



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Patricia Leticia Trindade

**Modulação da adipogênese pelo extrato do caroço de açaí em adipócitos**

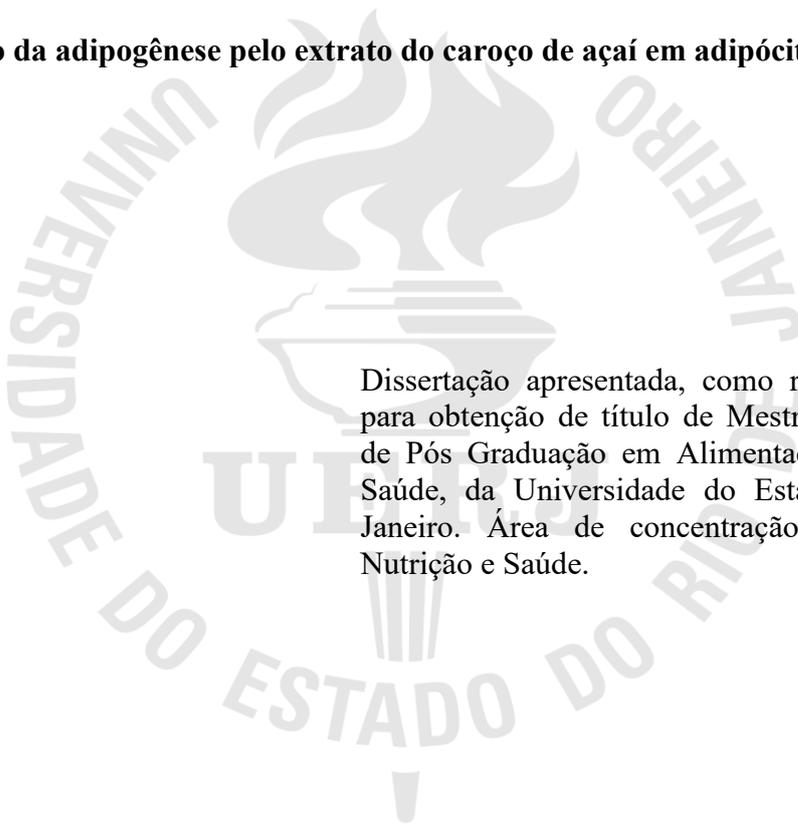
**3T3-L1**

Rio de Janeiro

2017

Patricia Leticia Trindade

**Modulação da adipogênese pelo extrato do caroço de açaí em adipócitos 3T3-L1**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Prof. Julio Beltrame Daleprane

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Danielly C. Ferraz da Costa

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

T833 Trindade, Patricia Leticia.  
Modulação da adipogênese pelo extrato do caroço de açaí em adipócitos 3T3-  
L1 / Patricia Leticia Trindade. – 2017.  
61 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane  
Co-orientadora: Danielly C. Ferraz da Costa  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto  
de Nutrição

1. Nutrição – Teses. 2. Açaí – Teses. 3. Obesidade – Teses. I. Daleprane,  
Julio Beltrame. II. Costa, Danielly C. Ferraz da. III. Universidade do Estado do  
Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es

CDU 612.3

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

---

Assinatura

---

Data

Patricia Leticia Trindade

**Modulação da adipogênese pelo extrato do caroço de açaí em adipócitos 3T3-L1**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em 28 de julho de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carol Virgínia Gois Leandro  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Citelli dos Reis  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, por toda força, determinação e lucidez que sempre me concede em todas as horas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria das Graças Silva, minha base de tudo. Aquela que sempre me incentiva e sempre fez o possível e, principalmente, o impossível para que eu estivesse aqui hoje – Amo você!

Ao meu noivo e companheiro de vida, Rodrigo Castro, que me apoia e me compreende como ninguém. Obrigada por toda paciência por estes longos meses e por estar sempre ao meu lado – Te amo.

Ao meu querido orientador prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane, por ter acreditado em mim e me concedido esta oportunidade maravilhosa. Obrigada por todos os conselhos, palavras de incentivo, amizade e orientação. Não poderia ter tido melhor pessoa para me orientar e me mostrar que sempre podemos fazer mais e melhor.

A minha querida coorientadora prof. Dra. Danielly C. Ferraz da Costa, por toda compreensão, amizade e apoio. Sua presença foi fundamental. Obrigada por ser sempre tão solícita e estar disposta a me ajudar nesta caminhada.

Aos meus queridos “Uerjianos”, Carol, Dani e Victor. Obrigada por toda loucura e companheirismo desde o primeiro minuto desta estrada. Sem vocês não teria sido tão proveitoso e enriquecedor.

A minha querida amiga Elaine dos Ramos Soares. O que seria da minha vida sem você nesse mestrado?! Obrigada por me aturar, equilibrar e me dar forças quando eu acreditava não ter mais. Obrigada por ser este presente precioso na minha vida.

À Izabelle Barcellos, por ser esta amiga cheia de amor. Sua presença sempre me acalmava e me centrava, trazendo palavras tão doces e extremamente sábias. Obrigada por tudo, tudo mesmo!

À Elisa Bernardes Monteiro, que mesmo distante se fez tão presente em todos os momentos, me apoiando e incentivando. Obrigada por esta amizade tão linda!

À Paula Normando dos Reis, Carolyne Pimentel e Joana Pereira Novais, por todo apoio, amizade e carinho sem fim.

A toda família do LEING, pois somos de fato uma família. Nenhum agradecimento no mundo será suficiente para expressar tudo que sinto por vocês.

A experiência humana não seria tão rica e gratificante se não existissem obstáculos a superar. O cume ensolarado de uma montanha não seria tão maravilhoso se não existissem vales sombrios a atravessar.

*Helen Keller*

## RESUMO

TRINDADE, P. L. **Modulação Da Adipogênese Pelo Extrato do Caroço de Açaí em Adipócitos 3T3-L1**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A adiposidade corporal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Estudos sobre o processo de adipogênese têm sido extensivamente realizados em modelos *in vitro*, com o intuito de descrever as bases moleculares e celulares do desenvolvimento do tecido adiposo, permitindo assim a formulação de estratégias terapêuticas e preventivas da obesidade. O extrato hidroalcolico do açaí (ASE) tem sido evidenciado como potencial regulador da massa corporal, agindo na redução do conteúdo de tecido adiposo em modelos experimentais de obesidade. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ASE na modulação da adipogênese. Para realização do trabalho, células 3T3-L1 foram diferenciadas a adipócitos. As células foram incubadas com diferentes concentrações de ASE no período prévio (Pré-tratamento) à indução da diferenciação celular e após o mesmo (Tratamento). Foram realizados ensaios de viabilidade, acúmulo de triglicérides intracelulares, expressão de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e morte celular. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição ao ASE, de forma dose dependente, levou a uma diminuição ( $P < 0,05$ ) da proliferação e viabilidade celular, inibiu ( $p < 0,05$ ) a diferenciação por meio da diminuição da expressão de fatores de transcrição e proteínas adipogênicas (PPAR $\gamma$ , SREBP-1 e FAS), além de promover aumento da expressão da proteína P53 e provocar morte celular mediada por apoptose e necrose. Em conjunto, os resultados obtidos expõem a atuação dos compostos fenólicos presentes no ASE e reforça, embora que em ensaios *in vitro*, o potencial deste extrato como um possível fator de modulação da adipogênese.

Palavras chave: Açaí. Compostos fenólicos. Adipogênese. Obesidade. 3T3-L1.

## ABSTRACT

TRINDADE, P. L. **Modulation of adipogenesis by açai seed extract in 3T3-L1 adipocytes.** 61 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Body adiposity is an important risk factor for the development of chronic non-communicable diseases (NCD). Studies on the process of adipogenesis have been extensively performed in *in vitro* models, to describe the molecular and cellular bases of adipose tissue development, thus allowing the formulation of therapeutic and preventive strategies of obesity. The açai seed extract (ASE) has been evidenced as a potential regulator of body mass, acting in reduction of the content of adipose tissue in experimental models of obesity. In this way, the aim of this study was to evaluate the effects of ASE on the modulation of adipogenesis. To perform the work, 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes. The cells were incubated with different concentrations of ASE in the previous period (Pretreatment) to induce cell differentiation and after it (Treatment). Tests of viability, accumulation of intracellular triglycerides, expression of proteins involved in lipid metabolism and cell death were performed. The results showed that the ASE exposure, in a dose dependent manner, led to a decrease ( $P < 0.05$ ) in proliferation and cell viability, inhibited ( $P < 0.05$ ) differentiation through the decreasing expression of transcription factors and adipogenic proteins (PPAR $\gamma$ , SREBP-1 and FAS), in addition to promoting increased expression of P53 protein and cause cell death mediated by apoptosis and necrosis. Taken together, the results show the performance of the phenolic compounds present in ASE and reinforce, although in *in vitro* assays, the potential of this extract as a possible modulation factor of adipogenesis.

Keywords: Açai. Phenolic Compounds. Adipogenesis. Obesity. 3T3-L1.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGL -	Ácidos graxos livres
AMPc -	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA -	Análise de variância
ASE -	Extrato do caroço de açaí
C/EBP -	Proteína amplificadora de ligação ao CCAAT
DEX -	Dexametasona
DMEM -	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
ECGC -	Epicatequina galato
FABP -	<i>Fatty acid binding protein</i> (inglês) ou proteína ligadora de ácidos graxos (português)
FAS -	<i>Fatty acid synthase</i> (inglês) ou ácido graxo sintase (português)
FAT/CD36 -	<i>Fatty acid translocase/CD36</i> (ingles) ou ácido graxo translocase/CD36 (português)
FATP -	<i>Fatty acid transporter protein</i> (inglês) ou proteína transportadora de ácidos graxos (português)
FBS -	<i>Fetal bovine serum</i> (ingles) ou soro bovino fetal
GLUT - 4	Transportador de glicose tipo 4
IMBX -	3-isobutil-1metilxantina
IGF - 1	Fator 1 semelhante à insulina
IL - 1	Interleucina 1
IL - 6	Interleucina 6
LPL	Lipoproteína lipase
MCP - 1	Proteína quimiotática para monócitos
NEFA	<i>Nonesterified fatty acid</i> (inglês) ou ácido graxo não esterificado (português)
PAI - 1	Inibidor 1 de ativador de plasminogênio
PBS -	Solução salina tamponada com fosfato
PI -	Iodeto de Propídio
PPARs -	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas
PPAR $\gamma$ -	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas
PS -	Fosfatidilserina

TAB -	Tecido adiposo branco
TAG -	Triacilglicerol
TAM -	Tecido adiposo marrom
TNF - $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UCP-1 -	Proteína desacopladora - 1

