS , Park CH, Yokozawa T. Treatment with oligonol, a low-molecular polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced hepatic damage through regulation of oxidative stress and lipid metabolism. Br J Nutr. 2011 Oct;106(7):1013-22.

Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration Diabetologia. 2008; 51(5): 827-35.

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

Otani H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. Antioxid Redox Signal. 2011 Oct 1;15(7):1911-26.

Palmiere VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. J Nutr. 2006; 136(12):3022-3026.

Park HJ, Jung UJ, Lee MK, Cho SJ, Jung HK, Hong JH, Park YB, Kim SR, Shim S, Jung J, Choi MS. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. Mol Nutr Food Res. 2013 Feb;57(2):360-4.

i JR, Cintra DE, Ropelle ER, Souza CT, Moraes JC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulin em animais destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídeos. Matriz, Rio Claro.2007; 13: S19-S28.

Pauli, J. R., Ropelle, E. R., Cintra, D. E., & Souza, C. T. D. (2009). Efeitos do exercício físico na expressão e atividade da AMPKα em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura. *Rev. bras. med. esporte*, *15*(2), 98-103.

Patti ME , Kahn CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 1998;9(2-4):89-109.

Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2003;38(4):999–1007.

Pessary, D. Role of mitochondrial in non-alcholic fatty liver disease. J. Gastroenterol. Hepatol., 22 Supply. 1, S 20-27, 2007.

Pessin JE, Saltied AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest. 2000; 106(2):165-169.

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest 2008;118:829-38.

Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 Mar 15;302(6):H1219-30.

Qi Y, Jiang C, Cheng J , Krausz KW , Li T , Ferrell JM , Gonzalez FJ , Chiang JY . Bile acid signaling in lipid metabolism: Metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. Biochim Biophys Acta. 2014 May 4. pii: S1388-1981(14)00083-3.

Raal FJ, PhD, FRCP, FRCPC, FCP (SA), MMed (WITS). Pathogenesis and Management of the Dyslipidemia of the Metabolic Syndrome. Metabolic Syndrome and Related Disorders. 2009; 7(2): 83-88.

Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. Circ Res. 1992; 70:593-599.

Ravussin E: Adiponectin enhances insulin action by decreasing ectopic fat deposition. *Pharmacogenomics J*2 :4 –7,2002.

Rayasam G.V., Tulasi V.K., Sodhi R., Davis J.A., Ray A. Glycogen synthase kinase 3: More than a namesake. Br. J. Pharmacol. 2009;156:885–898.

Reaven GM. Syndrome X: 6 year late. J Intern Med. 1994; 736:13-22.

Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, Mikus CR, Laye MJ, Laughlin MH,Booth FW, Ibdah JA. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. J Hepatol. 2010 May;52.

Reifsnyder PC, Leiter EH. Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice. Diabetes. 2002 Mar;51(3):825-32.

Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, Hjermann I, Urdal P, Holme I, et al. Effect oflong-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. Am J Clin Nutr. 2001; 73(2): 240-5.

Ricci C, Pastukh V, Leonard J, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. American Journal of Physiology. 2008;294(2):C413–C422.

Roberts CK and Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome.Life Sciences. 2009; 84: 705-712.

Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. J Appl Physiol .2005; 98(1):3-30.

Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, 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(2): 97-104.

Rocha AP, Resende AC, Souza MAV, 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(6): 435-448.

Roden M , Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest. 1996 Jun 15;97(12):2859-65.

Rodrigues RB, Lichtenthäler R, Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F, Maia JG, Almeida O. Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds.

Roy D, Perreault, M, Marette A. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues *in vivo* is NO dependent. Am J Physiol. 1998; 274: E692-9.

RPP Francischi, LO Pereira, CS Freitas, M Klopfer. Obesity: uptade information about its etiology, morbidity and treatment. Rev. Nutr. vol.13 no.1 Campinas Jan./Apr. 2000.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001; 13:799-806.

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. Diabetes. 2001 Oct;50(10):2199-202.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med. 2001; 30:1191-1212.

Seshadri KG. A Venusian story of Paleolithic proportions. Indian J Endocrinol Metab. 2012;16(1):134–135.

Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006 Dec;20(4):665-79.

Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C, Schütz F, Metref S, Tarussio D, Maechler P, Staels B, Lanz B, Grueter R, Decaris J, Turner S, da Costa A, Preitner F, Minehira K, Foretz M, Thorens B. Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence. J Clin Invest. 2013 Apr 1;123(4):1662-76.

Shetty S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. Trends Pharmacol Sci. 2009 May;30(5):234-9.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):13656-61.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. Mol Cell. 2000 Jul;6(1):77-86.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolis with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. AM. J. Enol. Vitic. 1965; 16: 144-158.

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 Feb;64(2):268-76

Sokol RJ1, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumpricht E, Elkins N, Everson G. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. Pediatr Res. 2001 Apr;49(4):519-31.

Song Y, Lee SJ, Jang SH, Ha JH, Song YM, Ko YG, Kim HD , Min W Kang SN, Cho JH. Sasa borealis Stem Extract Attenuates Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-induced Obese Rats. Nutrients. 2014 Jun 5;6(6):2179-95.

