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

Paola Raquel Braz de Oliveira

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

Rio de Janeiro
2010

Paola Raquel Braz de Oliveira

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

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra Angela de Castro Resende

]

Rio de Janeiro

2010

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

O48 Oliveira, Paola Raquel Braz de.
Efeito do extrato do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica/ Paola Raquel Braz de Oliveira. – 2010.
62 f.

Orientadora: Angela de Castro Resende.
Dissertação (Mestrado) - 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. Dieta hiperlipídica. 4. Plantas medicinais - Uso terapêutico – Teses. 5. Doenças cardiovasculares. I. Resende, Angela de Castro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.711

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

_____ _____

Assinatura Data

Paola Raquel Braz de Oliveira

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

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2010.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Antônio Claúdio Mendes Ribeiro

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. ª. Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. José Paulo de Assis Melo

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que me sustenta com incentivos, conselhos e principalmente amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha família, pelos meus amigos e principalmente pelo amor que ele dedica a seus filhos, pois é através desse amor que consigo realizar os meus sonhos como o mestrado.

Agradeço a minha orientadora Professora Dr[a]. Angela de Castro Resende pela oportunidade da realização do mestrado, mas principalmente pela dedicação a minha formação como pesquisadora, pois passar ensinamentos e valores não é uma característica especial a todos os professores que orientam, mas somente àqueles que conduzem suas obrigações profissionais com dedicação, amor, respeito e ética; e isto a diferencia como profissional.

Agradeço aos meus pais Solange Monteiro Oliveira de Morais e José Elias de Morais pelo amor, dedicação e preocupação. Este trabalho é fruto de todo incentivo e torcida pelo meu futuro. Obrigada pelas conversas na mesa da sala e pelas broncas, pois a partir delas tornei-me uma mulher realizada tanto na vida pessoal como profissional.

Agradeço a minha irmã Viviane Monteiro Oliveira de Morais pelo exemplo de mulher madura, responsável, amorosa, inteligente e que amo muito. Obrigada por estar comigo sempre e por sermos amigas acima de tudo.

Agradeço a minha amada avó Inês Monteiro de Oliveira pela dedicação de todos esses anos, pelo amor, pelo carinho e por sempre lembrar que a única herança que ela pode deixar é a oportunidade de ter me proporcionado uma boa educação.

Agradeço em memória a minha mãe Elisa Leme Braz pelo amor, pelo incentivo e paciência durante a vida. Obrigada pelas orações, pelo carinho e cuidado. Saudades!

Agradeço ao meu irmão Pablo Rodrigo Braz de Oliveira pela paciência, 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 nos momentos difíceis. Obrigada pela família ser muito unida.

Agradeço ao meu namorado Rafael Béda, que apesar de ter o conhecido no final do mestrado foi fundamental para a realização da dissertação, pela paciência, carinho e amor ofertados.

Agradeço à Professora Dr^{a}. Tatiana Brunini pela revisão da minha dissertação, pela enorme colaboração e pela amizade.

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 Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Andréa Fernandes Emiliano da Silva, Cristiane Aguiar da Costa, Dayane Teixeira Ognibene, Giselle França da Costa, Michelle Teixeira Teixeira, Pedro Henrique Pinto Bello, Graziele Freitas de Bem, Taline Amaral, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Lúcia Alves, Marcelo Augusto Vieira de Souza, Carlos Lopes, pela colaboração, pelo carinho e principalmente pela oportunidade de convivência, pois aprendo muito com essas pessoas.

Agradeço a minha amiga e irmã Andreza Maia Vieira pela amizade dedicada e principalmente pela paciência, já que durante os 7 anos de convivência anos houve momentos difíceis, mas bem superáveis por ela estar ao meu lado. Obrigada de coração pelo amor, carinho e compreensão.

Agradeço a minha amiga Cristiane Aguiar da Costa, por ser minha anja guardiã. Nunca me esquecerei do amor, amizade e solidariedade vinda do seu coração puro e repleto de amor. Obrigada por estar presente em todos os momentos até nas madrugadas no laboratório realizando experimento.

Agradeço a minha amiga Amanda Regina da Fé pela amizade, pelo carinho e por sempre mostrar-se calma nos momentos mais difíceis passando tranqüilidade e segurança. Obrigada por tudo.

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

Agradeço as minhas amigas 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 mais de 10 anos. Obrigada pelo amor que nos uni todo esse tempo.

Agradeço aos amigos Luiz Gonzaga da Cunha Junior e Bruno Carvalho pela amizade, pelas conversas engraçadas e pelas estadas nos momentos necessários.

Agradeço a amiga Graziele Freitas de Bem pela amizade e por todo carinho e colaboração durante o mestrado. Obrigada por tudo.

Agradeço as minhas amigas Camila Oliveira e Tatiana Oliveira pela amizade, pelo carinho e pelo cuidado.

Agradeço a amiga Marcela dos Anjos pela amizade, pela enorme colaboração e pela paciência durante o mestrado. Obrigada por tudo.

Agradeço aos amigos do Laboratório de transporte de membranas Marcela Anjos Martins, Natália Rodrigues Pereira, Cristiane Matsuura, Mariana Alves, Monique Moss e aos Professores Tatiana Brunini e Antonio Cláudio Mendes Ribeiro, pela amizade e colaboração durante o mestrado.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia pela fundamental colaboração na minha formação.

A educação, se bem compreendida, é chave do progresso moral

Alan Kardec

RESUMO

OLIVEIRA, Paola Raquel Braz. **Efeito do extrato do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica**. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco, tais como: obesidade, hipertensão, hiperglicemia, resistência à insulina e dislipidemia, os quais predispõem a uma elevada morbi-mortalidade cardiovascular. Muitos dos aspectos da SM podem ser induzidos em modelos experimentais, como os camundongos C57BL/6 através da manipulação da dieta oferecida. Dentre as diversas substâncias extraídas das plantas, os polifenóis têm demonstrado grande potencial terapêutico, já que reduz a incidência de doenças cardiovasculares e seus benefícios podem estar associados à suas ações antioxidante, vasodilatadora e anti-hipertensiva. A Euterpe oleracea Mart (açaí) é uma planta típica dos trópicos, rica em polifenóis. Desta forma avaliamos o efeito do extrato do caroço do açaí (ASE) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à 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 avaliados a massa corporal, pressão arterial, reatividade vascular, lipídeos, glicemia, insulina, e peroxidação lipídica no plasma. A massa corporal estava aumentada no grupo H em comparação aos grupos controles e está diminuída no grupo H+ASE em relação ao grupo H. Não houve alteração da pressão nos diferentes grupos. Por outro lado, o efeito vasodilatador reduzido da ACh no grupo H foi revertido pelo ASE no grupo H+ASE. Observou-se que os camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram ainda hiperlipidemia, assim como, hiperglicemia e hiperinsulinemia, intolerância a glicose e resistência a insulina e o ASE reduziu significativamente todos estes parâmetros. Os níveis de malondialdeído (MDA) foram maiores em amostras de plasma do grupo H, e o ASE reverteu esses níveis no grupo H+ASE. A dieta hiperlipídica promove alterações metabólicas e vasculares e estes dados em conjunto sugerem que o ASE pode representar uma ferramenta importante para o tratamento desses componentes que caracterizam a SM.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. *Euterpe oleracea Mart*. Camundongos C57bl/6. Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Paola Raquel Braz. **Effect of acai extract (Euterpe oleracea Mart) on cardiovascular and metabolic alterations in C57BL / 6 mice subjected to a high fat diet**. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Metabolic syndrome (MS) is a complex disorder characterized by a set of risk factors such as obesity, hypertension, hyperglycemia, insulin resistance and, dyslipidemia which predispose to a high cardiovascular morbidity and mortality. Many aspects of MS can be induced in experimental models, such as the C57BL / 6 mice by manipulating the diet offered. Among the various substances extracted from plants, the polyphenols have shown great therapeutic potential, since it reduces the incidence of cardiovascular disease and its benefits may be associated with antioxidant action, vasodilating and anti-hypertensive actions. The Euterpe oleracea Mart (açaí) is a typical plant of the tropics, and rich in polifenóis. Therefore, we evaluated the effect of Açai Stone Extract (ASE) on the cardiovascular and metabolic alterations in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. Male mice C57BL/6, 30 days old were divided into 4 groups and received the following diets for 12 weeks: control group (C): control diet; control group + ASE (ASE + C): control diet + ASE; group hyperlipidic (H): high-fat diet, group hyperlipidic + ASE (ASE + H): high-fat diet + ASE. The following parameters were evaluated: body mass, blood pressure, vascular reactivity, plasma lipids, glucose, insulin, and lipid peroxidation in plasma. Body mass was increased in group H compared with control groups and decreased in group H + ASE compared with group H. There was no change in blood pressure among the different groups. Moreover, the reduced vasodilator effect of ACh in group H was reversed by the ASE in group H + ASE. It was also observed that the C57BL/6 mice fed a high-fat diet had hyperlipidemia, as well as hyperglycemia, hyperinsulinemia, glucose intolerance and insulin resistance and the ASE significantly reduced all these parameters. The levels of malondialdehyde (MDA) were higher in plasma samples of group H, and ASE reversed these levels in group H + ASE. The high-fat diet promotes metabolic and vascular alterations and these data together suggest that the ASE may represent an important tool for the treatment of these components that characterize MS.