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de diferenciação do adipócito .....	18
Figura 2 - Metabolismo da glicose no tecido adiposo .....	20
Figura 3 - Evolução da diferenciação adipocitária .....	28
Figura 4 - Esquema simplificado de obtenção do extrato seco do caroço de açaí - ASE. ....	31
Figura 5 - Desenho experimental - Modelo 1.....	32
Figura 6 - Modelo experimental – Modelo 2.....	33
Figura 7 - Viabilidade celular: Fibroblasto .....	39
Figura 8 - Viabilidade celular: Grupo Pré tratamento e Tratamento.....	40
Figura 9 - Diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos - Grupo Pré tratamento. ..	42
Figura 10 - Diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos - Grupo Tratamento. ....	42
Figura 11 - Microscopia pré ensaio de quantificação de triglicerídeos (Grupo Pré Tratamento e Tratamento). ....	43
Figura 12 - Efeito do ASE na quantificação de triglicerídeos (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).....	44
Figura 13 - Efeito do ASE na expressão de PPAR $\gamma$ (Grupo Pré Tratamento e Tratamento)...	45
Figura 14 - Efeito do ASE na expressão de FAS (Grupo Pré Tratamento e Tratamento). ....	45
Figura 15 - Efeito do ASE na expressão de SREBP-1 (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).....	46
Figura 16 - Efeito do ASE na indução da morte celular por apoptose e necrose (Grupo Pré Tratamento e Tratamento). ....	47
Figura 17 - Efeito do ASE na expressão proteica de P53 (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do ASE na viabilidade celular – Grupo Pré tratamento.....	40
Tabela 2 - Efeito do ASE na viabilidade celular – Grupo Tratamento.....	41
Tabela 3 - Efeito do ASE na diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos – Grupo Pré tratamento.....	43
Tabela 4 - Efeito do ASE na diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos – Grupo Tratamento.....	43

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Obesidade e Adipogênese</b> .....	16
1.2	<b>Compostos fenólicos e Adipogênese</b> .....	23
1.3	<b>Açaí - Extrato do Caroco de Açaí</b> .....	25
1.4	<b>Modelo de diferenciação 3T3-L1</b> .....	26
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	29
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	29
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	<b>Obtenção do Extrato do Caroco de Açaí (ASE)</b> .....	30
3.2	<b>Cultivo Celular</b> .....	31
3.2.1	<u>Manutenção da cultura celular</u> .....	31
3.2.2	<u>Desenho experimental</u> .....	32
3.2.3	<u>Ensaio de diferenciação em pré adipocitos</u> .....	33
3.3	<b>Viabilidade Celular</b> .....	34
3.3.1	<u>Alamar Blue</u> .....	34
3.4	<b>Determinação de Triglicerídeos</b> .....	34
3.4.1	<u>Coloração com Oil Red O</u> .....	34
3.4.2	<u>Triglicerídeos Monorreagente</u> .....	35
3.5	<b>Western Blotting</b> .....	35
3.5.1	<u>Preparação e quantificação das amostras:</u> .....	35
3.5.2	<u>Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições denaturantes:</u> .....	36
3.5.3	<u>Eletro-transferência das proteínas:</u> .....	36
3.5.4	<u>Imunodeteccção das proteínas de interesse:</u> .....	36
3.6	<b>Ensaio de Morte Celular</b> .....	37
3.6.1	<u>Marcação Celular com Anexina V-FITC (anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína) e Iodeto de Propídio</u> .....	37
3.7	<b>Análise Estatística</b> .....	38
4	<b>RESULTADOS</b> .....	39
4.1	<b>Viabilidade Celular</b> .....	39
4.2	<b>Diferenciação celular, incorporação e quantificação de triglicerídeos</b> .....	41

4.3	<b>Efeito do ASE na expressão de proteínas envolvidas no processo de adipogênese.....</b>	44
4.4	<b>Efeito do ASE sobre a morte celular de adipócitos 3T3-L1.....</b>	46
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	48
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	52
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	53

## INTRODUÇÃO

A obesidade é um distúrbio multifatorial definido como um acúmulo excessivo de lipídios no tecido adiposo devido a um balanço energético positivo (SUASTIKA, 2006). O sedentarismo e os hábitos alimentares parecem ser os principais responsáveis pelo desenvolvimento deste agravo (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

A adiposidade corporal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas patológicas, como a resistência à insulina (CHAN et al., 2004; ROSA et al., 2005), diabetes tipo 2, aterosclerose e síndrome metabólica (GOODPASTER; THAETE; KELLEY, 2000). Neste contexto, o processo de diferenciação do tecido adiposo, fenômeno denominado adipogênese, tem sido extensivamente realizados em modelos *in vitro*, com o intuito de desvendar a base molecular e celular do desenvolvimento do tecido adiposo, além de seu comprometimento em estados fisiológicos e patológicos, permitindo assim a formulação de estratégias terapêuticas e preventivas da obesidade (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

O consumo de compostos bioativos com propriedades biológicas, como compostos fenólicos, exerce impacto significativo sobre a saúde humana. Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado evidências de que os compostos fenólicos contribuem significativamente na redução da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) encontradas em populações cujas dietas são ricas em alimentos fontes destes compostos (LIU, 2003; SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005).

Já foram reportados em torno de 10.000 compostos fenólicos, e estes constituem uma ampla classe de metabólitos secundários de vegetais e a maior categoria de agentes fitoquímicos (FRAGA et al., 2010). Os três maiores grupos de compostos fenólicos da dieta são os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos, e são conhecidos por apresentarem atividades biológicas promotoras de saúde (SMITH, 2007).

Evidências crescentes têm atribuído aos compostos fenólicos efeito sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos, e a função do receptor de insulina (KLAUS et al., 2005). Entre as principais fontes de compostos fenólicos podemos destacar o chá verde, o vinho, as frutas vermelhas, e as isoflavonas da soja (SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2009).

O Brasil possui uma flora diversificada, em toda sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos ainda são desconhecidos. As regiões Norte e Nordeste se destacam por produzirem grandes variedades de frutos tropicais, nativos e exóticos, com boas perspectivas para exploração econômica em decorrência de suas

condições climáticas. Dentre os frutos nativos da Amazônia que apresentam maior dinâmica da produção, comercialização e inserção nos mercados nacional e internacional podemos citar o açaí (*Euterpe orlacea* Mart) (NOGUEIRA; SANTANA; GARCIA, 2013).

Diversos trabalhos têm mostrado que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) é rico em catequinas e proantocianidinas poliméricas, apresentando maior conteúdo fenólico e ação vasodilatadora mais potente quando comparado com sua polpa (ROCHA et al., 2008; SOARES DE MOURA et al., 2012). Adicionalmente, estudos realizados em modelos experimentais de obesidade e síndrome metabólica relatam que o ASE é capaz de regular a massa corporal, reduzindo o conteúdo de tecido adiposo em animais alimentados com dieta hiperlipídica (DE OLIVEIRA et al., 2015b).

Diante disto, e levando em consideração que a adipogênese é um evento complexo e que pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo os componentes de origem alimentar e o controle da obesidade, a descrição de possíveis mecanismos regulatórios da adipogênese, exercida por compostos fenólicos presentes no ASE, torna se importante para o manejo e o controle da patologia.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Obesidade e Adipogênese

A obesidade é uma doença crônica complexa e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, incluindo mudanças nos hábitos alimentares, predisposições genéticas e sedentarismo (ALWAN; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; PARK et al., 2014a). É um dos principais problemas de saúde pública no mundo, atingindo não apenas nações industrializadas, como também países em desenvolvimento, tornando-se fator de risco para outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e o diabetes mellitus tipo 2 (ALWAN; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; OGLESBY et al., 2006). Um dos mecanismos propostos para explicar a etiologia da obesidade é a hiperplasia do tecido adiposo, resultando de um aumento no número de adipócitos através da adipogênese, levando a um subsequente aumento no acúmulo de lipídios neste tecido (PARK, 2014).

O tecido adiposo é derivado do mesoderma, e distribuído em regiões de tamanho variável, sendo composto por uma matriz extracelular e um conjunto de células, como os adipócitos, que possuem um elevado teor de lipídios, e as células estromovasculares: pré-adipócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, pericitos, macrófagos, células reticulares e células-tronco (HANSEN; KRISTIANSEN, 2006; ITOH et al., 2011; MARTINEZ-SANTIBAÑEZ; CHO; LUMENG, 2014; MCARDLE et al., 2013; SETHI; VIDAL-PUIG, 2007).

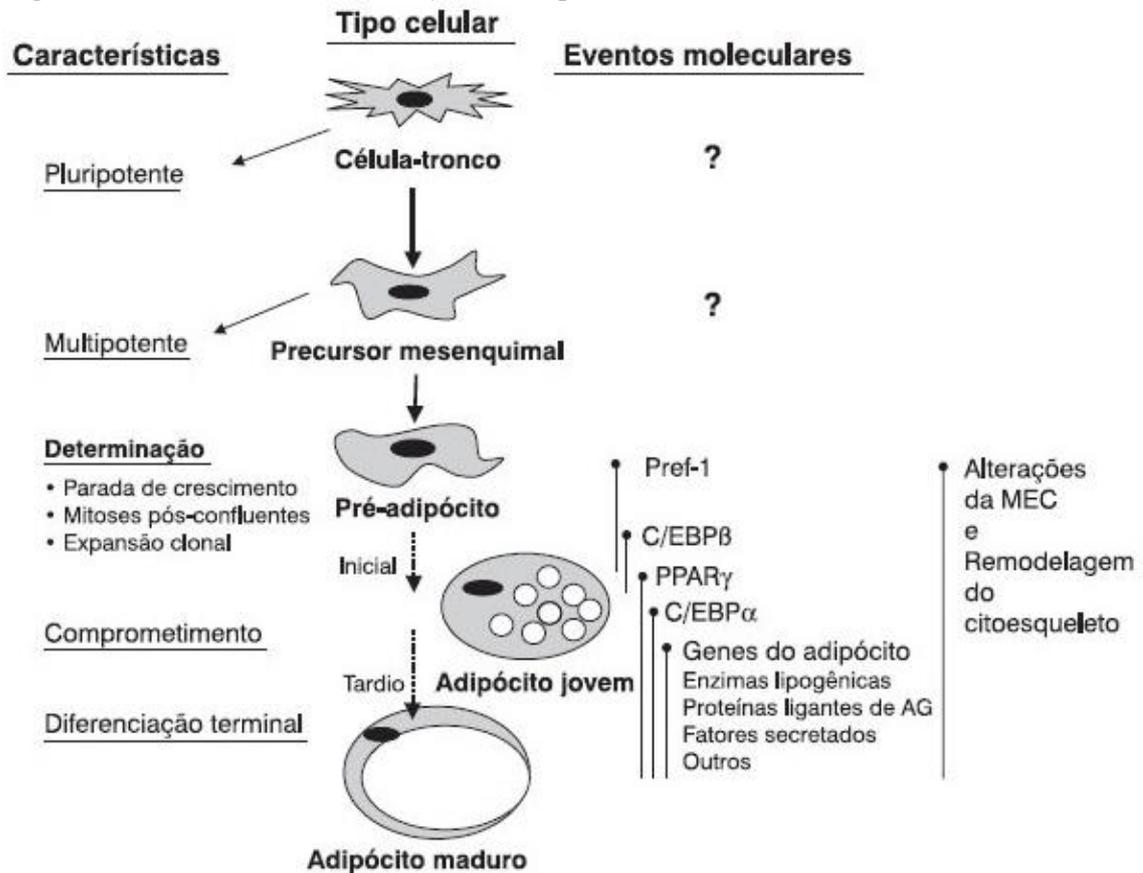
Microscopicamente, dois tipos de adipócitos podem ser distinguidos, os adipócitos marrons, que possuem conteúdo intracelular com muitas mitocôndrias, e os adipócitos brancos, com menor conteúdo mitocondrial. Dessa maneira, dois tipos de tecido adiposo podem ser identificados em mamíferos no aspecto macroscópico: tecido adiposo marrom, composto predominantemente por adipócitos marrons e uma rede de capilares amplamente distribuída; e o tecido adiposo branco, que contém predominantemente adipócitos brancos e é pobremente vascularizado (IKEOKA; MADER; PIEBER, 2010; PARK, 2014). Nos últimos anos, foram identificados também adipócitos bege, que apresentam algumas propriedades similares as dos adipócitos marrons, incluindo a capacidade de expressar a proteína desacopladora-1 (UCP-1), que até recentemente era descrito como o único marcador para os adipócitos marrons, porém não possui todas as características moleculares dos adipócitos marrons (SHINODA et al., 2015).