Souza-Mello V, Gregório BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. Clin Sci (Lond). 2010 Jun 8;119(6):239-50.

de Souza MO , Souza E Silva L, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. The hypocholesterolemic activity of açaí (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 Dec;32(12):976-84.

Stelmach W, Kaczmarczyk-Chalas K, Bielecki W, Drygas W. How education, income, control over life and life style contribute to risk factors for cardiovascular disease among adults in a post-communist country. Public Health. 2005; 119(6):1-11.

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 (1-3): 299-313.

Stralin P, Karlsson K, Johannson BO, Marklund SL. The interstitium of human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; 15(11):2032-2036.

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 T , Powers JR, Tang J. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. J Food Sci. 2007 May;72(4):S267-71.

Tao R, Ye F, He Y, Tian J, Liu G, Ji T, Su Y. Improvement of high fat diet induced metabolic syndrome by a compound from Balanophora polyandra Griff in mice. European Journal of Pharmacology. 2009; 616:328-333.

Targher G, Bertolini L, Zenari L. Hypoadiponectinemia is closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese subjects. Diabetes Care. 2004 Aug;27(8):2085-6.

Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. Exp Physiol. 2007; 92 (2): 287-98.

Thorens B, Charron MJ, Lodish HF. Molecular physiology of glucose transporters. Diabetes Care. 1990 Mar;13(3):209-18.

Tiidus PM, Behuns WA, Madere R. Effects of vitamin E status and exercise training on tissue lipid peroxidation based on two methods of assessment. Nutrition Research, Elmsford. 1993; v.13, p.S189-S193 Supplement.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CcC, Itani S, Lodish HF, Ruderman RB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(25):16309-16313.

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

Touyz, RM. Reactive oxygen species and angiotensin II singnling in vascular cells-implications in cardiovascular disease. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(8):1263-1273.

Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary Cyanidin 3-O-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. The Journal of Nutrition. 2003; 133(7):2125-30.

Tsuda T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. J Agric Food Chem. 2008 Feb 13;56(3):642-6.

Turner N , Hariharan K, TidAng J, Frangioudakis G, Beale SM, Wright LE, Zeng XY, Leslie SJ, Li JY, Kraegen EW, Cooney GJ, Ye JM. Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. Diabetes. 2009 Nov;58(11):2547-54. doi: 10.2337/db09-0784. Epub 2009 Aug 31.

Unger RH , Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 Nov;24 Suppl 4:S28-32.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Rev Bras de Hipertensão. 2006; 13(4):260-2.

Van Raalte DH, Diamant M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug;93 Suppl 1:S37-46.

Vasconcelos, Sandra Mary Lima et al . Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quím. Nova, São Paulo , v. 30, n. 5, Oct. 2007.

Velloso LA. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50(2):165-76.

Vial, G.; Dubouchaud H.; Couturier, K.; Cottet- Rousselle, C; Taleux, N.; Athias, A.; Galinier, A.; Cateila, L.; Lverse, X. M. Effects of a high fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. J. Hepatol. 54:348-356;2011.

Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR Functioning and Its Pathogenic Consequences Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Human Obesity. PPAR Res. 2012;2012:107434.

Volpato AM, Schultz A, Magalhães-da-Costa E, Correia ML, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. Neuroendocrinology. 2012;96(4):272-84.

Welber J. Energy balance in o besity. Proc Nutr Soc 2003; 62: 539-543.

Wells JK. The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach. Biol Rev Camb Philos Soc. 2006;81(2):183–205.

Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. Clin Exper Pharmacol Physiol. 2003; 30:769-778.

World Health Organization: definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva, World Health Organization. 1999.

Wu N, Sarna LK, Hwang SY, Zhu Q, Wang P, Siow YL, O K. Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase during high fat diet feeding. Biochim Biophys Acta. 2013 Oct;1832(10):1560-8.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med. 2002 Nov;8(11):1288-95.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated withboth lipoatrophy and obesity. Nat Med. 2001; 7:941–946.

Yamazaki Y, Hashizume T, Morioka H, Sadamitsu S, Ikari A, Miwa M, Sugatani J. Diet-induced lipid accumulation in liver enhances ATP-binding cassette transporter g5/g8 expression in bile canaliculi. Drug Metab Pharmacokinet. 2011;26(5):442-50.

Yao J, Zhi M, Minhu C. Effect of silybin on high-fat-induced fatty liver in rats. Braz J Med Biol Res. 2011 Jul;44(7):652-9.

Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, Levens AR, Yang R, Zhang CY, Lowell BB, Berggren PO, Newgard CB, Bonner-Weir S, Weir G, Spiegelman BM. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. Dev Cell. 2003 Jul;5(1):73-83.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological reviews. 74(1): 139-162, 1994.

Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADPH oxidase. Hypertension. 2001; 38:1395-1399.

Zang M, Zuccolo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. J Biol Chem. 2004;279:47898-905.

Zecchin, HG, Carvalheira, JBC & Saad, MJA (2004) Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica (Molecular mechanisms of insulin resistance in the metabolic syndrome). Rev Soc Cardiol Est São Paulo 14, 574–589.

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 Oct;48(4):1087-96.

Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. Circulation. 1979; 60(3):473-485.7