.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Critérios utilizados pela OMS para definição da SM..... 17

Quadro 2- Critérios utilizados pelo NCEP-ATP III para definição da SM..... 17

Quadro 3 - Classificação das lipoproteínas..... 21

Figura 1 - Mecanismo de sinalização de insulina em células musculares..... 23

Quadro 4- Composição das dietas padrão e hiperlipídica..... 32

Figura 2 - Esquema do sistema de perfusão do leito arterial mesentérico isolado de camundongo..... 34

Tabela 1- Massa corporal, pressão arterial sistólica e consumo alimentar..... 38

Figura 3 - Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg)..... 39

Figura 4 - Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg)..... 40

Figura 5 - Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE(300 mg/Kg)..... 41

Figura 6 - Níveis de glicose de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE(300 mg/Kg)..... 42

Figura 7 – Níveis de insulina e índice de HOMA nos diferentes grupos C, C+ASE, H e H+ASE (300 mg/Kg)..... 43

Figura 8 - Níveis plasmáticos e área sobre a curva de glicose durante TOTG em camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE(300 mg/Kg)..... 44

Figura 9 - Níveis plasmáticos de glicose e área sobre a curva durante TITI em camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE(300 mg/Kg)..... 45

Figura10 - Níveis de MDA em amostras de plasma dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE(300 mg/Kg)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	American Institute of Nutrition
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	One-Way Analysis of Variance
Apo –	apolipoproteína
Apo B –	apolipoproteína B
ASE –	Extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí
C	Grupo controle
C+ASE	Grupo controle + ASE
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
Ca^{2+}	Cálcio
$CaCl_2.2H_2O$	Cloreto de cálcio dihidratado
CE	Colesterol éster
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CL	Colesterol livre
CT	Colesterol total
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativa de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FL	Fosfolipídeos
GLUT	Transportador de glicose
GMPc	3’, 5’ guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
H	Grupo hiperlipídico

H+ASE	Grupo hiperlipídico + ASE
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol- HDL
HF	alto teor de gordura
HOMA	Homeostasis Model Assessment
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IRS	Receptor de insulina
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LAM	Leito arterial mesentérico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LP	Lipoproteínas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitôgeno
MDA	Malondialdeído
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NCEP ATPIII	Third Report of the National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
NE	Norepinefrina
NG	Nitroglicerina
NO	Óxido nítrico
O_2^-	Ânion superóxido
OH^-	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão artéria sistólica
PCT	Patent Cooperative Treaty
PI3	quinase Fosfatidilinositol 3-quinase

PNSN	Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição
PPAR	Receptor ativado por proliferadores do peroxissoma
QM	Quilomícron
RI	Resistência a insulina
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido desmutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TITI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	**OBJETIVO.**.....	30
1.1	**Objetivo geral**.....	30
1.2	**Objetivos específicos**.....	30
2	**MÉTODOLOGIA**.....	31
2.1	**Obtenção do extrato hidro-alcoólico do caroço do Açaí (Euterpe oleracea Mart)**.....	31
2.2	**Animais utilizados e dieta experimental**.....	31
2.3	**Consumo alimentar e massa corporal**.....	33
2.4	**Medida da Pressão arterial**.....	33
2.5	**Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de camundongo**.....	33
2.6	**Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas**.....	34
2.7	**Análises bioquímicas**.....	35
2.8	**Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)**.....	36
2.9	**Medida de peroxidação lipídica - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**.....	36
2.10	**Dosagem de Proteínas**.....	37
2.11	**Análise estatística**.....	37
3	**RESULTADOS**.....	38
3.1	**Consumo alimentar, massa corporal e pressão arterial**	38
3.2	**Resposta vasodilatadora da acetilcolina (ACh) em leito arterial mesentérico (LAM).**.....	39
3.3	**Resposta vasodilatadora da nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico (LAM)**.....	40
3.4	**Perfil lipídico**.....	41
3.5	**Glicemia**.....	42
3.6	**Resistência à insulina**.....	43
3.7	**Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**.....	44

3.8 **Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)**..... 45
3.9 **Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**..... 46
4 **DISCUSSÃO**..... 47
CONCLUSÃO..... 52
REFERÊNCIAS..... 53

INTRODUÇÃO

Síndrome metabólica

Em 1923, Klin, um clínico sueco, descreveu uma síndrome caracterizada por hipertensão, obesidade e hiperuricemia. Posteriormente, em 1936, Himmsworth, um médico inglês, deu início ao conceito de resistência à insulina (RI) ao observar que um grupo de pacientes era mais resistente à insulina exógena. Em 1988, Gerald Reaven, 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 e, mais tarde, definiu-se como síndrome metabólica (SM).

Embora a SM seja claramente definida como a associação entre anormalidades metabólicas que levam a um aumento de doenças cardiovasculares, não existe uma definição única que a caracterize. Os critérios mais utilizados para a definição da SM são da Organização Mundial de saúde (OMS) (quadro1) (World Health Organization, 1999; Godoy-Matos AF, 2005) e do Third Report of the National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III, 2001) (quadro 2).

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), enquanto a definição do NCEP-ATP III não enfatiza uma anormalidade metabólica específica e apresenta pontos de corte distinto para cada parâmetro em relação a OMS. Nota-se, porém, que todas utilizam quatro domínios principais: glicose ou RI, lipídeos, pressão arterial e composição corporal. Um grupo europeu, The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) propôs que a insulinemia de jejum fosse usada como marcador de RI (Balkau e Charles, 1999), para tornar a avaliação da RI mais acessível clinicamente.

Quadro 1- Critérios utilizados pela OMS para definição da SM

DEFINIÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE	
Hiperinsulinemia	Quarto quartil, IGJ ou DM2 .
e dois de:	
Índice de massa corporal (IMC)	> 30 Kg/m^2
Relação cintura quadril (RCQ)	
Homens	> 0,90
Mulheres	> 0,85
Obesidade abdominal: Cintura	
Homens	≥ 94 cm
Mulheres	≥ 80 cm
Triglicerídos	> 150 mg/dL
colesterol- HDL	
Homens	< 35mg/dL
Mulheres	< 39mg/dL
Tratamentos anti-hipertensivos e/ou	
Pressão arterial	≥ 140/90 mmHg

Fonte: Adaptado de Albert e Zimmet

Quadro 2 - Critérios utilizados pelo NCEP-ATP III para definição da SM

DEFINIÇÃO DO NCEP-ATP III	
Três ou mais de:	
Circunferência da cintura	
Homens	> 120 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicerídos	> 150 mg/dL
colesterol-HDL	
Homens	< 35mg/dL
Mulheres	< 39mg/dL
Tratamentos anti-hipertensivos e/ou	
Pressão arterial	≥130/ 85 mm Hg
Glicemia de Jejum	≤ 110mg/dL

Fonte: Executive Summary of the Third Report on NCEP.

Todas estas desordens parecem ser decorrentes do estilo de vida moderno, verificado principalmente nos países ocidentais e ricos, afetando uma enorme parcela de indivíduos cujos hábitos de dieta (tendência a alimentos do tipo "*fast-foods*" ricos em gordura) e de comportamento (sedentarismo) (Roberts CK e Barnard RJ, 2005; 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 hipertensão arterial sistêmica, como também um elevado índice de obesidade e o desenvolvimento de diabetes, principalmente diabetes mellitus tipo II (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).

Obesidade

A obesidade representa um sério problema de saúde pública por estar associada a outras entidades mórbidas crônicas incluindo doença arterial coronariana, diabetes mellitus e dislipidemias (Bray, 2004). Apresenta alta prevalência e a incidência vem crescendo a cada ano. Dados de 2003 estimam que aproximadamente 60% dos homens e 50% das mulheres norte-americanas apresentam sobrepeso ou obesidade (Wolk e cols., 2003). Em relação aos dados nacionais, a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (PNSN) constatou que cerca de 40% da população brasileira adulta apresenta sobrepeso ou obesidade (Cercado e cols., 2004).

Embora a obesidade seja um fator de risco para doenças cardiovasculares em toda a população, há uma grande heterogeneidade na relação entre as anormalidades metabólicas, cardiovasculares e o grau de obesidade (Kissebah, 1982). O excesso de massa corporal é um fator predisponente para a hipertensão, podendo ser responsável por 20 a 30% dos casos de hipertensão arterial (World Health Organization, 1997). Estudos sugerem que o ganho de peso e aumento da circunferência da cintura são índices prognósticos importantes de hipertensão arterial, sendo a obesidade central um importante indicador de risco cardiovascular aumentado (World Health organization,1997; Niskanen e cols, 2004; de Simone e cols., 2006). A RI dependente do desenvolvimento de obesidade visceral faz com que a prevalência de SM esteja aumentada em obeso e esse risco ganha uma magnitude maior

quando a obesidade torna-se mórbida (Godoy-Matos, 2005). Entretanto, vários autores descrevem “obesos metabolicamente magros”, sem características da SM (Wajchenberg, 2000; Matsunaga, 1997; Ruderman e cols., 1998; Sims, 2001). Em contrapartida, indivíduos com peso normal, ou até mesmo com taxa de gordura corporal total baixa podem apresentar a SM devido à quantidade de tecido adiposo intra-abdominal (Lerário e cols., 2002). Sabe-se que a associação da adiposidade abdominal com os componentes da SM está bem estabelecida. Indivíduos com maior grau de RI apresentam maior deposição intra-abdominal de gordura (Després, 1998; Lamarche, 1998).

A gênese da obesidade é multifatorial, sendo o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia um fator crucial. Frutas, verduras e grãos integrais estão sendo substituídos por alimentos facilmente acessíveis e ricos em gordura saturada, açúcar e carboidratos refinados. O excesso de lipídio acarreta de forma mais precoce este desequlíbrio, 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 por secretar diversas substâncias denominadas adipocinas como leptina, resistina, visfatina e adiponectina responsáveis por várias ações na homeostasia e em diferentes estados patológicos, como na SM (Fonseca-Alaniz e cols., 2006). A leptina suprime o consumo alimentar e estimula o gasto energético (Welber, 2003); a adiponectina age como fator protetor para doenças cardiovasculares, aumenta a sensibilidade insulínica e 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); a resistina modula a ação da insulina hepática e, possivelmente, desempenha um papel na manutenção dos níveis da glicemia em jejum (Banerjee e cols., 2004), enquanto a visfatina, adipocina predominante no tecido adiposo visceral, parece desempenhar um papel importante na regulação da homeostase glicêmica, ao se ligar ao receptor de insulina, "mimetizando" a sua sinalização intracelular (Fukuhara e cols., 2005). Os níveis séricos dessas adipocinas, com exceção da adiponectina, são elevados em humanos e animais com excesso de adiposidade (Calabro e cols., 2009). 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).

Constata-se cada vez mais que o tecido adiposo tem uma ligação direta com patologias associadas à SM, em especial a obesidade e RI (Godoy-Matos, 2005).

Lipídeos e dislipidemia

Os lipídeos são representados, principalmente, por triglicerídeos (TG), fosfolipídeos (FL) e colesterol. 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), que são agregados macromoleculares de lipídeos e proteínas. Elas são formadas por um núcleo hidrofóbico que contém moléculas de lipídeos neutros, como colesterol éster (CE) e TG, além de vitaminas lipossolúveis, e uma superfície hidrofílica na qual se inserem a molécula de colesterol livre ou não esterificado (CL) e os fosfolipídeos (FL). Estes últimos, por sua natureza anfipática, garantem a afinidade entre o núcleo hidrofóbico e o meio aquoso adjacente. Além disso, diversas apolipoproteínas (apo) formam a superfície das LP, garantindo-lhes solubilidade e arcabouço estrutural, bem como o direcionamento metabólico (Godoy-Matos, 2005).

As LP são classificadas em cinco tipos principais de acordo com sua composição em lipídeos e apo LP, o que caracterizam partículas com densidade e tamanho diferentes (quadro 3).