O adipócito branco, presente no tecido adiposo branco (TAB), durante seu desenvolvimento, armazena triglicerídeos em múltiplas gotículas lipídicas, que coalescem formando uma inclusão lipídica unitária, caracterizando o seu amadurecimento. Esta gotícula ocupa a porção central da célula, correspondendo a 85-90% da massa celular, promovendo o deslocamento do citoplasma, núcleo e das demais organelas para a periferia da célula. Embora tenham volume variável, os adipócitos brancos maduros, são células grandes, com diâmetro médio entre 60-100  $\mu\text{m}$  e podem alterar acentuadamente seu tamanho conforme a quantidade de triglicerídeos acumulada em seu interior (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; SUZUKI et al., 2011). O aumento da massa adiposa ocorrida na obesidade é determinado pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia) no TAB.

O tecido adiposo marrom (TAM) é especializado na dissipação de energia, na forma de calor, durante a termogênese induzida pelo frio e pela dieta. Seu adipócito, com 30-40  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio, é menor que o branco, possuindo várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos. Apresenta citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico, além de numerosas mitocôndrias que liberam calor através da oxidação dos ácidos graxos (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; SUZUKI et al., 2011). Já os adipócitos bege, apresentam origem completamente independente, que ainda não foi bem estabelecida (ISHIBASHI; SEALE, 2010). Em regiões de depósito de TAB, a exposição prolongada ao frio ou agonistas  $\beta_3$ -adrenérgicos causa uma transdiferenciação no tecido adiposo de branco para bege, fazendo com que este adipócito possa, por exemplo, produzir calor (SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009).

Os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes, localizadas no estroma do tecido adiposo (**Figura 01**). Estas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e se direcionam para a linhagem adipocitária. Esta fase inicial da diferenciação do adipócito é conhecida como determinação ou comprometimento. A segunda fase da adipogênese é denominada diferenciação intermediária/terminal, que consiste na ativação de eventos transcricionais em cascata, os quais permitem que os pré-adipócitos adquiram características de adipócitos maduros, acumulando assim, gotas lipídicas, além da habilidade de responder a hormônios, como a insulina (AILHAUD; HAUNER, 2003).

Figura 1 - Processo de diferenciação do adipócito



AG: Ácido graxo; C/EBP: Proteína amplificadora ligante ao CCAAT; MEC: Matriz extracelular; PPAR $\gamma$ : Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas; Pref-1: fator pré adipócito – 1. Adaptado de FONSECA-ALANIZ et al., 2007.

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, inflamação e aterogênese, além do metabolismo lipídico (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

A identificação e a caracterização do PPAR $\gamma$  foram fundamentais para o entendimento da fisiologia do tecido adiposo. Duas isoformas foram identificadas, PPAR $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 2, geradas por *splicing* alternativo do mesmo gene. PPAR $\gamma$ 2 é idêntico ao PPAR $\gamma$ 1, exceto pelo fato deste último conter 30 aminoácidos adicionais na região N-terminal. Ao contrário do PPAR $\gamma$ 1, o qual é amplamente expresso nos diferentes tecidos, a expressão do PPAR $\gamma$ 2 é restrita ao tecido adiposo (TONTONNOZ et al., 1994).

O PPAR $\gamma$  tem sido descrito como o regulador central da adipogênese. A expressão ectópica de PPAR $\gamma$ 2 em fibroblastos em cultura direciona a diferenciação das células em adipócitos (TONTONNOZ et al., 1994). Estudos de perda de função em células fibroblásticas,

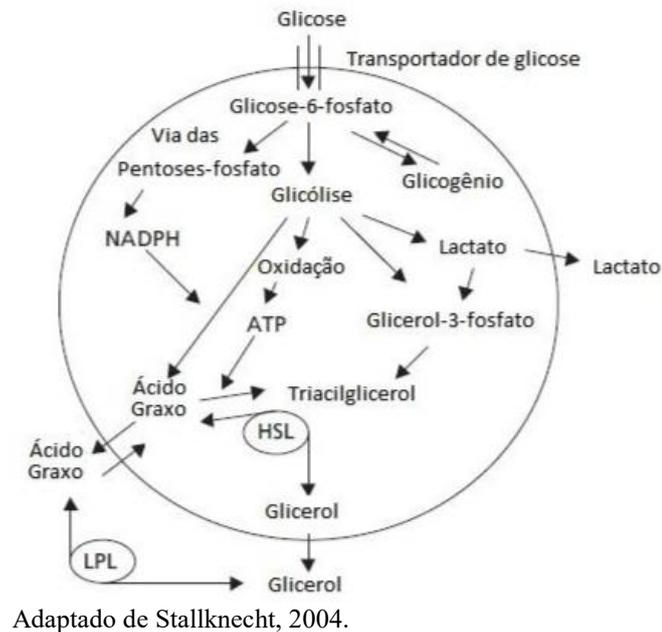
também demonstram que o PPAR $\gamma$  é essencial para a diferenciação de adipócitos (KOUTNIKOVA et al., 2003).

Sua ativação na adipogênese envolve uma cascata transcricional que inclui membros da família do C/EBP. Com base em estudos em cultura de células, um modelo coerente, no qual o tratamento hormonal de pré-adipócitos induz C/EBP- $\beta$  e - $\delta$ , foi desenvolvido. A partir daí, essas proteínas ligam-se diretamente ao PPAR $\gamma$ , ativando-o. O PPAR $\gamma$ , sob a ação do ligante, induz muitos genes- alvos envolvidos na lipogênese e adipogênese, e isto também ativa a expressão do C/EBP- $\alpha$ . Este se liga ao sítio do C/EBP no promotor do PPAR $\gamma$ . A evidência genética para esse cenário é clara: PPAR $\gamma$  é suficiente e necessário para a diferenciação da célula adiposa, como já descrito acima. A sua expressão em células que não expressam C/EBP- $\alpha$  promove diferenciação normal do adipócito. Por outro lado, C/EBP- $\alpha$  não possui a habilidade de promover a adipogênese na ausência do PPAR $\gamma$  (AMRI et al., 1991).

A insulina é um hormônio produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas e tem por função, juntamente com o glucagon, coordenar o fluxo e o destino metabólico da glicose endógena, dos ácidos graxos livres, aminoácidos e de outros substratos que garantem o suprimento das necessidades energéticas durante o estado basal e durante o exercício (GENUTH, 2004). Na regulação do metabolismo, a insulina exerce um papel anabólico, estimulando a captação de glicose em suas células-alvo (fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo) (RHOADES; TANNER, 2005), assim como processos de armazenamento de energia (lipogênese, síntese de glicogênio e proteínas) e inibindo processos catabólicos nestes mesmos tecidos, tal como lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas.

A insulina é, provavelmente, o mais importante fator hormonal envolvido na regulação da lipogênese. Seus efeitos são iniciados pela sua ligação ao seu receptor na superfície celular, ativando a tirosina quinase do seu receptor e iniciando a sequência de reações da transdução do sinal, que culminará na síntese de lipídios (STALLKNECHT et al., 2004). Na figura 02, podemos observar uma visão esquemática do metabolismo de glicose no tecido adiposo.

Figura 2 - Metabolismo da glicose no tecido adiposo



Ao se ligar ao sítio extracelular em seu receptor, nas respectivas células, provoca uma fosforilação em tirosina da sua subunidade  $\beta$  e isto desencadeia uma sequência de eventos que culmina com a migração dos transportadores de glicose, GLUT-4, do citoplasma para a membrana celular. Esta translocação é determinante para que o GLUT-4 facilite a captação de glicose pela célula. Tanto a translocação de maior número de transportadores GLUT-4 quanto a sua maior atividade, levam a um aumento da eficiência da captação de glicose estimulada pela insulina (WILDMAIER et al., 2006). A glicose fornece substrato para a síntese de triacilgliceróis (TAG) pelo tecido adiposo, podendo ser convertida, no interior do adipócito, em glicerol-3-fosfato, utilizado na esterificação de ácidos graxos, ou diretamente em ácidos graxos pela via da lipogênese de novo (FRAYN, 2003).

Na lipogênese em humanos, quase todos os TAGs armazenados nos adipócitos são derivados da captação na corrente sanguínea de ácidos graxos livres (AGL). Os AGL podem estar ligados e serem transportados pela albumina ou podem ser liberados pela hidrólise de TAG (incorporados em lipoproteínas) circulante sob ação da lipoproteína lipase (LPL) presente nas superfícies endoteliais dos capilares, esta enzima é expressa no tecido adiposo e em vários outros tecidos. No TAB, a LPL é fortemente supra-regulada através da ação da insulina. Isto dá ao TAB um papel especial na remoção e armazenamento dos TAG em circulação no período pós prandial. A LPL é sintetizada nos adipócitos e depois exportada para os capilares onde se liga à parede luminal das células endoteliais através de uma interação com a superfície celular. As lipoproteínas são muito grandes para penetrar o

endotélio, logo, a LPL atua liberando AGL, que cruzam o endotélio alcançando os adipócitos (WILLIAMS; FRÜHBECK, 2009). A entrada dos AGL no adipócito exige processos específicos que envolvem transportadores (FAT/CD36, FATP, FABP), que facilitam a entrada dos ácidos graxos na célula (IBRAHIMI et al., 1996).

O aumento excessivo do tamanho dos adipócitos, ocasiona lentamente o recrutamento de novas células que serão emergidas deste tecido e as modificações no número de adipócitos (hiperplasia) dependerá da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (COLEMAN; LEE, 2004). Modificações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação da lipogênese e lipólise, não sendo um processo ilimitado e eventualmente, seu crescimento atinge um patamar máximo, onde sua capacidade de armazenamento de gordura é esgotada. Tais alterações variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que dependem, dentre outros fatores, do estado nutricional, gasto energético, influência de hormônios catabólicos ou anabólicos, atividade de enzimas envolvidas nestes processos e da heterogeneidade característica existente entre os diversos grupamentos adiposos do organismo (QUEIROZ et al., 2009).

Em condições de excesso de nutrientes, o tecido adiposo se expande e os adipócitos se tornam hipoperfundidos, o que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo local e hipóxia em algumas regiões do tecido (EMANUELA et al., 2012), promovendo a secreção de proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP-1) e de citocinas pró-inflamatórias, tais como o inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), proteína 4 ligadora de retinol e proteínas de fase aguda (TILG; MOSCHEN, 2006) ocasionando então a infiltração de células do sistema imune. A expansão dos adipócitos também diminuí o número de células T regulatórias e aumenta o número de células TH1, que por sua vez levam à polarização de macrófagos do tipo M2 “alternativamente ativados” para um fenótipo pró-inflamatório chamado de “classicamente ativados” ou M1, aumentando assim a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1b e IL-6 (MCARDLE et al., 2013; PATEL; BURAS; BALASUBRAMANYAM, 2013).

Durante todo o ciclo celular, os mecanismos de morte também assumem importante papel no processo de manutenção dos sistemas celulares, onde duas vias são amplamente descritas: Necrose e Apoptose.

As características morfológicas da morte por necrose compreendem o aumento do volume celular, a vacuolização do citoplasma e o rompimento da membrana plasmática. A necrose é classificada como uma morte acidental, resultado da exposição a condições físico-químicas extremas ou insultos mecânicos. Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado

que as características morfológicas da necrose também são observadas em situações nas quais a morte celular ocorre de forma regulada, a qual envolve uma maquinaria molecular específica, sendo possível sua modulação. Já as características morfológicas da morte por apoptose incluem a redução do volume celular, a condensação e fragmentação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos que, a princípio, retêm a integridade da membrana plasmática (EDINGER; THOMPSON, 2004).

A morte por apoptose é uma morte regulada, pois ocorre de forma coordenada por meio de cascatas de sinalização com uma variedade de mecanismos que convergem na ativação de proteases específicas denominadas caspases, sendo classificada em duas vias: apoptose mediada pelas vias extrínseca e intrínseca. A apoptose pela via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte na superfície celular, já a via intrínseca envolve a permeabilização da membrana mitocondrial externa por meio da oligomerização de proteínas pró-apoptóticas, como BAX e BAK para formar poros na membrana, liberando outros fatores pró-apoptóticos como Citocromo C (GALLUZZI et al., 2015).

A proteína p53 é um fator de transcrição que responde a diversos sinais de estresse, como o dano ao DNA e estresse oxidativo, por meio da regulação de múltiplos eventos celulares, incluindo parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Diferentes modificações pós-traducionais regulam a atividade de p53 e em condições normais, é mantida em níveis basais por seu principal regulador negativo, a proteína MDM2. Em resposta a distintos estresses, modificações pós-traducionais de p53, como a fosforilação e a acetilação em resíduos específicos, promovem sua estabilização, pois perturbam a interação entre p53 e MDM2. Além disso, essas modificações permitem a translocação de p53 para o núcleo, onde interage com fatores transcricionais e se liga ao DNA na região promotora de genes que codificam proteínas moduladoras de diversas vias, ativando sua transcrição (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014).

O mecanismo clássico de ativação de apoptose por p53 resulta de sua atividade como fator de transcrição, promovendo a via extrínseca de apoptose através da ativação da expressão de receptores de morte celular. Além da atividade dependente de transcrição de p53 na promoção de apoptose, ela também exerce um papel direto na ativação da via intrínseca de apoptose independente de transcrição. Em resposta a sinais de estresse, a p53 citoplasmática é translocada para a mitocôndria, onde interage diretamente com proteínas anti-e pró-apoptóticas para inibir ou ativá-las, promovendo então a permeabilização da membrana mitocondrial externa (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014; HELTON; CHEN, 2007).

Embora p53 seja um dos genes mais bem descritos na literatura, muito pouco se sabe sobre seu papel nos adipócitos, além da indução da morte celular. Alguns estudos indicam que este fator de transcrição pode desempenhar um papel na biologia do adipócito por agir como um regulador negativo da adipogênese através da sua capacidade de bloquear a progressão do ciclo celular, que no caso da diferenciação de adipócitos parece bloquear a expressão de PPAR  $\gamma$ , o que estimula estudos sobre um envolvimento da p53 na regulação do metabolismo do tecido adiposo (HALLENBORG et al., 2009).

Este tecido, antes considerado apenas como órgão de armazenamento de energia, atualmente é reconhecido como órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas (adipocinas), além de manter intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos. As adipocinas (leptina, adiponectina, resistina, proteína estimuladora de ascilação - ASP, fator de necrose tumoral - TNF $\alpha$ , interleucina 6 - IL6 e o sistema vascular angiotensinogênio - PAI1) influenciam uma variedade de processos fisiológicos, entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a proteção vascular, a regulação da pressão, a coagulação sanguínea e a inflamação (OUCHI et al., 2011).

## 1.2 Compostos fenólicos e Adipogênese

Compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, e normalmente encontram-se conjugados com mono e polissacarídeos (CARDONA et al., 2013; REIN et al., 2013).

Estes compostos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, lhes conferindo sabor e cor, assim como possuem funções de defesa contra herbívoros e infecções microbianas, contra a radiação ultravioleta do sol, podendo também atuar como atrativo para insetos polinizadores e como agentes alelopáticos (DEL RIO et al., 2013; MARÍN et al., 2015). Já em animais e humanos, as propriedades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de diminuir a reatividade das espécies reativas, de modular a sinalização celular e de influenciar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (FRAGA; OTEIZA, 2011; THILAKARATHNA; RUPASINGHE, 2013).

Frutas e hortaliças fornecem compostos bioativos como fibras, vitaminas, minerais, carotenóides e compostos fenólicos que promovem benefícios à saúde, reduzindo o risco de

desenvolvimento de DCNT, como a obesidade (SLAVIN; LLOYD, 2012; TORRES-FUENTES et al., 2015).

Inúmeros estudos têm demonstrado que ácidos fenólicos, flavonoides e taninos apresentam efeitos benéficos como a redução do ganho de peso corporal e dos níveis de lipídios e de glicose circulantes, melhora da sensibilidade à insulina, diminuição da pressão arterial e da inflamação crônica em modelos animais de obesidade e/ou de diabetes (GARCÍA-CONESA, 2015).

Entre os alimentos mais estudados e seus possíveis benefícios em humanos estão: as frutas vermelhas (ricas em antocianinas e elagitaninos), relacionadas à modificação das concentrações de biomarcadores inflamatórios (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014); o chá verde, relacionado à redução dos níveis de lipídios, glicose e insulina plasmáticos (JOHNSON; BRYANT; HUNTLEY, 2012) e o cacau e seus derivados (rico em flavan-3-ols e proantocianidinas), associados à melhora da pressão arterial, da resistência à insulina, da função plaquetária e dos níveis de lipídios circulantes (LATHAM; HENSEN; MINOR, 2014).

Diferentes compostos bioativos em alimentos podem atuar na diferenciação e proliferação de pré-adipócitos. Experimentos *in vitro*, com concentrações crescentes de genisteína, presentes na soja, inibiram a proliferação de pré adipócitos, diferenciação em adipócitos maduros, indução a lipólise em adipócitos imaturos e menor expressão de PPAR $\gamma$  (HARMON; HARP, 2001). Em tratamentos com o mesmo composto, em doses superiores, ZHANG et al., 2009, observou a inibição do acúmulo lipídico e da produção de ácidos graxos não esterificados (NEFA), assim como a inibição da expressão de ácido graxo sintase (FAS).

Em experimentos com erva mate (*ilex paraguariensis*), GOSMANN et al., 2012, observou a redução do acúmulo lipídico intracelular, de maneira dose dependente, assim como, EJAZ et al., 2009, observou em experimentos com curcumina, a inibição, de forma dose dependente, da diferenciação celular de pré adipócitos em adipócitos maduros, além do menor acúmulo lipídico intracelular.

Em pesquisa com 6-gingerol, presente no gengibre, TZENG; LIU, 2013 pode observar durante seu estudo a redução do acúmulo lipídico intracelular e do tamanho das gotículas lipídicas intracelulares, de maneira dose dependente, assim como a diminuição dos níveis de PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e FAS, assim como PARK et al., 2014, observou a redução do volume de gotículas lipídicas intracelulares, de maneira dose dependentes, e inibição da diferenciação adipocitária em células tratadas com oligonol; CHEN et al., 2014, em trabalho com OCE (*oiltea camellia*), também observou a diminuição da proporção da formação de novos

adipócitos, diminuição do conteúdo lipídico das células e bloqueio efetivo da conversão de pré adipócitos em adipócitos, de maneira dose dependente, além da inibição do efeito da FAS.

Além dos compostos supracitados, já é de conhecimento científico, que os frutos de açaí são ricos em compostos fenólicos como a epicatequina, catequina e antocianinas. Em estudos realizados com modelos animais, a utilização do extrato hidroalcólico do caroço deste fruto, apresentou ação antioxidante (DA COSTA et al., 2012a; DE BEM et al., 2014; ROCHA et al., 2007), redução da resistência à insulina, melhora no perfil lipídico (DE OLIVEIRA et al., 2010), além de ter se mostrado eficaz ao prevenir o aumento da massa corporal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DE OLIVEIRA et al., 2015a).

### 1.3 Açaí - Extrato do Caroço de Açaí

O açaí, *Euterpe Oleracea Martius*, pertencente à família das palmeiras *Arecaceae* é uma fruta nativa da região amazônica consumida rotineiramente pela população na forma de polpa, suco, vinho e em outras variedades (GUERRA et al., 2011; KANG et al., 2010; SUN et al., 2010). É um fruto arredondado, de cor roxa, quase preta, apresentando diâmetro aproximado de 13 mm e pesando cerca de 2 gramas, composto por uma polpa violeta ( $\pm 17\%$ ) e uma semente bege ( $\pm 83\%$ ) (DE SOUZA et al., 2012).

Este fruto tornou-se um dos principais produtos da Amazônia e é exportado para outras regiões do mundo, inclusive América do Norte, principalmente depois de ter sido considerado um "superalimento" (DE SOUZA et al., 2012). Nos últimos anos o açaí tem sido objeto de muitos estudos devido ao seu alto potencial antioxidante e seu papel como alimento funcional. Entre seus componentes estão descritos os compostos fenólicos, como as antocianinas que conferem a este fruto uma de suas propriedades mais estudadas, a antioxidante (GUERRA et al., 2011; KANG et al., 2010).

Os estudos descrevendo a potencialidade das atividades funcionais do açaí são recentes e sua maioria teve início na última década, tendo como foco principal a sua composição química (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006). Análises dos componentes do açaí, constataram que entre os compostos fenólicos presentes neste fruto destacam-se os flavonóides, principalmente a classe das antocianinas, sendo a cianidina 3-glicosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo as mais predominantes, além de outros flavonóides identificados, tais como a epicatequina, catequina, homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina e

deoxihexose (SCHAUSS et al., 2006). Na literatura, o extrato do caroço de açaí (ASE), vem sendo descrito como um potente agente vasodilatador dependente do endotélio, induzindo a liberação de óxido nítrico (NO) por células endoteliais em cultura (ROCHA et al., 2007).

Recentemente, muitos compostos alimentares têm sido estudados por sua capacidade de prevenir distúrbios relacionados a obesidade. Alguns trabalhos observaram que o tratamento crônico o ASE, previniu o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e de alterações vasculares estruturais (DA COSTA et al., 2012b; ROCHA et al., 2008), além de possuir efeito benéfico na síndrome metabólica (DE OLIVEIRA et al., 2010), apresentando um perfil nutracêutico atrativo, demonstrando eficaz ação antioxidante, sem efeitos colaterais.

Outros experimentos, que utilizaram o tratamento com este extrato, demonstraram substancial redução do ganho de peso e adiposidade em ratos obesos que receberam dieta hiperlipídica, além da diminuição da ingestão alimentar (DE OLIVEIRA et al., 2015a), sugerindo que os possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti obesogênico do ASE se dê realmente pela sua composição rica em compostos fenólicos (RODRIGUES et al., 2006), podendo ser utilizado como uma importante ferramenta na prevenção e tratamento de diversas alterações fisiopatológicas.