A dislipidemia associada com 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: elevado triglicerídeo plasmático, baixos níveis de colesterol-HDL e predominância de LDL pequenas e densas (Grundy SM, 1998).

Na SM a dislipidemia é caracterizada por desregulação do metabolismo dos lipídeos no fígado com a super produção 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 (Gill e cols., 2004). 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).

Quadro 3- Classificação das lipoproteínas

Tipo	Características
Quilomicrons (QM)	Maiores partículas (densidade>1.006 g/mL)
	> conteúdo de TG (advindo de dietas)
Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)	Partículas grandes, porém menores que QM
	(densidade <1.006g/mL)
Lipoproteína de densidade intermediária (IDL)	Partículas intermediárias
	(densidade = 1.006 a 1.019g/mL)
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	baixa densidade
	(densidade = 1.019 a 1.063g/mL)
	Principais carregadoras de colesterol
	Transportam o colesterol aos tecidos periféricos.
Lipoproteína de alta densidade (HDL)	Partículas de alta densidadde
colesterol - HDL (HDL-C)	(densidade = 1.063 a 1,21g/mL)
	Mais ricas em proteínas
	Formadas, principalmente, por fosfolipídios
Obs.: Os QM e os VLDL tem a mesma densidade, logo a separação entre estas partículas depende do tempo de ultracentrifugação.	

Fonte: Godoy-Matos, 2005

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) e a elevação dos níveis de AGL associados com 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).

Em 1970, Fraser e Zilversmit sugeriram que a aterosclerose é 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 um aumento na concentração circulante de triglicerídeos e radicais livres. Subseqüentemente, esses radicais podem causar aterosclerose através da oxidação do LDL, resultando em partículas de LDL aterogênicas. (Kolovou e cols., 2006).

A dislipidemia parece ser um achado freqüente nos portadores de SM, fazendo parte com dois dos cinco critérios diagnósticos da OMS para esta síndrome: triglicerídeos aumentados e colesterol-HDL diminuído, podendo ocorrer acúmulo das partículas menores e mais densas de LDL, sabidamente mais aterogênicas.

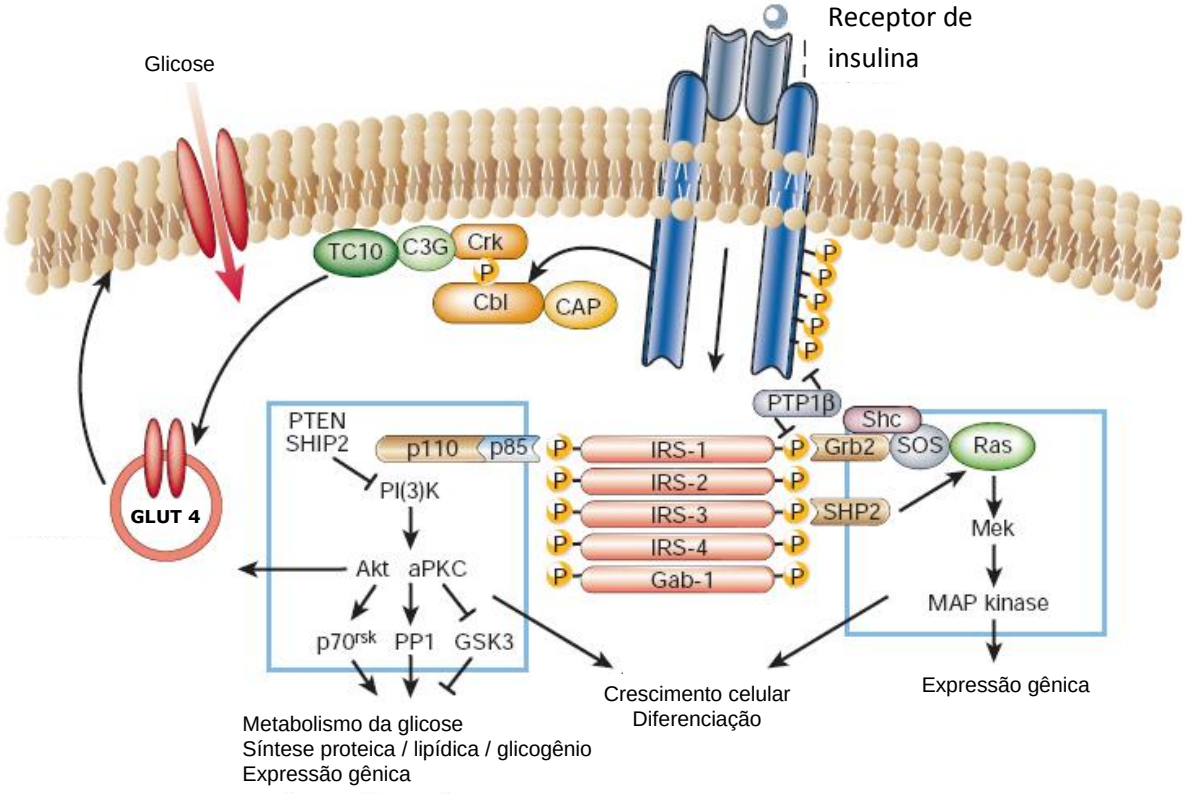
Insulina e Resistência à insulina

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 e isso significa uma menor ação da insulina não apenas no metabolismo dos carboidratos, como também seu papel no metabolismo dos lipídeos, sendo a marca da RI a hiperinsulinemia (Meerarani e cols., 2006; Nigro e cols., 2006). Além disso, com a diminuição na ação da insulina, quadro freqüentemente encontrado em obesos, poderia haver também a ativação de fatores pró-inflamatórios, aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) e baixa regulação de vias de sinalização intra-celulares (Cubbon e cols., 2009).

A RI na obesidade é caracterizada por alterações na via de transmissão do sinal da insulina (figura 1), 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. Em experimentos realizados com camundongos *knockout* para IRS-2, observou-se uma hiperglicemia acentuada, por causa de várias irregularidades na atuação da insulina nos tecidos periféricos e pela ineficiência da atividade secretora das células β e uma redução da massa celular das mesmas (Araki e cols.,1994; Withers e cols., 1998). A RI é caracterizada ainda por alterações da atividade da fosfatidilinositol 3- quinase (PI3-quinase), da translocação de glicose (GLUT) e da atividade das enzimas intracelulares (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 1 – Mecanismo de sinalização de insulina em células musculares



Fonte: Adaptado de Saltiel e Kahn, 2001.

Observa-se também que a sensibilidade à insulina possui influência da adiponectina que estimula a secreção da insulina *in vivo e in vitro* (Okamoto e cols., 2008) pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que estimula a translocação do GLUT 4 no coração e no músculo esquelético (Yamauchi e cols., 2002; Tomas e cols., 2002) e do receptor ativado por proliferadores do peroxissoma (PPAR α e γ) (Yamauchi e cols., 2001; Fruebis e cols., 2001). Estudos têm demonstrado uma redução dos níveis de adiponectina plasmáticas em obesos e em humanos e modelos animais resistentes à insulina. (Hu e cols., 1996; Arita e cols., 1999).

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

Hipertensão

A associação de fatores de risco cardiovascular causa hoje grande preocupação aos órgãos de saúde pública nos diversos países do mundo, pois é responsável pela morte de milhões de pessoas. Dentre estes fatores está a hipertensão arterial que é caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA), ou seja, quando a pressão arterial diastólica é igual ou superior a 90 mm Hg e a pressão arterial sistólica a 140 mm Hg (Kaplan, 2001). Segundo a Sociedade Brasielira de Hipertensão, as taxas de prevalência na população urbana adulta brasileira variam de 22,3% a 43,9% (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

A elevação da PA representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doenças cardiovasculares, com custos elevados decorrentes de suas complicações: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica (the Seventh Report of the Joint National Commitee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 2004).

Estudos demonstram que a elevação da PA (Nishina e cols., 2003) está associada com hiperinsulinemia e excesso de gordura visceral que é um elemento comum aos fatores de risco que caracterizam a SM (Despres, 1998). A hiperinsulinemia pode contribuir para a gênese da hipertensão arterial através do seu efeito sobre a homeostasia do sódio, uma vez que o aumento da atividade do sistema nervoso simpático aumenta a reabsorção renal de sódio e subseqüentemente a expansão do volume na RI (Castro, 2003). Além disso, uma série de outros mecanismos foi proposta para explicar essa ligação, tais como: disfunção endotelial, regulação dos receptores de angiotensina II e ativação aumentada da proteína quinase ativada por mitôgeno (MAPK) (Steinberg e cols., 1996; Godoy-Matos, 2005). Na obesidade, há a ativação de diversos componentes do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo, resultando em aumento da formação da angiotensina II (Shenoy e Cassis, 1997), que por sua vez estimula a produção de vários fatores vasoativos incluindo a endotelina (ET-1), um potente vasoconstritor, o qual está envolvido na patogênese que relaciona obesidade com hipertensão (Parrinello e cols., 1996; Tiret e cols., 1999).

Uma importante estratégia para o tratamento da hipertensão é a modificação na dieta. Estudos demonstraram que uma dieta com baixo teor de gordura é capaz de diminuir a pressão arterial em adultos hipertensos (Gunther e cols., 2009), uma vez que uma dieta rica em lipídio é a principal causadora da obesidade que a longo prazo, pode causar aumento na

reabsorção de sódio, ocasionando, conseqüentemente, a elevação da PA (Godoy-Matos, 2005).

Endotélio e disfunção vascular

O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo com a sua força de cisalhamento ("*shear stress*"), atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que conduzem a produção de NO, pela enzima NO sintase endotelial (eNOS) e outras substâncias vasodilatadoras, como as prostaglandinas vasodilatadoras e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), assim como, substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II (Ang II) e endotelina (Bahia e cols., 2006).

A importância do endotélio no processo de vasodilatação foi descrita por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a remoção mecânica ou química do endotélio impedia a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) em artérias isoladas de coelho, concluindo que o endotélio produzia uma substância vasodilatadora, denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos posteriores, realizados por 2 grupos simultaneamente com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF (Ignarro e cols., 1987; Khan e Furchgott.,1897) constataram que tal fator se tratava do NO.

O NO é um gás inorgânico com uma meia vida curta (2 a 30 segundos em sistemas biológicos) produzido pelo endotélio pela ação da eNOS que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP+ e do complexo cálcio/calmodulina (Malinski, 2005). O relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pelo NO é mediado principalmente pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel muscular, que por sua vez, transforma GTP em GMPc. O aumento dos níveis de GMPc no interior das células musculares lisas, estimula o recrutamento de Cálcio (Ca^{2+}) citosólico para os estoques intracelulares, causando assim, redução da concentração de Ca^{2+} e conseqüente relaxamento vascular (Rapopport e Murad, 1983).