#### 1.4 Modelo de diferenciação 3T3-L1

A linhagem celular 3T3-L1, oriundas de embriões de camundongos *Swiss* 3T3, vem sendo utilizada como modelo ideal para o estudo dos eventos moleculares responsáveis pela conversão de pré adipócitos em adipócitos (FÈVE, 2005; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000). Entretanto, cabe ressaltar, que a extrapolação dos resultados obtidos em modelos celulares *in vitro* deve ser realizada com cautela, uma vez que estes apresentam diferenças em relação aos modelos de cultivo primário de animais (ratos, camundongos e porcos) e de humanos. Esta linhagem institui um modelo viável para a análise da hipertrofia durante a adipogênese, visto que é altamente caracterizada e fornece uma população homogênea, podendo realizar culturas indefinidamente (FÈVE, 2005; MORENO; MARTÍNEZ, 2002; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000).

A indução da adipogênese, em pré adipócitos 3T3-L1, ocorre através da suplementação do meio de cultivo com um coquetel de hormônios indutores da diferenciação celular, composto por 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona (DEX) e insulina,

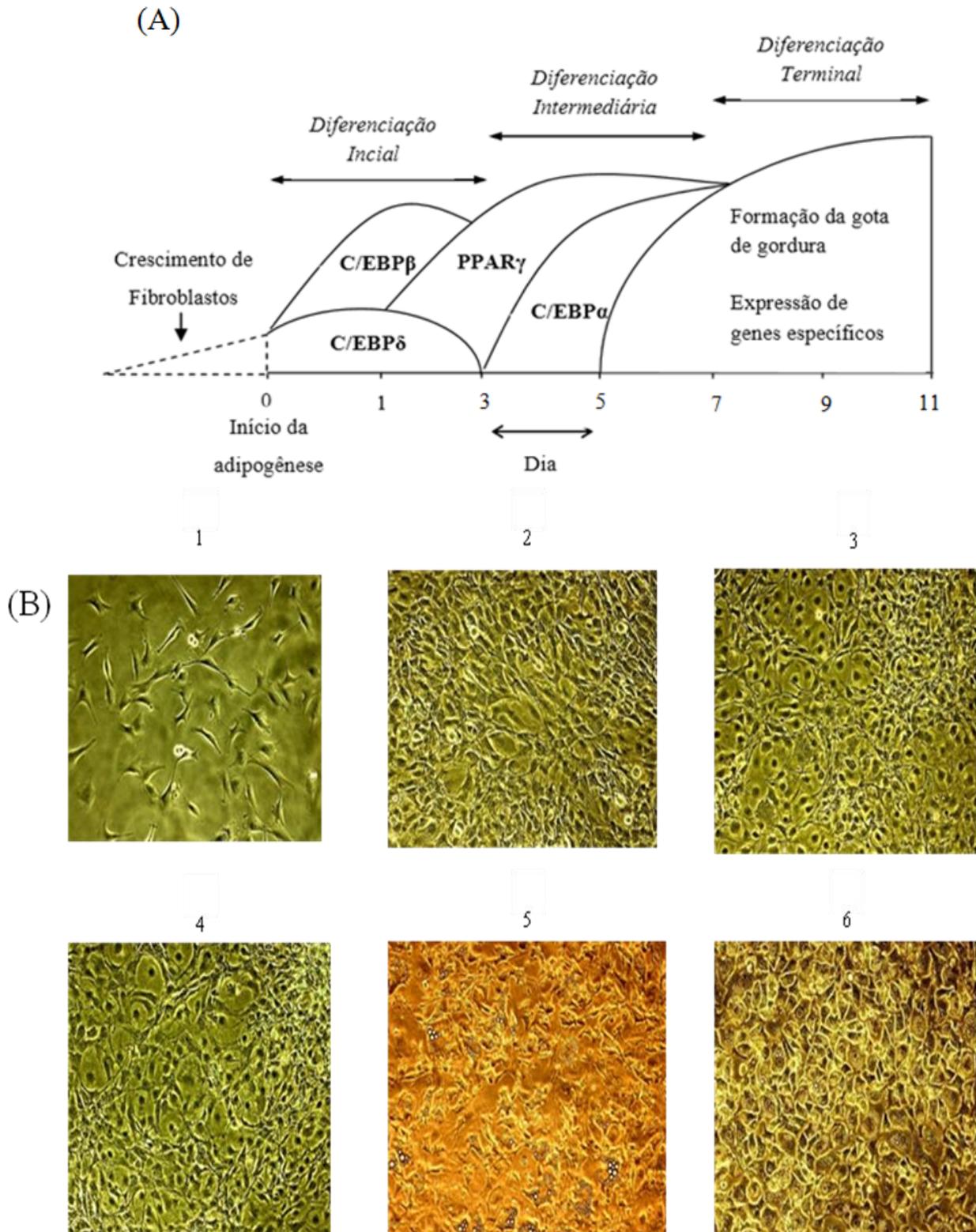
com objetivo de mimetizar o enriquecimento hormonal em estágios iniciais da diferenciação celular (TAKENOUCI; TAKAYAMA; TAKEZAWA, 2004; YANG et al., 2009).

O processo, *in vitro*, de adipogênese, compreende estágios bem organizados e ordenados, caracterizado por eventos iniciais, intermediários e terminais, onde ocorre a ruptura do ciclo celular, a expansão clonal e o processo de diferenciação (FÈVE, 2005; GREGOIRE, 2001; MORENO; MARTÍNEZ, 2002; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000; QUEIROZ et al., 2009) (**Figura 03**). Ao final do processo de diferenciação, essas células se assemelham aos adipócitos encontrados no tecido adiposo branco, no que condiz aos aspectos morfológicos, como acúmulo de triglicérides, e moleculares, como a expressão gênica (KATO et al., 2007).

Com objetivo de interromper a proliferação celular e estimular a adipogênese, as células 3T3-L1 são tratadas com indutores adipogênicos, que incluem um glicocorticoide (dexametasona), um receptor de fator 1 semelhante a insulina – IGF-1 e um agente que aumenta a concentração de AMPc intracelular (3-isobutil-1-metilxantina – IBMX). Além disso, há a adição de uma alta dose de glicose para estimular os receptores de IGF-1. Esses agentes, em conjunto, promovem a estimulação dos eventos iniciais representados pela expressão de proteínas ligantes ao amplificador – C/EPBs (isômeros  $\beta$  e  $\delta$ ) (**Figura 03**). Logo após, as células reiniciam seu ciclo celular, sofrendo divisão celular de forma regulada (expansão clonal) e saem permanentemente do ciclo celular, entrando em diferenciação terminal. Essa etapa ocorre por meio da ativação do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos – PPAR $\gamma$  e pela ativação de C/EPB $\alpha$ ; os quais são os reguladores principais da adipogênese (**Figura 03**). O PPAR $\gamma$  antecede a expressão de C/EPB $\alpha$ , onde a partir deste momento passaram a se retroestimar.

A expressão dos genes PPAR $\gamma$  e C/EPB $\alpha$  ativam a expressão dos genes que caracterizam o fenótipo adipocitário, como as enzimas ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase, além do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) e proteína ligadora de ácidos graxos (aP2/FABP). Por meio desse processo, no citoplasma celular aparecem gotas lipídicas, que ao longo do tempo ocupam grande parte do citoplasma.

Figura 3 - Evolução da diferenciação adipocitária



(A) Principais eventos durante a adipogênese, apresentados de forma cronológica. Áreas delimitadas pelos nomes dos genes representam períodos de expressão gênica. Na porção superior da figura, estão representados os diferentes estágios da diferenciação. C/EBPs: Proteínas ligantes ao amplificador (isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ), PPAR $\gamma$ : Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos. Adaptado de Queiroz, J. C. F., M. I. Alonso-Vale, et al. (2009). (B) (1) Fibroblasto; (2) Meio de indução após 48 horas; (3) Meio de Diferenciação após 48 horas; (4) Meio de diferenciação após 96 horas; (5) Meio de diferenciação após 144 horas; (6) Adipócito maduro.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência do extrato do caroço do açaí (ASE) na diferenciação e nos possíveis mecanismos moleculares da adipogênese em células 3T3-L1.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a influência do ASE na diferenciação de pré adipócitos e adipócitos;
- b) Avaliar o possível potencial do ASE na modulação da adipogênese;
- c) Demonstrar as possíveis vias moleculares de ação do ASE sobre o processo de adipogênese.

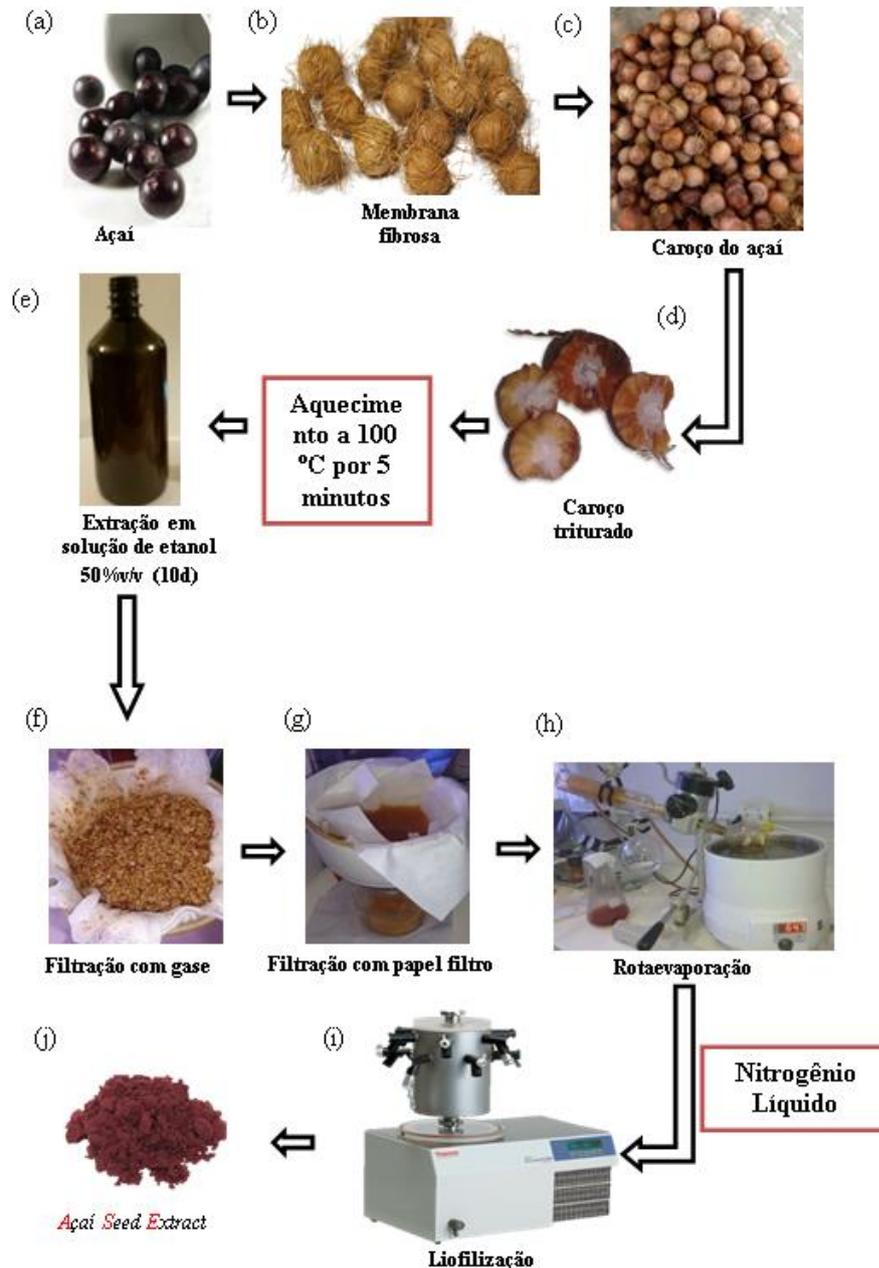
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do Extrato do Caroço de Açaí (ASE)

Amostras de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) provenientes da cidade de Belém, (Latitude: 01° 27' 21" S; Longitude: 48° 30' 16" W - Pará, Brasil) foram fornecidos pelo colaborador Professor Pergentino José Cunha Souza da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Aproximadamente 200 g do fruto foram pesados e despolpados manualmente. A membrana fibrosa dos caroços foi retirada e, em seguida, os mesmos foram triturados. Foi adicionado 400ml de água destilada nos caroços triturado e a mistura foi submetida à 100 °C. Após 5 minutos de fervura, todo o decoto obtido foi resfriado naturalmente e acondicionado em garrafa de vidro âmbar com 400mL de etanol P.A durante cerca de 10 dias, sob refrigeração, e agitação mecânica (Cientec CT-150) diária de 40 minutos. Após este período o extrato hidroalcoólico foi filtrado em gaze e papel de filtro de 22µm, com o auxílio de uma bomba a vácuo. O filtrado foi rotaevaporado, sob baixa pressão, a 65°C (Fisatom 801), congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, liofilizado (Heto PowerDry LL3000, Thermo Scientific) (**Figura 04**).

Figura 4 - Esquema simplificado de obtenção do extrato seco do caroço de açaí - ASE.



(a) Fruto do açaí; (b) Membrana fibrosa; (c) Caroço do açaí sem a membrana fibrosa; (d) Caroço triturado; (E) Extrato em solução de etanol 50% v/v (10 dias); (f) Filtração com gase; (g) Filtração com papel filtro; (h) Rotaevaporação; (i) Liofilização; (j) *Açaí Seed Extract* (ASE)

## 3.2 Cultivo Celular

### 3.2.1 Manutenção da cultura celular

A linhagem de fibroblastos 3T3-L1 foi obtida em caráter de doação através da Prof. Dr. Ana Campa, do Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e

Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 4,5 g/L de glicose, 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/ de estreptomicina e foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Desenho experimental

Para descrever o papel do ASE no processo de adipogênese em células 3T3-L1, foram utilizados dois desenhos experimentais. O primeiro modelo baseia-se na incorporação do ASE, ao meio basal, após a confluência, por 48 horas, com objetivo de avaliar o potencial do ASE na diferenciação de fibroblastos em pré adipócitos. Já o segundo modelo, baseia-se na incorporação do ASE após a indução da diferenciação celular e a sua manutenção até o final do processo de diferenciação, com o objetivo de avaliar o potencial do ASE na diferenciação de pré adipócitos em adipócitos maduros.

Figura 5 - Desenho experimental - Modelo 1.

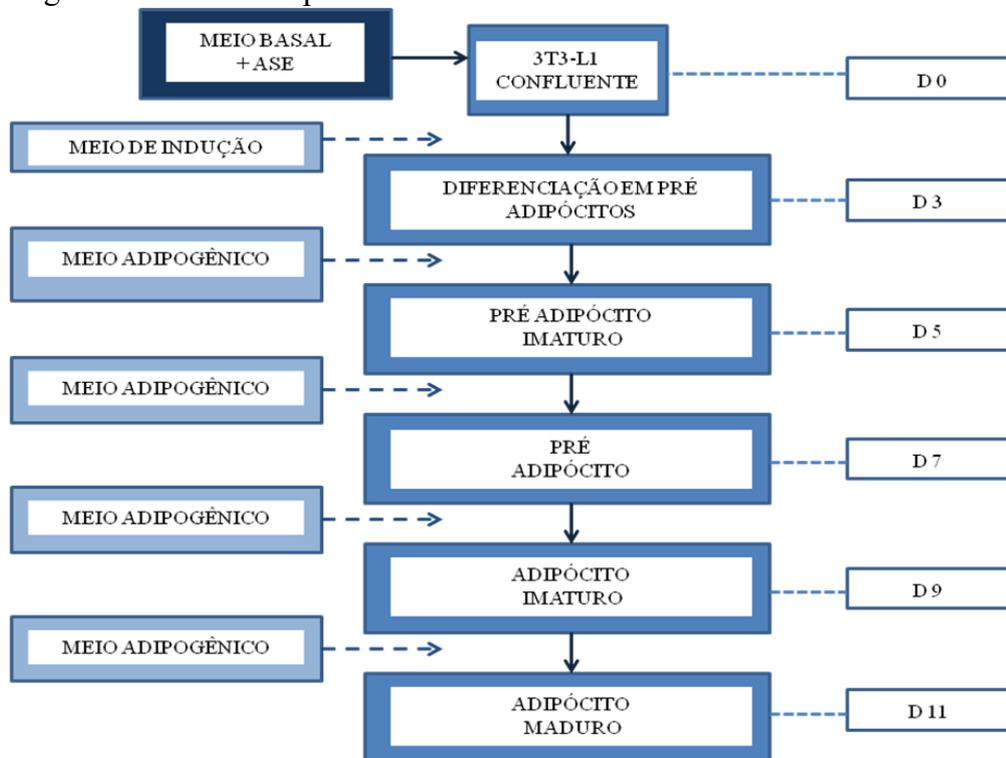
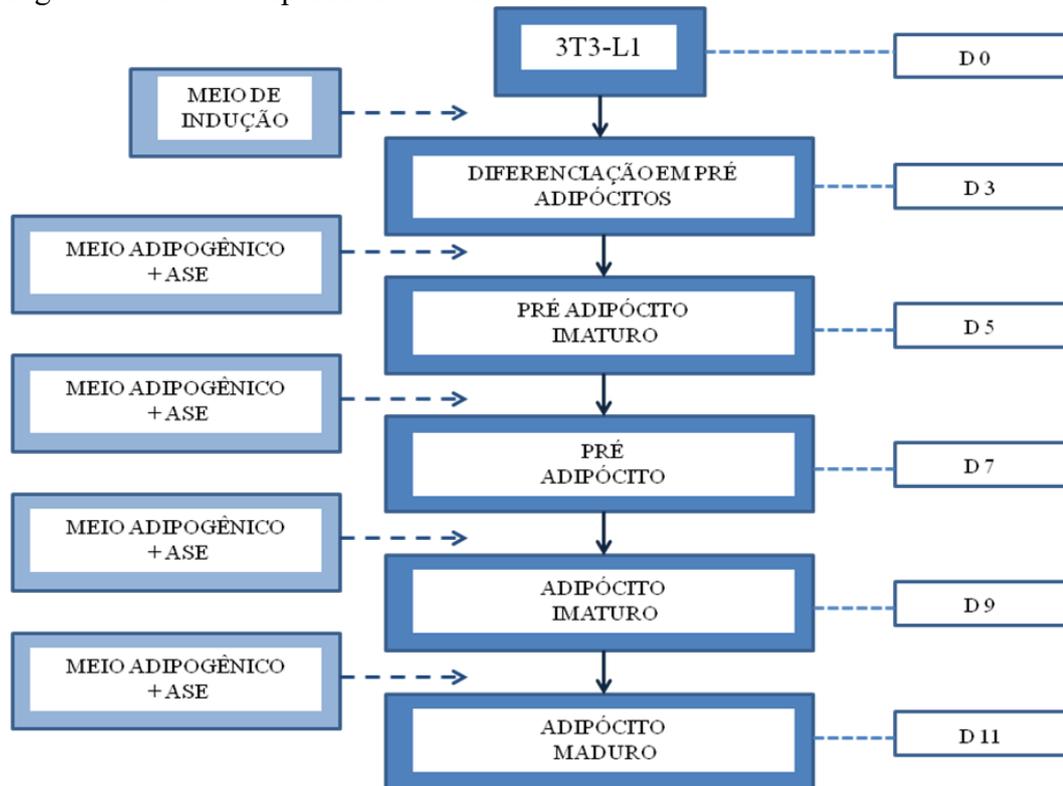


Figura 6 - Modelo experimental – Modelo 2.



### 3.2.3 Ensaio de diferenciação em pré adipocitos

Para ensaio de diferenciação as células 3T3-L1 foram cultivadas até a confluência em meio basal, composto por: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) a 4,5 g/L de glicose, 10% v/v *Fetal Bovine Serum* (FBS), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/ de estreptomicina e foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

No primeiro grupo (Grupo Tratamento), após a confluência (dia zero – D0), os fibroblastos, em meio basal, foram suplementados com coquetel indutor de diferenciação celular, composto por 1 µM de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina–IBMX e 10 µg/mL de insulina e foram brevemente, cultivados por 72 horas (D1 a D3).

Posteriormente, as células foram cultivadas em meio basal em presença de insulina (10 µg/mL). Neste momento, concentrações variadas de ASE (0, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) foram adicionadas e juntamente com o meio, o ASE e o meio foram trocados a cada 48h até o final da diferenciação (D11).

No segundo grupo (Grupo Pré tratamento), após a confluência, concentrações variadas de ASE foram adicionadas ao meio e mantidas por 48 horas. Após este período, o meio basal com adição de ASE foi retirado (dia zero – D0), e substituído por meio basal suplementado com coquetel indutor de diferenciação celular, composto por 1 µM de dexametasona, 0,5 mM

de 3-isobutil-1-metilxantina–IBMX e 10 µg/mL de insulina e foram brevemente, cultivados por 72 horas (D1 a D3).

Posteriormente, as células foram cultivadas em meio basal em presença de insulina (10 µg/mL) e este meio foi trocado a cada 48 horas até o final da diferenciação (D11). Durante todo o processo, nos dois grupos, as células foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3 Viabilidade Celular**

#### **3.3.1 Alamar Blue**

O reagente, AlamarBlue®, atua como um indicador de viabilidade celular. A resazurina é ingrediente ativo deste reagente, sendo um composto celular não-tóxico permeável de coloração azul e virtualmente não fluorescente. No meio intracelular, a resazurina é reduzida, por enzimas mitocondriais, a resorufina, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente.

Para a aplicação dos delineamentos experimentais propostos, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com o ASE a fim de determinar as concentrações em que o ASE atuaria na diminuição desta viabilidade.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada, ao final de 11 dias de diferenciação, tanto no grupo 1 como no grupo 2, em triplicata. Além disto, foi realizado teste de viabilidade no fibroblasto confluyente, com a adição das diferentes concentrações de ASE por 48 horas, para determinação de toxicidade do ASE em outra célula, que não o adipócito. Ao meio de cultura, em cada poço, foi adicionado 10µL do reagente, na concentração de 1mg/mL e posteriormente a placa incubada por 4 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período de incubação, a absorbância foi avaliada nos comprimentos de onda de 570 e 600nm.