As principais funções fisiológicas do NO são regular o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e inibir a atividade plaquetária e a proliferação das células musculares lisas da parede vascular (Ramachandran e cols., 2002) sendo, portanto, fundamental na modulação da PA.

A disfunção endotelial pode ser caracterizada pela redução da resposta vasodilatadora por deficiência da produção do NO (Calles-Escandon e Cipolla, 2001) Existem evidências de que os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial são multifatoriais, incluindo deficiências na disponibilidade de arginina, alteração dos mecanismos de sinalização, alteração da ativação da eNOS ou em um dos co-fatores envolvidos na ativação desta e aumento da degradação de NO (Feletou e Vanhoute, 2006). Estudos em seres humanos e modelos animais têm demonstrado uma associação entre níveis de adiponectina circulante e função endotelial, pois a adiponectina estimula diretamente a produção de NO através do aumento da fosforilação da eNOs (Chen e cols., 2003). Além disso, o estresse oxidativo parece exercer um papel importante na etiologia da disfunção endotelial por reduzir a biodisponibilidade de NO (Touyz.,2004).

Embora a disfunção endotelial não seja ainda um critério diagnóstico para a SM, existe uma crescente tendência para a sua inclusão (Bonora e cols., 2003), pois ela está comumente associada com a hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e contribui para a etiologia da doença cardiovascular (Heitzer e cols., 2001). Reilly e Rader (2003) ressaltam que a disfunção endotelial não deve constituir-se numa seqüela da desordem metabólica, mas provavelmente uma das causas primárias dessa síndrome.

Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (Touyz, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (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 na biologia vascular (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, principais processos que contribuem para o dano vascular na doença cardiovascular (Rao e Berk, 1992 ; Harrison, 1997).

Enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa, além de vitaminas antioxidantes e outras pequenas moléculas regulam os agentes pró-oxidantes (Stralin e cols., 1995; Halliwell, 1999; Channon e Guzik, 2002). 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). Estes mecanismos de defesa antioxidantes mantêm a sobrevivência dos organismos contra o estresse oxidativo.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da mesma (Mello Filho, 1984).

Estudos têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante nas manifestações relacionadas com a SM, incluindo hipertensão, aterosclerose, resistência à insulina 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 malondialdeído (MDA), aldeído de cadeia curta medido pela reação com ácido tiobarbitúrico e apresenta-se como um dos produtos finais da peroxidação lipídica (Palmieri e cols., 2006; Armutcu e cols.2008;).

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).

Modelo experimental de síndrome metabólica

Para o estudo da SM e suas doenças associadas, muitos modelos animais experimentais têm sido utilizados atualmente. No entanto, estudos têm demonstrado que 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 pode ser usada em animais roedores, resultando em um fenótipo similar ao da SM, encontrando-se nestes animais uma RI e comprometimento com a 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 fatores como a obesidade acumulam 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 resistência à insulina (Gallou-Kabani e cols., 2007). Os estudos demonstram que as características fenotípicas e metabólicas desses animais alimentados com dieta hiperlipídica revelam uma importante utilização deste modelo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na progressão ou resistência para o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo II e componentes da SM.

Extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí (ASE)

A planta *Euterpe oleracea* Mart. também conhecida pelo nome popular açaí, é amplamente encontrada na região Amazônica principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumido no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso gelado são consumidas no Brasil e 1.000 toneladas são exportadas para muitos países como Japão, Estados Unidos e Itália (Embrapa, 2004).

Estudos químicos têm mostrado que o açaí é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio e cols., 2000; Pozo-Isfran e cols., 2004; Gallori e cols., 2004). Muitas evidências sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra o risco cardiovascular (Stoclet e cols., 2004). Este efeito benéfico dos polifenóis pode ser devido a diferentes ações como antioxidante (Frankel e cols., 1993) que aumenta a biodisponibilidade do NO, vasodilatação (Fitzpatrick e cols., 2000) ou propriedades anti-hipertensivas (Soares de Moura e cols., 2002a,b, 2004).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o extrato hidro-alcóolico do caroço do açaí (ASE), cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no INPI, assim como no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha e cols, 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha e cols., 2008). Uma redução do dano oxidativo também foi demonstrado em lavado broncoalveolar de camundongos submetidos à fumaça de cigarro e tratados com ASE (Rocha e cols., 2008). Estes achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando uma importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares.

Com o objetivo de ampliar nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do tratamento com extrato do caroço do açaí, avaliamos neste estudo o tratamento crônico com extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí *(Euterpe oleracea* Mart*)* sobre as alterações metabólicas e cardiovasculares em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica, um modelo experimental que delineia os componentes da SM.

1. **OBJETIVOS**

1.1 **Objetivo geral**

O presente estudo visa investigar os efeitos do extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí (ASE), sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

1.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar alterações de massa corporal, glicemia, lipídios plasmáticos e insulina e estudar o efeito do tratamento crônico com ASE sobre essas alterações;
- .Analisar alterações da pressão arterial, da função endotelial e reatividade em artérias mesentéricas e estudar o efeito do tratamento crônico com ASE sobre essas alterações;
- Investigar uma possível peroxidação lipídica neste modelo animal e o efeito do tratamento com ASE.

2. **METODOLOGIA**

2.1 **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.

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.

2.2 **Animais utilizados e dieta experimental**

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 4) 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.

b) Grupo Controle + ASE (C+ASE): receberam dieta padrão durante 12 semanas e concomitantemente 300mg/kg do ASE dissolvido em água.

c) Grupo hiperlipídico (H): receberam dieta experimental durante 12 semanas

d) Grupo hiperlipídico + ASE (H+ASE): receberam dieta experimental durante 12 semanas e concomitantemente 300mg/kg do ASE dissolvido em água.

Quadro 4. Composição das dietas padrão e hiperlipídica

	Dietas	
Nutrientes (U/Kg dieta)	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		

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

2.3 **Consumo alimentar e massa corporal**

O consumo de ingesta de ração dos camundongos foram monitorados a cada 2 dias e a massa corporal foi aferida semanalmente. O consumo de ração diário foi calculado fazendo a diferença da oferta (ração) pela sobra dividida pelo número de animais (n) vezes dois (referente aos dias), então:

Ingesta (ração) = (Oferta – sobra)/2n

2.4 **Medida da Pressão arterial**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por método não invasivo (pletismografia de cauda – Letica LE 5000), nos camundongos acordados de todos os grupos experimentais durante 12 semanas, por meio de um garrote e de um sensor de pulso posicionados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, e assim determina a PAS. As medidas foram realizadas duas vezes por semana antes do fornecimento da dieta e durante o tratamento.

Os animais foram treinados por duas semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse antes da medida da pressão arterial.

2.5 **Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de camundongo**

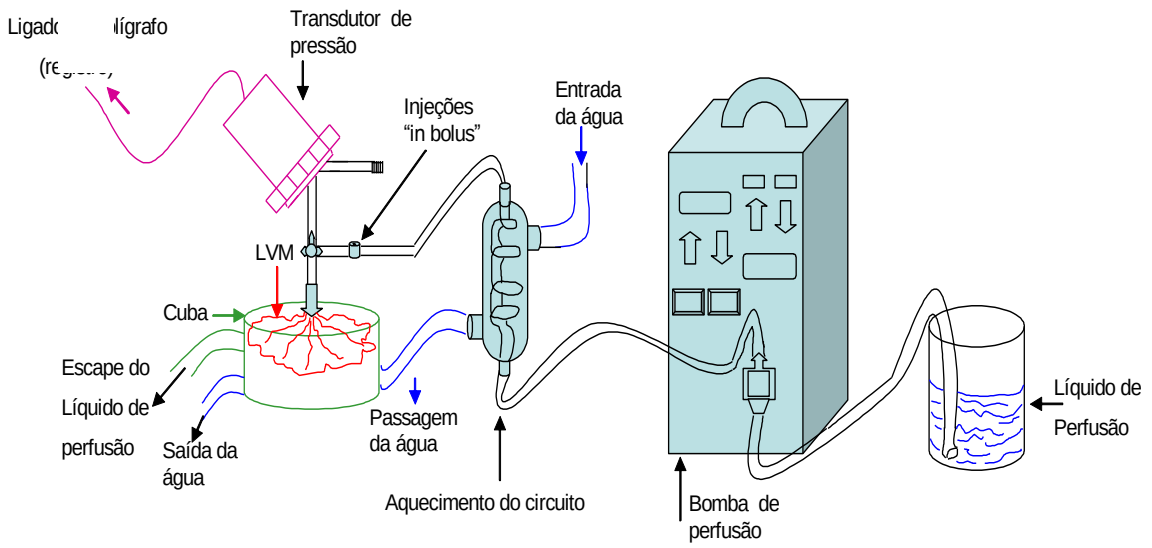
Ao final do período experimental (12 semanas) e após seis horas de jejum, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio intraperitoneal (0,42mg/g) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para posteriores análises bioquímicas e em seguida o LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl (Cloreto de Sódio; 6,9); KCl (Cloreto de Potássio; 0.35); $CaCl_2.2H_2O$ (Cloreto de Cálcio dihidratado; 0.44); $MgSO_4$ (Sulfato de Magnésio; 0.29); $NaHCO_3$ (Bicarbonato de Sódio; 2.1); KH_2PO_4 (Fosfato de Potássio Monobásico; 0.16);

$C_6H_{12}O_6$ (Glicose; 2.0). Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno preenchido com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

2.6 **Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas**

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 ml) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Lifecare Model 4, Abbott/Shaw). A solução de Krebs, mantida à 37º C e aerada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) foi infundida à velocidade constante de 4ml/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em polígrafo (HP 8805B), por meio de um transdutor de pressão (HP1280) (Figura 2).

Figura 2- Esquema do sistema de perfusão do Leito arterial mesentérico isolado de camundongo.



Fonte: Adaptado de Carvalho, LCRM; 2002.

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal deve se manter próxima de 20 a 40 mm Hg (Resende e cols., 1998) e então, foram administradas injeções de 120 μmol de KCl. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 μM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mm Hg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina (ACh: 0,1-1000 nmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG: 10-100 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. A resposta vasodilatadora foi expressa como % de queda da resposta pressora induzida pela NE. As injeções "*in bolus*" das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de micro-seringas de 10 e 100 μl (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 1 a 50 μl.

2.7 **Análises bioquímicas**

Perfil lipídico

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

Glicemia

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.

Insulina

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

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).