### **3.4 Determinação de Triglicerídeos**

#### **3.4.1 Coloração com Oil Red O**

A avaliação da incorporação de lipídios intracelulares foi realizada ao final de 11 dias de diferenciação, tanto no grupo 1 como no grupo 2.

As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS por 1 hora. Após esse período, foram lavadas 3 vezes com água destilada e secas em temperatura ambiente. Então, as células foram coradas com Oil Red-O (6 partes de Oil Red-O saturado a 0,3% em isopropanol e 4 partes de água) durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido e as células foram lavadas com etanol a 70%, por 5 ou 6 vezes. Posteriormente, as células coradas foram lavadas com água e secas a temperatura ambiente. Foram feitos registros fotográficos das células coradas a 20x de ampliação. A absorbância foi avaliada em leitor de microplaca a 490 nm.

### 3.4.2 Triglicerídeos Monorreagente

A avaliação da quantificação de triglicerídeos foi realizada ao final de 11 dias de diferenciação, tanto no grupo 1 como no grupo 2, quando as células foram lisadas e centrifugadas por 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, a fração lipídica foi separada e então quantificada seguindo as instruções do kit de análise.

O método utilizado consiste num teste enzimático colorimétrico (Bioclin®), onde os compostos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 Aminoantipirina e o p-Clorofenol, na presença da Peroxidase, originam um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicerídeos presentes na amostra analisada.

Os reagentes do kit foram adicionados às amostras e as mesmas foram homogeneizadas e postas em banho-maria à 37°C por um período de 10 minutos, sendo sua absorbância posteriormente avaliada em leitor de microplaca a 500nm. Para os cálculos de quantificação, a absorbância das amostras foi multiplicada por uma constante, indicada pelo fabricante do kit, e seu resultado dividido pela absorbância do padrão. Os resultados foram expressos em miligramas por decilitros (mg/dL).

## 3.5 **Western Blotting**

### 3.5.1 Preparação e quantificação das amostras:

Imediatamente após os tratamentos dos adipócitos 3T3-L1 maduros com as concentrações variadas de ASE, as células foram lavadas com PBS 1x e coletadas das placas de cultura com o auxílio de cell scraps e 100 µL de tampão RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, SDS 0.1%, NaF 50mM, pirofosfato de sódio 30 mM e água mili-Q) e

10 µL de coquetel de inibidores de proteases (SigmaAldrich®). Após a lise celular as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 4°C, sendo retirado após o procedimento o sobrenadante livre de lipídios e armazenado posteriormente em freezer – 80°C até o momento das análises. A concentração de proteínas foi determinada através do kit BCA (BioRad®), conforme especificações do fabricante. Em seguida o volume correspondente a 50 µg de proteína total foi adicionado ao tampão de amostra 4 vezes e aquecida a 95 °C por 5 minutos.

### 3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições denaturantes:

As frações proteicas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida na presença de SDS, com o auxílio de mini cubas verticais (BioRad®).. A migração foi iniciada em um gel de aproximadamente 1,5 cm de altura (Tris-Base 1,5M, pH 8,8; SDS 10%; acrilamida 30%, persulfato de amônia 10% e TEMED, SigmaAldrich®) e a eletroforese prosseguiu em um gel de separação (Tris-Base 1M, pH 8,8; SDS 10%; acrilamida 30%, persulfato de amônia 10% e TEMED), sob voltagem de 150 V e amperagem igual a 50 mA, por 1 hora. A eletroforese foi conduzida em Tampão de Migração (Tris-Base 250mM e glicina 960mM).

### 3.5.3 Eletro-transferência das proteínas:

A eletroforese foi interrompida quando a fonte de migração, visualizada pelo emprego do marcador de peso molecular (Kaleidoscopio Bio Rad®), atingiu a porção correspondente ao peso molecular das proteínas de interesse. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®). Para tanto, o gel foi colocado em um tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 190 mM, metanol 10 %, SigmaAldrich®), assim como a membrana e o blotting paper (Bio Rad®). Um “sanduíche” foi produzido da seguinte maneira: uma folha de blotting paper, o gel de poliacrilamida, a membrana de nitrocelulose, uma outra folha de blotting paper. A transferência foi realizada a 20V e amperagem equivalente a 328mA durante 1 hora.

### 3.5.4 Imunodeteção das proteínas de interesse:

Após o tempo estabelecido para a transferência úmida, a membrana foi incubada durante 2 horas em solução de BSA 2% em TBS, em temperatura ambiente e agitação

constante para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Após este procedimento, as membranas foram lavadas 3x em TTBS (Tris 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 a 0,05%, SigmaAldrich®) por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal (anti-mouse) para as proteínas anti-FAS (1: 1.000), anti-PPAR $\gamma$  (1:1.000), anti-SREBP-1 (1:1.000) e anti-P53 (1:1.000), diluídos em BSA 2% em TBS, sob agitação constante por um período aproximado de 18 horas.

No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS por 10 minutos cada, e o anticorpo secundário anti-mouse (Goat polyclonal secondary antibody to mouse IgG – H&L, Abcam®) diluído na proporção de 1:1.000 foi adicionado e a membrana incubada durante 40 minutos em temperatura ambiente e agitação constante. O anticorpo secundário foi removido e a membrana lavada 3 vezes com TTBS durante 10 minutos e incubadas com estreptavidina por 40 minutos e novamente lavadas com TTBS

Em etapa subsequente, foi realizada a reação de quimioluminescência com kit Clarity Western ECL (BioRad®), conforme especificações sugeridas pelo fabricante. As membranas então foram observadas no equipamento ChemiDoc™ XRS (BioRad®) com recurso ao software ImagemLab V4.0 build 16 (BioRad®).

Após a obtenção dos filmes, as bandas foram quantificadas por densitometria em um software específico (Image J ®) e realizada a normalização em relação à proteína constitutiva ( $\beta$ -actina).

### **3.6 Ensaios de Morte Celular**

#### **3.6.1 Marcação Celular com Anexina V-FITC (anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína) e Iodeto de Propídio**

A marcação de células com anexina V-FITC é um ensaio utilizado para a determinação de processos biológicos referentes à indução de apoptose. Quando existe um estímulo para indução de apoptose, ocorre a exposição de fosfatidilserina, que pode ser analisada utilizando-se anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). A anexina V é uma proteína de 37 kDa, que possui alta afinidade por fosfolipídios de carga negativa, mais especificamente a fosfatidilserina (PS). Uma vez conjugada à fluoresceína, o complexo anexina V-FITC apresenta intensa fluorescência verde (ex/em  $\approx$ 488 nm/ $\approx$ 540 nm). Desta forma, como os ensaios são realizados utilizando-se células viáveis, a marcação obtida é resultado do processo de exposição de fosfatidilserina. Assim, considerando que este

fosfolipídio apresenta-se majoritariamente na face interna da membrana plasmática, quando ocorre o estímulo de indução de apoptose, as moléculas de PS translocam-se para a face externa da membrana plasmática, podendo assim se ligar à anexina V-FITC. Ensaio com 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI), que é um marcador nuclear impermeável à membrana plasmática foram realizados a fim de excluir a hipótese de estar ocorrendo ruptura de membrana com consequente exposição de PS da face interna à anexina V-FITC.

Para a realização deste ensaio, as células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e ao atingirem aproximadamente 70% de confluência foram realizados os tratamentos de indução de diferenciação celular e os tratamentos com o ASE, seguindo os modelos experimentais de Pré Tratamento e Tratamento, além de um grupamento controle, pelo tempo estabelecido para completa diferenciação celular. Após este período, as lamínulas foram cuidadosamente removidas com pinça apropriada para microscopia e lavadas 3 vezes com PBS. O excesso de solução foi secado com papel de filtro e as células foram incubadas com os reagentes do kit Annexin V-FITC Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, por 20 min, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com PBS e fixadas em solução contendo 3,7% de formaldeído em PBS, por 15 min. Em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia sobre uma gota de glicerol, seladas em suas margens com esmalte incolor e armazenadas a -20°C, sob proteção da luz, até serem visualizadas em microscópio de fluorescência. As imagens foram obtidas em microscópio Olympus BX40 na Unidade de Microscopia do Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular (IBRAG/UERJ)

### **3.7 Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prism (versão 6.01 Prism, Graph Pad, USA). Utilizou-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way”, e o teste complementar de Tukey, considerando se um nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

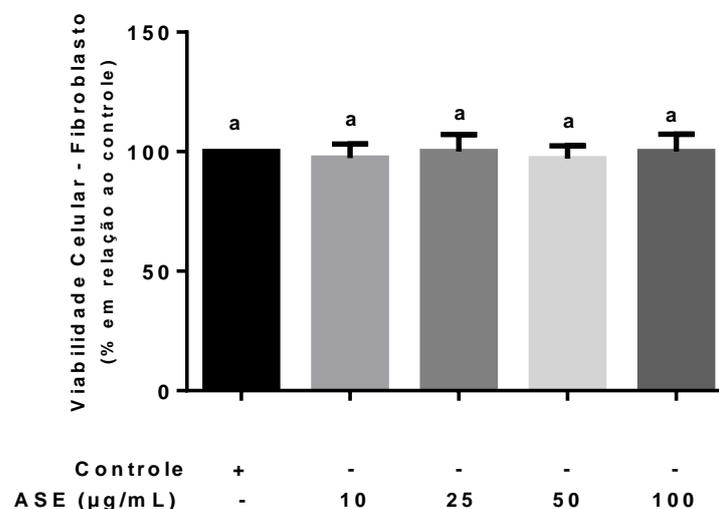
### 4.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada em diferentes momentos do processo de diferenciação, nos fibroblastos e nos adipócitos maduros, tratados antes e depois da indução da diferenciação com intuito de verificar um possível efeito dos tratamentos com ASE na viabilidade das células utilizadas neste estudo.