2.8 **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)**

TOTG e TITI foram avaliados duas e uma semana antes do sacrifício respectivamente. Glicose (2g/Kg) foi ofertada oralmente e insulina (0,5 U/Kg) intraperitonealmente no tempo zero. O sangue caudal foi coletado nos tempos 0, 20, 40, 60, 80 e 120 para TOTG e 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 para TITI 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 4 horas (TOTG) ou 6 horas (TITI). As áreas sobre a curva (AUC; milimolar/minuto) foram calculadas.

2.9 **Medida de peroxidação lipídica - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído- MDA), que são em parte substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e cols (1990) e adaptada para plasma.

Foram utilizados 100 µl de amostra do plasma, diluídos em 200 µl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 3000 rpm. Separou-se 250 µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa ao qual foram adicionados 250 µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100° C)

por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectofotômetro (532 nm).

Para o cálculo foi utilizado:

$$\text{Fator de correção (FC) médio do TBA} \rightarrow FC = \frac{[nmol.TMP]}{Abs.ptn}$$

2.10 **Dosagem de Proteínas**

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976).

2.11 **-Análise estatística**

Todos os resultados foram analisados por meio de “One-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 $p<0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Consumo alimentar, massa corporal e pressão arterial

Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos na quantidade de ração(g) consumida pelos camundongos, na massa corporal antes do fornecimento das dietas experimentais e na pressão arterial. Contudo, após o término do período de estudo, a massa corporal dos grupos que receberam dieta rica em ácidos graxos (AG) saturados foi significantemente (P<0,05) maior comparada aos controles e o grupo H + ASE apresentou uma massa corporal significantemente menor em relação ao grupo H. Desta forma, observamos que o ASE apresenta um efeito protetor contra o aumento da massa corporal, quando os animais são submetidos a uma dieta rica em gordura. Não houve diferença significativa na pressão arterial dos diferentes grupos experimentais (Tabela 1)

Tabela 1: Massa corporal, pressão arterial sistólica e consumo alimentar

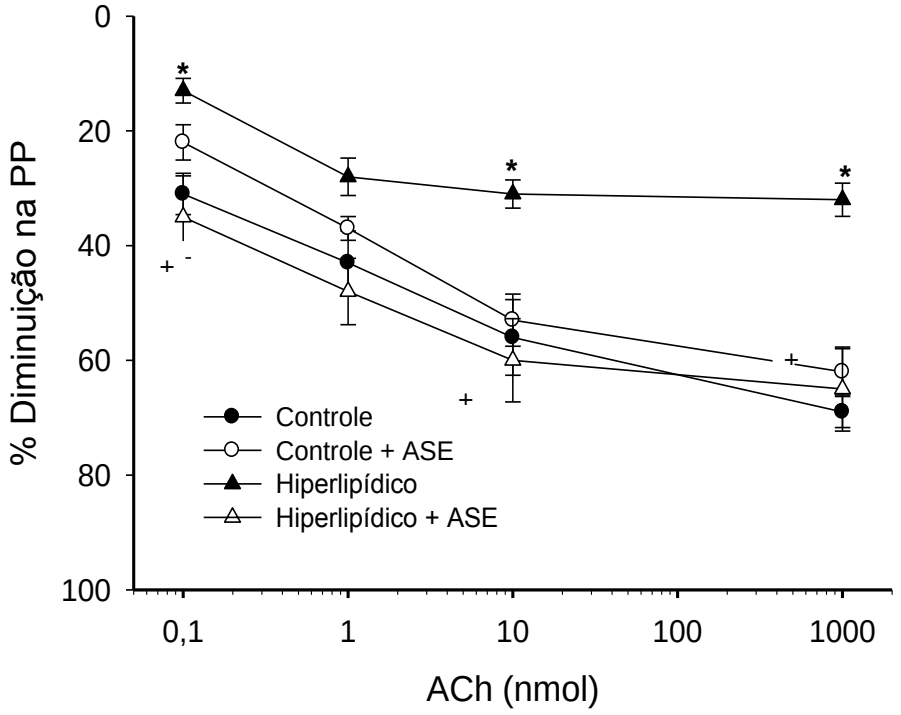
Grupos	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Pressão arterial sistólica inicial (mmHg)	Pressão arterial sistólica final (mmHg)	Gordura abdominal (g)	Consumo alimentar (g)
Controle	21,5 ± 0,6	22,9 ± 0,5	116,5 ± 2,3	110,6 ± 1.2	0,6± 0,06	2,2± 0,03
C+ ASE	20,3 ± 0,5	23,9 ± 0,3	111,6 ± 1,6	108,5 ± 1,2	0,6± 0,06	2,2 ± 0,04
H	20,8 ± 0,4	41,6 ± 0,9 *	111,2 ± 1,8	110,5 ± 1,4	3,2± 0,12*	2,3 ± 0,05
H + ASE	19,8 ± 0,2	31,2 ± 0,4 †&	109,4 ± 1,4	108 ± 1,8	1,8± 0,11†&	2,3 ± 0,04

Legenda: Massa corporal (g) inicial e final, pressão arterial, gordura abdominal e consumo alimentar de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg). 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.

3.2 **Resposta vasodilatadora da acetilcolina (ACh) em leito arterial mesentérico (LAM)**

Em preparações pré-contraídas com norepinefrina (30 µM), a ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente reduzida no grupo H comparada ao Grupo C sugerindo que a dieta hiperlipídica modifica a função endotelial. O tratamento com ASE reverteu a resposta vasodilatadora em vasos de animais que receberam dieta rica em AG saturados (figura 3).

Figura 3 - Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg)

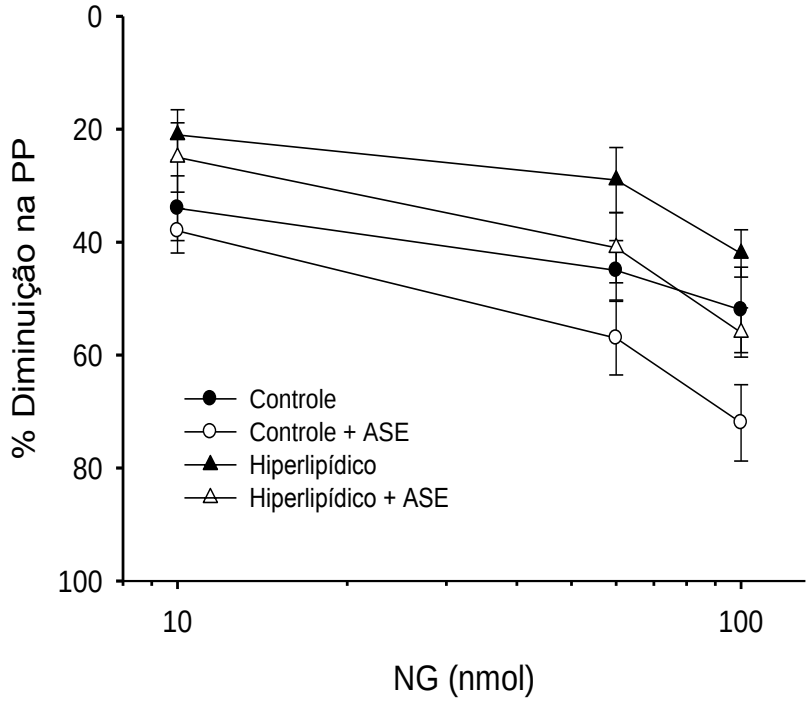


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos. $^{*}p < 0,05$ em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H

3.3 **Resposta vasodilatadora da nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico (LAM)**

A resposta vasodilatadora induzida pela NG não foi diferente entre os quatro grupos experimentais indicando que a dieta rica em AG saturados no tempo de 12 semanas não é capaz de modificar a função das células musculares lisas (figura 4).

Figura 4 - Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg).

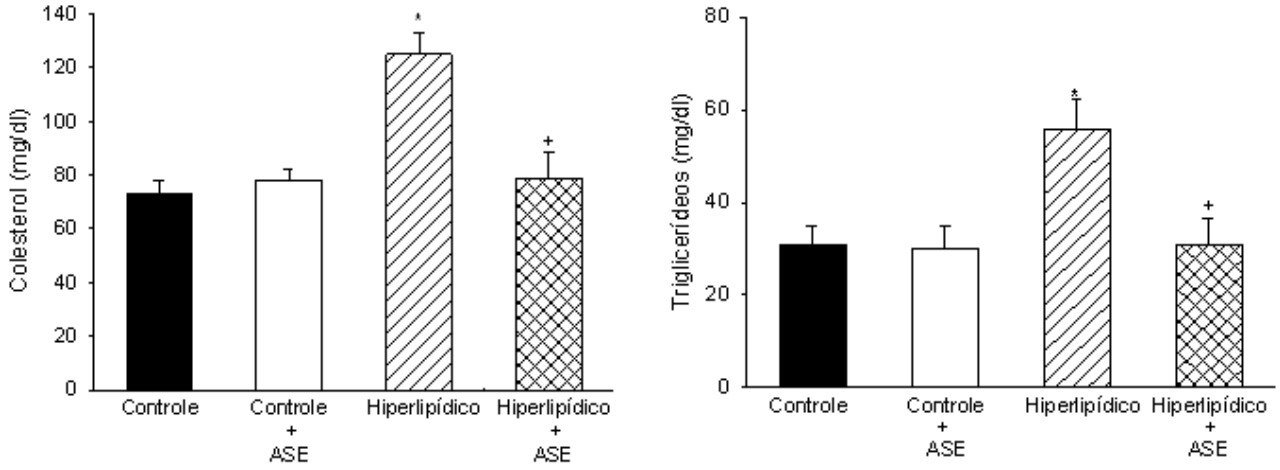


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos.

3.4 **Perfil lipídico**

A análise do colesterol total plasmático demonstrou que o grupo H (125 ± 7,87) apresentou valor mais elevado (*$p \leq 0,05$) quando comparado aos grupos C (73 ± 4,76) e C+ ASE (78 ± 4,2). O grupo H+ASE (79 ± 9,23) apresentou níveis reduzidos ($^{+}p \leq 0,05$) de colesterol comparados com o grupo H. No que se refere aos valores de triglicerídeos plasmáticos, constatou-se que, assim como no colesterol total, o grupo H (55,7 ± 4,5) se comportou de forma semelhante e apresentou níveis maiores (*$p \leq 0,05$) em relação aos grupos C (31 ± 3,82) e C+ASE (30 ± 5,1). O tratamento com ASE normalizou os valores ($^{+}p \leq 0,05$) no grupo H + ASE (31 ± 5,7) (figura 5).

Figura 5 – Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE (300 mg/Kg)



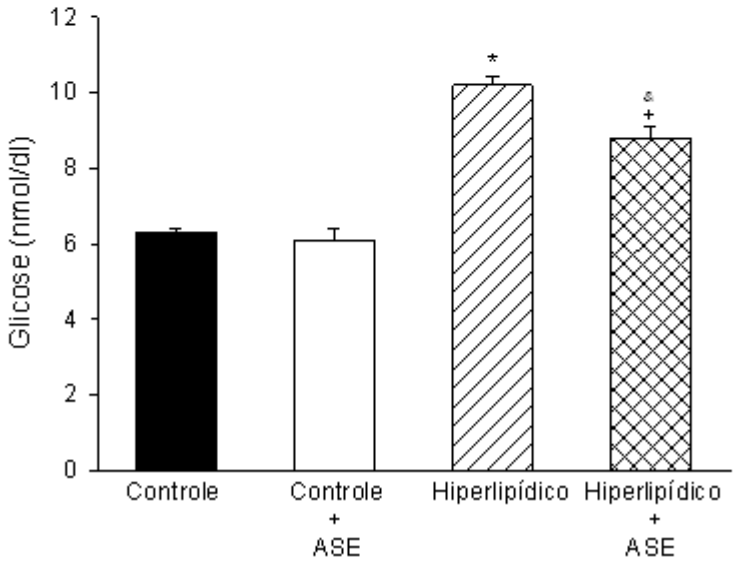
Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 6 para todos os grupos. *$p < 0,05$ em relação aos grupos C e C+ASE e $^{+}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

3.5. **Glicemia**

Os níveis de glicose foram maiores nos grupos H e H+ASE ($^{*\,+}p < 0,05$) em relação aos demais grupos. ASE reduziu o aumento da glicose no grupo H+ASE ($^{\&}p < 0,05$) em relação ao grupo H (figura 6).

Figura 6 - Níveis de glicose de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/ Kg)

Grupos	Glicemia inicial (mmol/dl)	Glicemia final (mmol/dl)
Controle	6,6 ± 0,3	6,3 ± 0,1
C+ ASE	6,2 ± 0,2	6,1 ± 0,3
H	6,7 ± 0,2	10,2 ± 0,2 *
H + ASE	6,2 ± 0,2	8,8 ± 0,3 + &

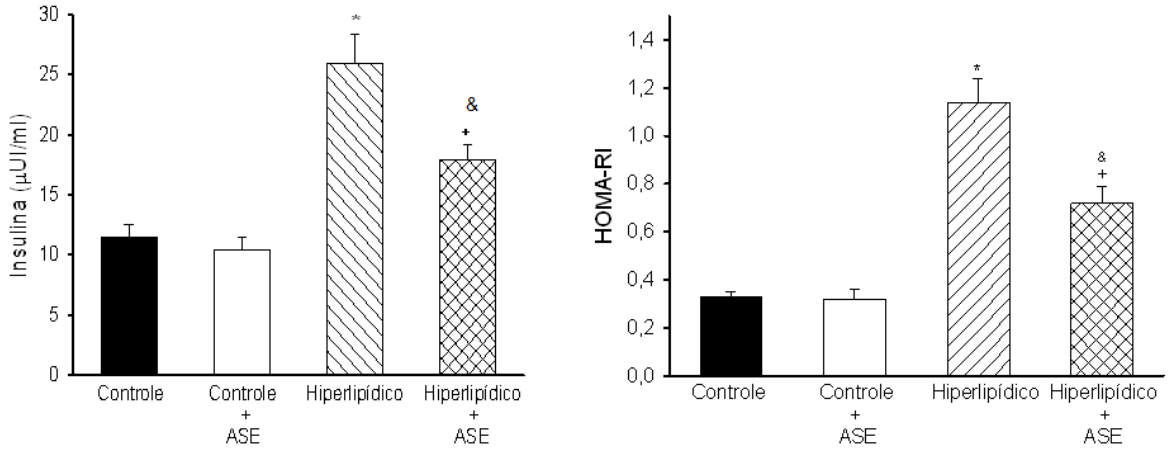


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. $^{*\,+}p < 0,05$ em relação aos grupos C e C + ASE e $^{\&}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

3.6 **Resistência à insulina**

Os níveis de insulina foram maiores nos grupos H (25,9 ± 2,44) e H+ASE (17,9 ± 1,27) em relação aos grupos C (11,5 ± 1,02) e C+ASE (10,4 ± 1,1) ($^{*+}P<0,05$). Entretanto, o tratamento com ASE reduziu os níveis de insulina em relação ao grupo H ($^{\&}p\leq0,05$). A resistência à insulina determinada pelo índice de HOMA foi maior nos animais dos grupos H e H+ASE (* $^{+}p\leq0,05$) em relação aos controles, porém o ASE reduziu a resposta (' $^{\&}p\leq0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos C e C+ASE (figura 7).

Figura 7- Níveis de insulina e índice de HOMA dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE (300 mg/Kg)

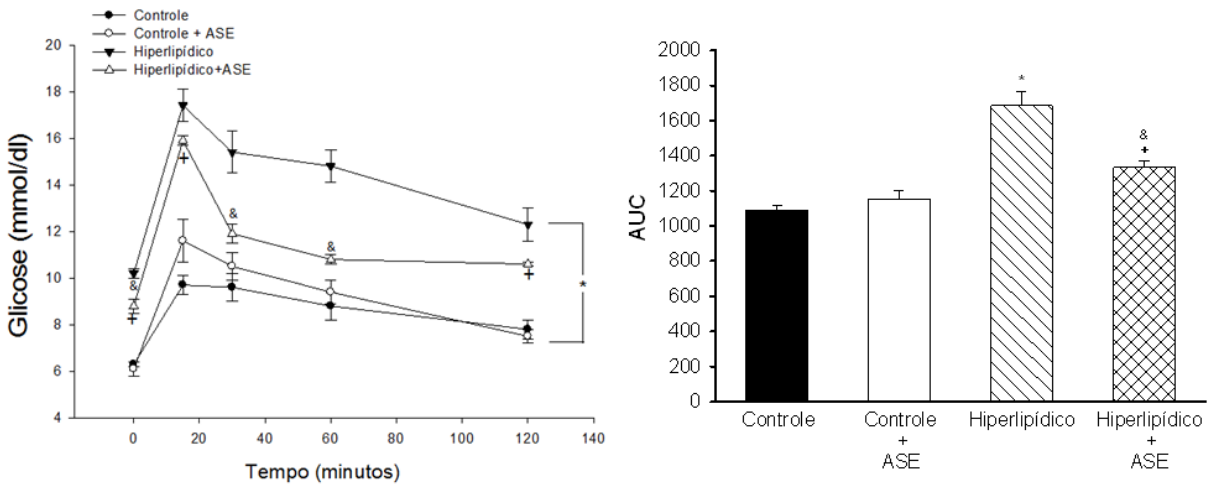


Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n= 10 para todos os grupos. * $^{+}p < 0,05$ em relação aos grupos C e C+ASE e $^{\&}p < 0,05$ em relação ao grupo H.

3.7 **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 o pico dos níveis plasmáticos de glicose foi de 15 minutos após o desafio com glicose. O tratamento com ASE diminuiu a intolerância à glicose no grupo H + ASE ($^{\&}$p<0,05) em relação ao grupo H (Figura 8).

Figura 8 – Níveis plasmáticos e área sobre a curva de glicose durante TOTG em camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg)

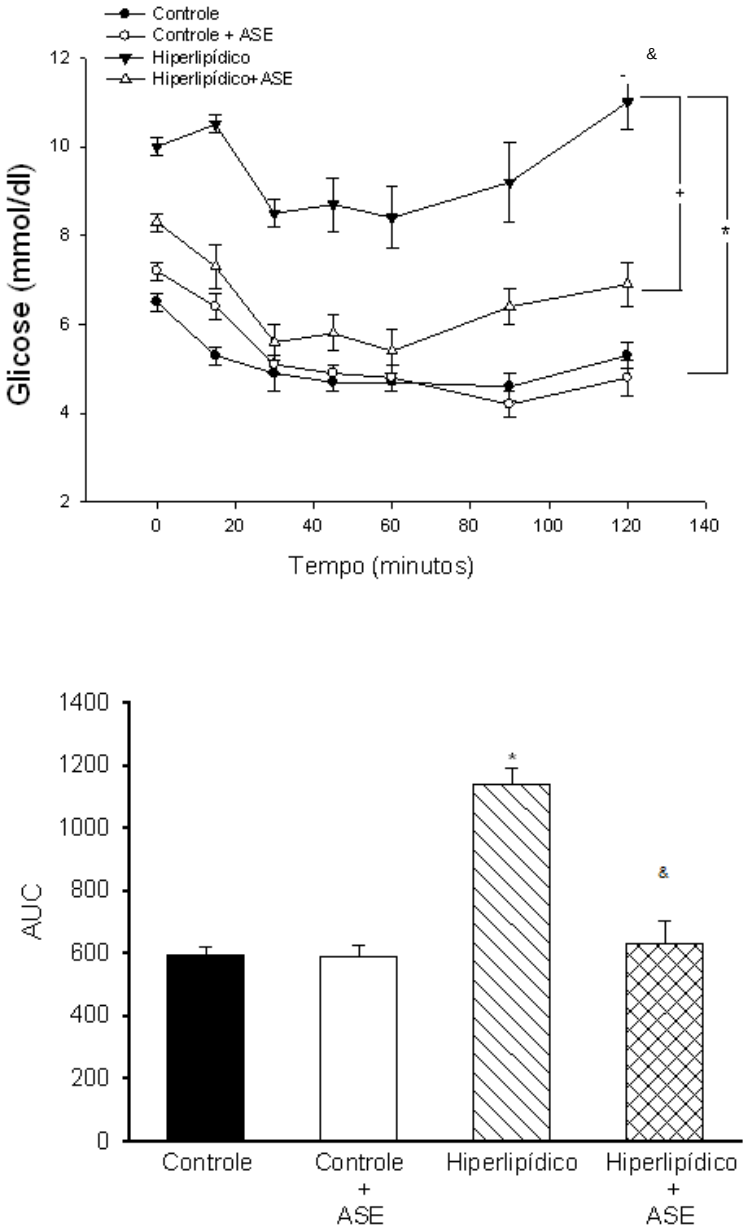


Legenda: * $^{+}$p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{\&}$p < 0,05 em relação ao grupo H

3.8 **Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)**

O TITI demonstrou resistência à insulina no grupo H em relação aos grupos controles (*****p<0,05). O tratamento com ASE impediu o desenvolvimento de resistência à insulina ($^{+}$p<0,05) (Figura 9).

Figura 9 - Níveis plasmáticos de glicose e área sobre a curva durante IPITT em camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com ASE (300 mg/Kg).

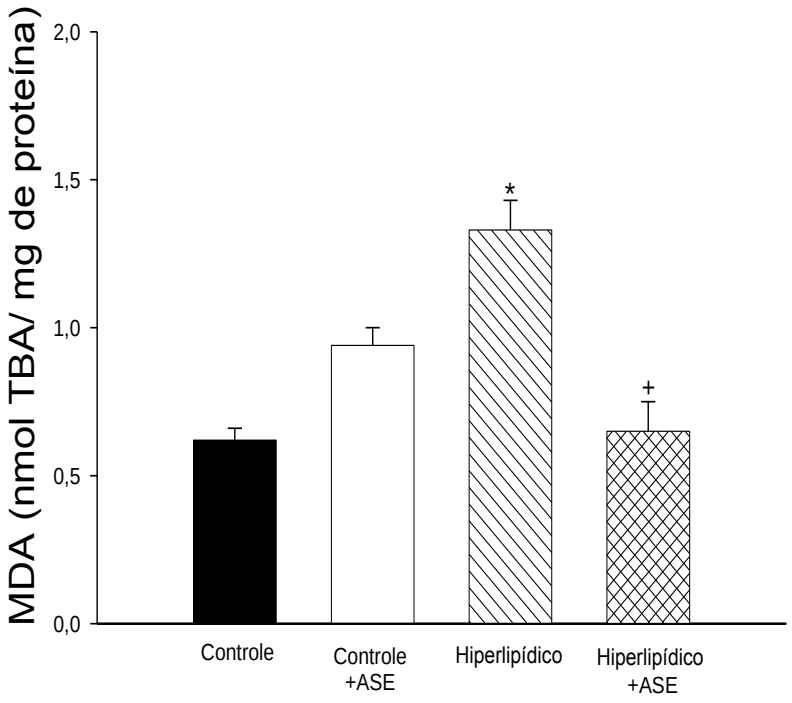


Legenda: *p < 0,05 em relação aos grupos C e C+ASE e $^{\&}$p < 0,05 em relação ao grupo H.

3.9 **Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Observou-se um aumento significativo na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (MDA) em amostras de plasma do grupo H, quando comparado com os animais controles (figura 9). O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p<0,05$) os níveis de MDA nos animais alimentados com dieta hiperlipídica**.** (plasma: C: 0,62 ± 0,04 nmol TBA/mg ptn; C+ASE: 0,94± 0,06 nmol TBA/mg ptn; H : 1,33 ±0,1 nmol TBA/mg ptn;; H+ASE: 0,65 ± 0,1 nmol TBA/mg ptn).

Figura 10 - Níveis de MDA em amostras de plasma dos grupos C, C+ASE, H e H+ASE (300 mg/Kg).



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.

4 **DISCUSSÃO**

Estudos prévios realizados no nosso laboratório demonstraram que o ASE, um extrato hidro-alcoólico obtido do caroço do açaí e rico em polifenóis (*Euterpe oleracea* Mart) possui atividade vasodilatadora dependente do endotélio (Rocha e cols., 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha e cols., 2008). Em virtude do crescente aumento das alterações metabólicas e cardiovasculares que caracterizam a SM e que são atribuídas em grande parte ao aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada, resolvemos investigar essas alterações, assim como o efeito do ASE sobre as mesmas em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

Nossos presentes resultados demonstraram que o grupo H, ao final de 12 semanas apresentou um ganho de massa corporal significativo em relação aos demais grupos corroborando 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 e cols., 2005), assim como, outros modelos animais de desordens metabólicas utilizando dietas ricas em gordura (Buenttner e cols., 2007). Os camundongos C57BL/6 apresentam elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de *diabetes Mellitus* do tipo II, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipertensão. Além disso, a manipulação da dieta oferecida a estes animais pode ser realizada com intuito de acelerar o desenvolvimento dessas alterações associadas à SM (Molnar e cols., 2005; Rodriguez e cols., 2006). O ASE reduziu a massa corporal no grupo H+ASE indicando que este extrato rico em antocianinas e outros polifenóis (Rocha e cols., 2008) 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 interfira na formação do tecido adiposo proporcionando melhor funcionamento deste em relação às adipocinas, as quais podem influenciar o metabolismo e o gasto energético. Esta hipótese é reforçada por estudos recentes sobre a regulação da função do tecido adiposo por antocianinas que demonstram que as mesmas apresentam um efeito anti-obesidade e melhoraram a função dos adipócitos por aumentar a expressão da adiponectina, uma das principais adipocinas, *in vitro* e em sistemas *in vivo* (Tsuda, 2008). Além disso, um 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 apresenta um efeito anti-obesidade (Tsuda e cols., 2003).

Não foi observada alteração da pressão arterial nos grupos H e H+ASE ao final de 3 meses. É possível que o tempo de tratamento com a dieta rica em gordura saturada (60%) no qual foram submetidos os camundongos C57BL/6, não foi suficiente para o desenvolvimento da hipertensão. Esta hipótese é reforçada por estudos que demonstram que a obesidade induzida por uma dieta rica em ácidos graxos saturados em camundongos C57BL/6, ao final de um período superior a 3 meses está associada a uma modesta elevação da pressão arterial em repouso (Williams e cols., 2003).

Verificamos que a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina está reduzida no grupo H caracterizando uma disfunção endotelial e sugerindo que esse tipo de dieta pode levar a alteração do relaxamento vascular dependente de endotélio. Esse achado corrobora com dados publicados anteriormente por Molnar e colaboradores (2005) que demonstraram uma redução da resposta vasodilatadora dependente de endotélio em artérias femorais de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica. O óxido nítrico (NO) gerado pela conversão de L-arginina na parede arterial através da ação enzimática da eNOS é um dos maiores determinantes do relaxamento vascular e uma das explicações dessa disfunção endotelial é a diminuição da produção de NO ou o aumento da sua degradação através do estresse oxidativo. Observou-se que camundongos submetidos à dieta com alto teor de gordura apresentam elevada produção de EROs (Matsuzawa-Nagata e cols.,2008), as quais podem contribuir para a disfunção endotelial por diversos mecanismos. Estes incluem: inibição dos dímeros da eNOS, oxidação do co-fator tetrahidrobiopterina (Molnar e cols.,2005) e inibição de dimetilarginina dimetilaminohidrolase (enzima que metaboliza a metilarginina, um análogo da L-arginina) (Widder e cols., 2007). Além disso, Cau e colaboradores (2008) observaram que camundongos *Knockout* para adiponectina apresentam diminuição na produção de NO através da redução da fosforilação da eNOS sugerindo que baixos níveis de adiponectina, encontrados na SM levariam à disfunção endotelial. Demonstramos pela primeira vez, que o tratamento crônico com ASE reverteu à disfunção endotelial em modelo experimental de SM. Este efeito é provavelmente induzido pela liberação de NO, já que, Rocha e colaboradores (2007) ao estudar o efeito vasodilatador do ASE em leito arterial mesentérico de rato demonstraram que o mesmo estimula a formação de NO pelas células endoteliais. Podemos sugerir ainda que o efeito antioxidante do ASE demonstrado por Rocha e colaboradores em 2008 ao estudar os efeitos anti-hipertensivos e a ação antioxidante do extrato hidro-alcoólico obtido do fruto de açaí pode influenciar a resposta vasodilatadora do extrato, provavelmente por aumentar a biodisponibilidade de NO.

Além disso, há evidências de que polifenóis presentes, por exemplo, em frutas são capazes de modular a produção de NO do endotélio vascular, contribuindo para a prevenção da disfunção endotelial, conhecida por desempenhar um papel central na patogênese de doenças cardiovasculares (Curin e Andriantsitohaina., 2005). A dieta hiperlipídica não alterou significantemente a resposta vasodilatadora induzida pela NG o que corrobora com dados publicados por Molnar e colaboradores (2005), os quais demonstraram que camundongos C57Bl/6J alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentam uma modesta diminuição da resposta vasodilatadora independente de endotélio. Nosso achado sugere que em 12 semanas a dieta rica em ácidos graxos saturados não proporciona comprometimento do músculo liso.

Camundongos C57BL/6 que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento do colesterol total e dos níveis de triglicerídeos. Alguns estudos demonstraram que esse modelo animal submetido à dieta rica em ácidos graxos saturados desenvolve alterações no perfil lipídico caracterizado pela elevação dos níveis séricos dos triglicerídeos e do colesterol total (tao e cols., 2009; Gallou-Kabani e cols., 2007; Hoffer e cols., 2009; Molnar e cols., 2005). Em 1978, Bernstein e colaboradores sugeriam um mecanismo patogênico para o desenvolvimento da dislipidemia, em que um estado de resistência à captação de glicose conduzirá à hiperinsulinemia que, por sua vez, aumentaria a produção de lipoproteínas de baixa densidade rica em triglicerídeos, aumentando assim a concentração plasmática de triglicerídeos. Pela primeira vez, foi demonstrado pelo nosso estudo um efeito de redução de triglicerídeos e colesterol pelo ASE. Provavelmente esse efeito se deve aos polifenóis presentes no extrato, já que, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com polifenóis provenientes do limão proporcionou redução dos níveis de triglicerídeos (Fukuchi e cols., 2008) e resultados anteriores obtidos no nosso laboratório demonstraram que a prole adulta de ratas submetidas à dieta com alto teor de gordura durante a lactação e tratadas com GSE (extrato da casca de uva) rico em polifenóis apresentou redução dos níveis de triglicerídeos (dados ainda não publicados).

Os níveis de glicose verificados pelo método de dosagem da glicemia em jejum do grupo H, assim como a quantidade de insulina secretada estão aumentados, o que está de acordo com trabalhos previamentes publicados (Gallou-Kabani e cols., 2005; Pauli e cols., 2007; Buettner e cols., 2007; Matsuazawa-Nagata e cols., 2008; Bose e cols., 2008; Tao e cols., 2009) que demonstraram que uma dieta com alto teor de gordura é capaz de induzir hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina. A resistência dos tecidos periféricos à insulina 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 (Godoy-Matos, 2005). Além disso, a insulina é um hormônio que exerce um efeito antioxidante pela supressão da geração de EROs. Entretanto, com o prejuízo na ação da insulina, provocado pela resistência a este hormônio, quadro freqüentemente encontrado em obesos, pode ocorrer aumento das EROs (Dandona e cols., 2005). O aumento de EROs pode levar a ativação da cascata da insulina via fosforilação em serina e inibir em tirosina. E as formas do substrato de receptor de insulina (IRS) fosforilada em serina/treonina são menos capazes de se associar ao receptor de insulina (IR) e as proteínas subseqüentes na cascata de sinalização como a PI3-quinase, resultando em prejuízo na ação da insulina, incluindo a ativação da AKT e o transporte de glicose através do GLUT-4 (Evans, 2007). Portanto, essa associação poderia explicar a etiologia da resistência à insulina desencadeada pela obesidade. O ASE reduziu os níveis de glicose e insulina nos animais alimentados com dieta com alto teor de gordura sugerindo que o ASE tem efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperinsulinêmico. Sabe-se que polifenóis podem melhorar a resistência à insulina aumentando a biodisponiblidade de NO e diminuindo a formação de EROs (Grassi, 2008), então podemos sugerir que o efeito antioxidante do ASE demonstrado por Rocha e colaboradores em 2008 deve contribuir para redução da resistência à insulina. Além disso, o nosso laboratório ao estudar o efeito do GSE na hiperglicemia e no sistema de sinalização de insulina em camundongos diabéticos (Teixeira e cols., 2009), demonstrou que o GSE não estimula a secreção da insulina, mas promove um aumento no conteúdo do receptor da insulina, da Akt fosforilada e do GLUT-4 no músculo esquelético. Diante desses achados, podemos inferir que há a possibilidade do ASE atuar reduzindo a resistência à insulina pela ativação da cascata de sinalização de insulina nos tecidos periféricos.

Nossos resultados mostram um aumento significativo nos níveis de MDA em amostras de plasma do grupo H, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Um Estudo realizado em 125 indivíduos com SM demonstrou que os níveis de MDA plasmáticos estavam aumentados (Fortuño e cols., 2009). Este achado reafirma que, na SM, há a produção de EROs, as quais estão associadas a resistência à insulina, elevação dos lipídeos e disfunção endotelial (Roberts e Sindhu., 2009). O ASE normalizou os níveis de MDA no grupo H+ASE sugerindo que o extrato apresenta efeito antioxidante, o que está de acordo com estudos que demonstraram que os polifenóis apresentam potente efeito antioxidante no plasma (Manach e cols., 2005; Keen e cols., 2005).

A geração de EROs pode representar uma explicação para as alterações metabólicas e cardiovasculares encontradas no nosso modelo e ainda um dos mecanismos utilizados pelo ASE para prevenir essas alterações. Resta esclarecer ainda, qual o mecanismo envolvido no efeito antioxidante do ASE. É possível que o extrato mimetize o efeito das enzimas do sistema antioxidante ou, ainda exerça uma ação inibidora sobre o sistema pró-oxidante.

CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica promove alterações na massa corporal, função endotelial, perfil lipídico, glicemia, sensibilidade à insulina e nos níveis de MDA plasmático em camundongos C57BL/6. O tratamento com ASE reduziu significativamente todas essas alterações, sugerindo que o ASE pode representar uma ferramenta importante para o tratamento das alterações metabólicas e cardiovasculares que caracterizam a síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

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.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathaway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature. 1994; 372 (6502): 186-90.

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.

Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. O endotélio na sídrome metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006; 50:291-303.

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.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. Science. 2004; 303:1195–1198.

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

Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, Muggeo M. Metabolic Syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003; 27:1283-1289.

Bobbio F.O, Druzian J.L, Abrão P.A, Bobbio P.A, Fadelli S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (Euterp oleracea Mart). Ciênc. Tecnol. Aliment. 2000; 20: 388-390

Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major Green polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-gallate, inibits obesity, metabolic syndrome and fatty liver disease in high fat fed mice. The Journal of Nutrition.2008; 138: 1677-1683.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.

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.

Bray GA. Obesity is a chronic, relapsing neurochemical disease. Int J Obes Relat Metab Disord. 2004; 28(1): 34-38.

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.

Calabro P, Golia E, Maddaloni V, Malvezzi M, Casillo B, Marotta C, Calabro R, Golino P. Adipose tissue-mediated inflammation: the missing link between obesity and cardiovascular disease? Intern Emerg Med. 2009; 4:25-34.

Calles-Escandon J. Cipolla M. Diabetes and Endothelial dysfunction: a clinical perspective. Endocr Rev. 2001; 22(1):36-52.

Cao Y, Tao L, Yuan Y, Jiao X, Lau WB, Wang Y, Christopher T, Lopez B, Chan L, Goldstein B, Ma XL. Endothelial dysfunction in adiponectin deficiency and its mechanisms involved. J Mol Cell Cardiol. 2009; 46(3): 413-9.

Castro JP, El-Atat FA, McFarlane SI, Aneja A, Sowers JR. Cardiometabolic syndrome: Pathophysiology and treatment. Curr Hypertens Rep. 2003; 5:393–401.

Cercado C, Mancini MC, Arguello AM, Passos VQ, Vilares SM, Halpern A. Systemic hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia in relation to body mass índex: evaluation of a Brazilian population. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo. 2004; 59(3): 113-8.

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.

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

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

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.

de Simone G, Devereux RB, Chinali M, Roman MJ, Best LG, Welty TK, Lee ET, Howard BV; Strong Heart Study Investigators. Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: the Strong Heart Study. Hypertension. 2006; 47(2):162-7.

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

Després JP. The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. Obes Res. 1998; 6(Suppl 1):8S-17S.

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

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

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.

Feletou M, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291(3):H985-1002.

Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. J Agric Food Chem. 2000; 48(12): 6384-90.

Fortunõ A, Bidegaina J, San José G, Robador PA, Landechob MF, Beloqui O, Díez J and Zalbaa G. Insulin resistance determines phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase overactivation in metabolic syndrome patients. Journal of Hypertension. 2009; 27:1420–1430

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.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet. 1993; 341(8843): 454-7.

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

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.

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.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. Science. 2005; 307:426-30.

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

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

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.

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

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.

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

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.

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

Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. AM J Cardio. 1998; 81:18B-25B.

Gunther AL, Liese AD, Bell RA, Dabelea D, Lawrence JM, Rodrigues BL, Standiford DA, Mayer-Davis EJ. Association Between the Dietary Approaches to Hypertension Diet and Hypertension in Youth With Diabetes Mellitus. Hypertension. 2009; 53: 6-12

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

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

Heitzer T, Schilinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial Dysfunction, oxidative stress, and risck of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation. 2001; 104:2673-2678.

Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, Travlos G, Ghanayem BI. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice**.** Endocrine.2009; 36(2):311-25.

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

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

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res. 1987; 61 (6):866-79.

Kaplan NM. Systemic hypertension: mechanism and diagnostic.En: heart disease (eds. Braunwald E; Zipes D.P., Libby P.) Editora W.B. Saunders, Philadelphia. 2001; 941-971.

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG and Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. Am J Clin Nutr. 2005; 81: 298S-303S.

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.

Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab. 1982; 54(2):254-260.

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.

Lamarche B. Abdominal obesity and its metabolic complications: implications for the risk of ischaemic heart disease. Coron Artery Dis. 1998; 9(8):473-81.

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

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.

Lerario DD, Gimeno SG, Franco LJ, Iunes M, Ferreira SR. Weight excess and abdominal fat in the metabolic syndrome among Japanese-Brazilians. Rev Saúde Pública. 2002; 36(1):4-11.

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

Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. Am J Cardiol. 2005; 96(7B):13-24.

Manach C, Mazur A and Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Curr Opin Lipidol. 2005; 16:77-84.

Matsunaga Y. Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: The Japanese experience. Diabetes Metab Rev. 1997; 13:3-13.

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.

Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J. 1984; 218(1):273-75.

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.

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

Niskanen L, Laaksonen DE, Nyyssonen K, Punnonen K, Valkonen VP, Fuentes R, Tuomainen TP, Salonen R, Salonen JT. Inflammation, Abdominal Obsesity, and Smoking as Predictors of Hypertension. Hyperyension. 2004; 44: 859-865.

Nishina M, Kikuchi T, Yamazaki H, Kameda K, Hiura M, Uchiyama M. Relationship among systolic blood pressure, serum insulin and leptin, and visceral fat accumulation in obese children. Hypertens Res. 2003; 26(4): 281-288.

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.

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.

Parrinello G, Scaglione R, Pinto A, Corrao S, Cecala M, Di Silvestre G, Amato P, Licata A, Licata G. Central obesity and hypertension: the role of plasma endothelin. Am J Hypertens. 1996; 9:1186-1191.

Pauli 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.

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

Poza-Insfran DD, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). J Agric Food Chem. 2004; 52(6): 1539-45.

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.

Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC, Darley-Usmar V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. Free Rad Biol Med. 2002; 33(11):1465-34.

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

Rapopport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res. 1983; 9(4-5):281-296.

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistance, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichement and elevated hepatic lipase activity. Clin Biochem 2003; 36:421-429.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. Annu Rev Med 1993; 44:121-31.

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

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123(11): 1939-51.

Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? Circulation. 2003; 108:1546-1551.

Resende AC, Ballejo G, Salgado MC. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation. Braz J Med Biol Res. 1998; 31(9): 1229-35.

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

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

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.

Rodriguez WE, Joshua IG, Falcone JC, Tyagi SC. Pioglitazone prevets cardiac remodeling in high-fat, high-calorie-induced type 2 diabetes mellius. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291:H81-H87.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. Diabetes. 1998; 47(5):699-713.

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

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.

Shenoy U, Cassis L. Characterization of renin activity in brown adipose tissue. Am J Physiol. 1997; 272:C989–C999.

Sims EAH. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? Metabolism. 2001; 50:1499-504.

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, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. J Pharm Pharmacol. 2002; 54(11): 1515-20.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. J Clin Invest 1996; 97(11): 2601-2610.

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.

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.

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.

Takanori Tsuda. Regulation of adipocyte function by anthocyaninis;possibility of preventing the metabolic syndrome. Journal of Agricultural and food chemistry.2008; 56(3):642-646.

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.

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

The Seventh Report of the joint National Committee on Prevention, Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. U. S. Department of Health and Human Services. National of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. National High Blood Pressure Education Program. 2004; NIH Publication No. 04-5230.

Tiret L, Poirier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JJ, Dargie HJ, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F. The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. Hypertension. 1999; 33(5):1169-1174.

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, 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.

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

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev. 2000; 21(6):697-738.

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

Widder JD, Guzik TJ, Muller CF, Clempus RE, Schmidt HH, Dikalov SI, Griendling KK, Jones DP, Harrison DG. Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensina II. Arteriosclerose Thromb Vasc Biol.2007;27:762-768

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.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 1998; 391(6670): 900-904.

Wolk R, Shamsuzzaman ASM, Somers VK. Obesity, sleep apnea, and hypertension. Hypertension.2003; 42(6):1067 -74.

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

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 8(11):1288–1295.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated withboth lipoatrophy and obesity. Nat Med. 2001; 7:941–946.

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.

Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. Circulation. 1979; 60(3):473-485.