Primeiramente, fibroblastos confluentes foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações de ASE (10, 25, 50 e 100 µg/ml). Foi observado que não houve variação na viabilidade das células, permanecendo estas 100% viáveis (**Figura 07**). Posteriormente o ensaio de viabilidade celular foi realizado nos grupos Pré tratamento (células tratadas antes da indução da diferenciação) e Tratamento (células tratadas após a indução da diferenciação até o final do experimento), ao final dos onze dias de diferenciação. (**Figura 08**)

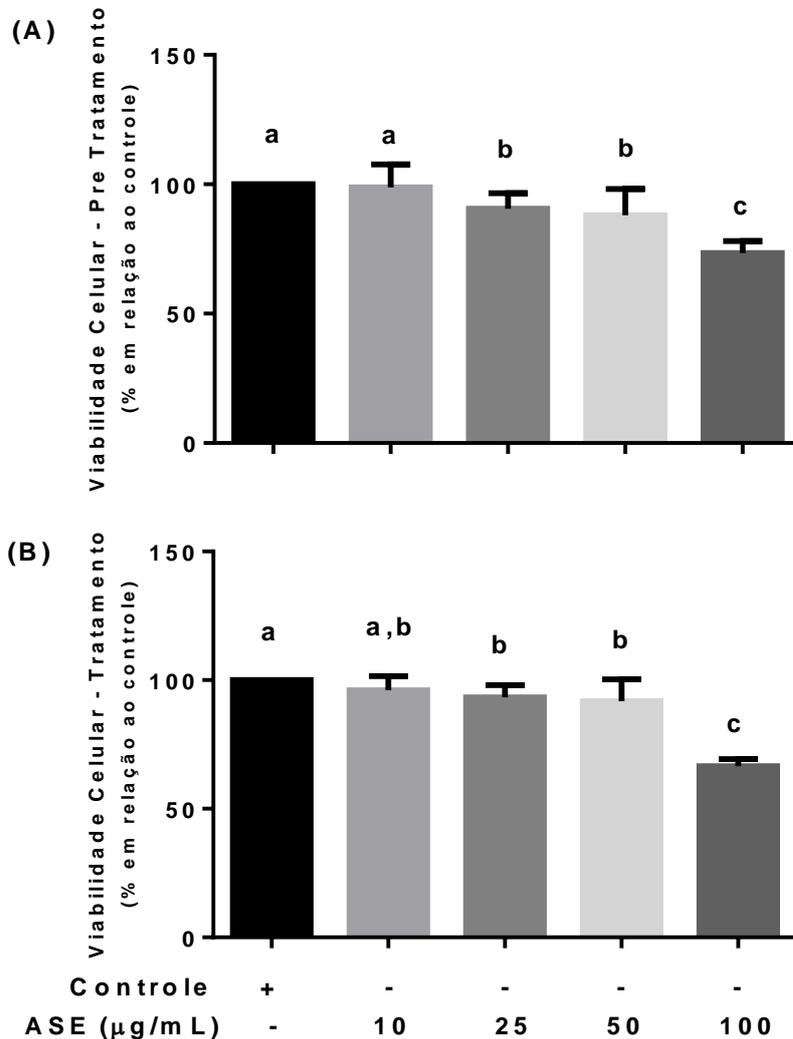
No grupo Pré tratamento, as concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml de ASE levaram a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade das células tratadas (**Figura 08**), com maior redução na viabilidade na concentração de 100 µg/ml (**Tabela 01**). O grupo Tratamento (**Figura 08**) apresentou perfil de viabilidade semelhante ao grupo Pré tratamento, com redução da viabilidade concentração dependente, tendo maior redução na concentração de 100 µg/ml (**Tabela 02**). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas).

Figura 7 - Viabilidade celular: Fibroblasto



Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes, sobre a viabilidade celular. Fibroblastos confluentes após 48 horas de incubação com ASE. Letras iguais não indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Figura 8 - Viabilidade celular: Grupo Pré tratamento e Tratamento.



Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes, sobre a viabilidade celular. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1 - Efeito do ASE na viabilidade celular – Grupo Pré tratamento

Grupo	% de Viabilidade
Controle	100
ASE 10 µg/ml	98,83
ASE 25 µg/ml	90,5
ASE 50 µg/ml	88
ASE 100 µg/ml	74,42

Valores expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas). Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 2 - Efeito do ASE na viabilidade celular – Grupo Tratamento

<b>Grupo</b>	<b>% de Viabilidade</b>
Controle	100
ASE 10 µg/ml	96
ASE 25 µg/ml	93,25
ASE 50 µg/ml	91,83
ASE 100 µg/ml	66,5

Valores expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas). Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata.

#### 4.2 Diferenciação celular, incorporação e quantificação de triglicerídeos

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a adipogênese e a concentração de triglicerídeos intracelulares foi realizada utilizando o corante Oil Red O, onze dias após a diferenciação celular nos grupos Pré Tratamento e Tratamento.

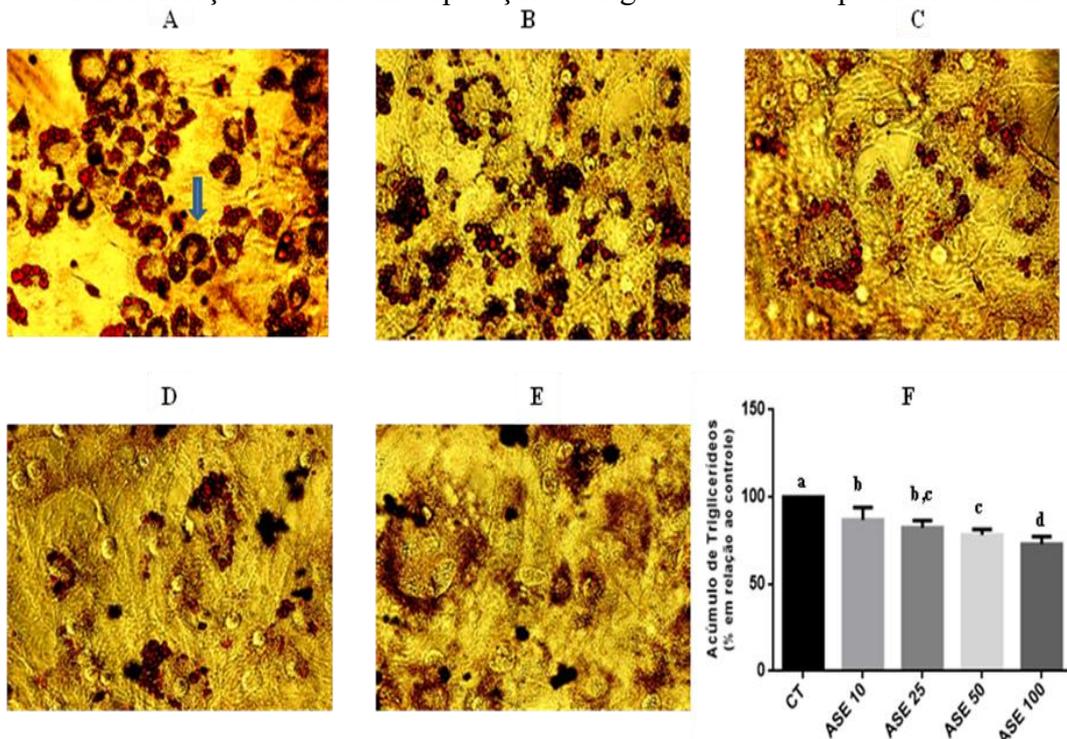
De acordo com os resultados obtidos, verificou-se uma diminuição da adipogênese, com diminuição do número de células e redução da concentração de triglicerídeos intracelulares nas células pré tratadas com ASE (**Figura 09**) e em pré adipócitos submetidos ao tratamento com ASE (**Figura 10**) até sua completa diferenciação. A diminuição da diferenciação e da concentração de triglicerídeos foi observada de maneira dose dependente em ambos os grupos (**Tabelas 3 e 4**), tendo significância estatística ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle (células não tratadas).

Após a obtenção destes dados, optou-se pela padronização das concentrações de ASE a serem utilizadas nos experimentos futuros. Neste sentido, as concentrações de 0, 25 e 100 µg/ml foram escolhidas.

A avaliação da quantificação de triglicerídeos foi realizada, onze dias após a diferenciação celular nos grupos Pré Tratamento e Tratamento.

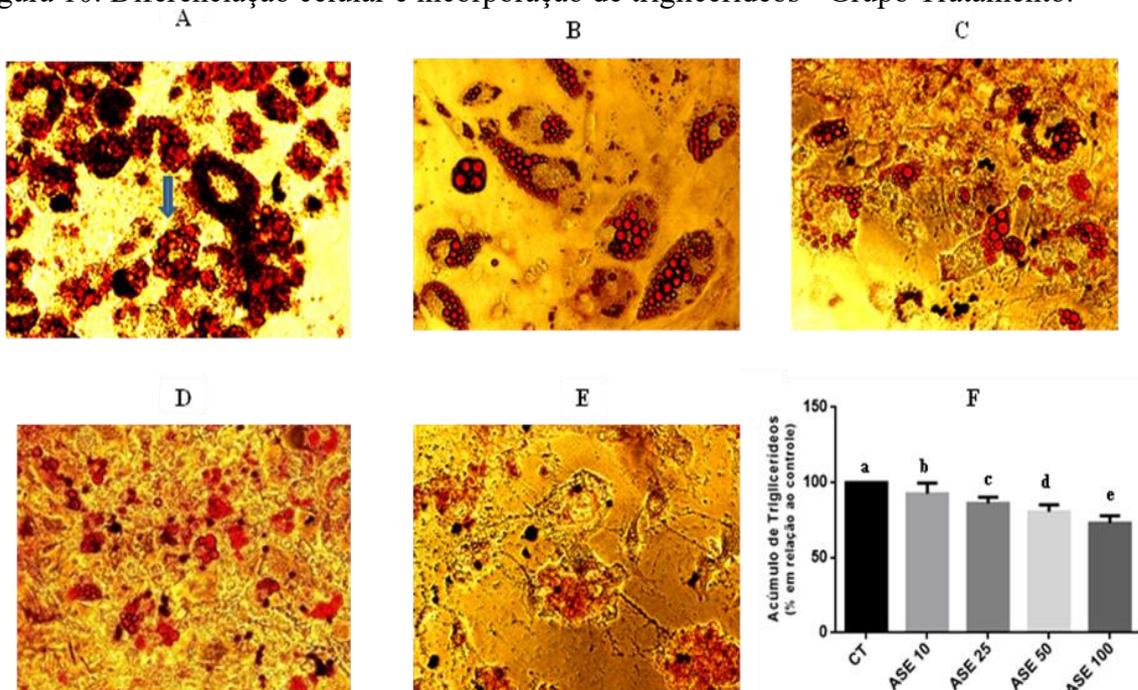
Os resultados pela microscopia pré-ensaio demonstram redução do número e tamanho dos adipócitos, ao final da diferenciação celular (**Figura 11**). Os dados obtidos após o ensaio demonstram redução progressiva da concentração de triglicerídeos totais, conforme o aumento da dose de ASE aplicada, tanto nas células pré-tratadas, quanto nas células que receberam tratamento (**Figura 12**), tendo significância estatística ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle (células não tratadas).

Figura 9 - Diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos - Grupo Pré tratamento.



Coloração Oil Red O em células do grupo pré tratamento ao final de onze dias de diferenciação celular. (A) Controle sem tratamento; (B) Células tratadas com 10 µg/ml de ASE antes da indução da diferenciação celular; (C) células tratadas com 25 µg/ml de ASE antes da indução da diferenciação celular; (D) Células tratadas com 50 µg/ml de ASE antes da indução da diferenciação celular; (E) Células tratadas com 100 µg/ml de ASE antes da indução da diferenciação celular; (F) Análise estatística. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Figura 10. Diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos - Grupo Tratamento.



Coloração Oil Red O em células do grupo tratamento ao final de onze dias de diferenciação celular. (A) Controle sem tratamento; (B) Células tratadas com 10 µg/ml de ASE após a indução da diferenciação celular; (C) células tratadas com 25 µg/ml de ASE após a indução da diferenciação celular; (D) Células tratadas com 50 µg/ml de ASE após a indução da diferenciação celular; (E) Células tratadas com 100 µg/ml de ASE após a indução da diferenciação celular; (F) Análise estatística. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Tabela 03. Efeito do ASE na diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos – Grupo Pré tratamento.

Grupo	% de Incorporação de triglicerídeos
Controle	100
ASE 10 µg/ml	86,91
ASE 25 µg/ml	82,42
ASE 50 µg/ml	78,17
ASE 100 µg/ml	72,92

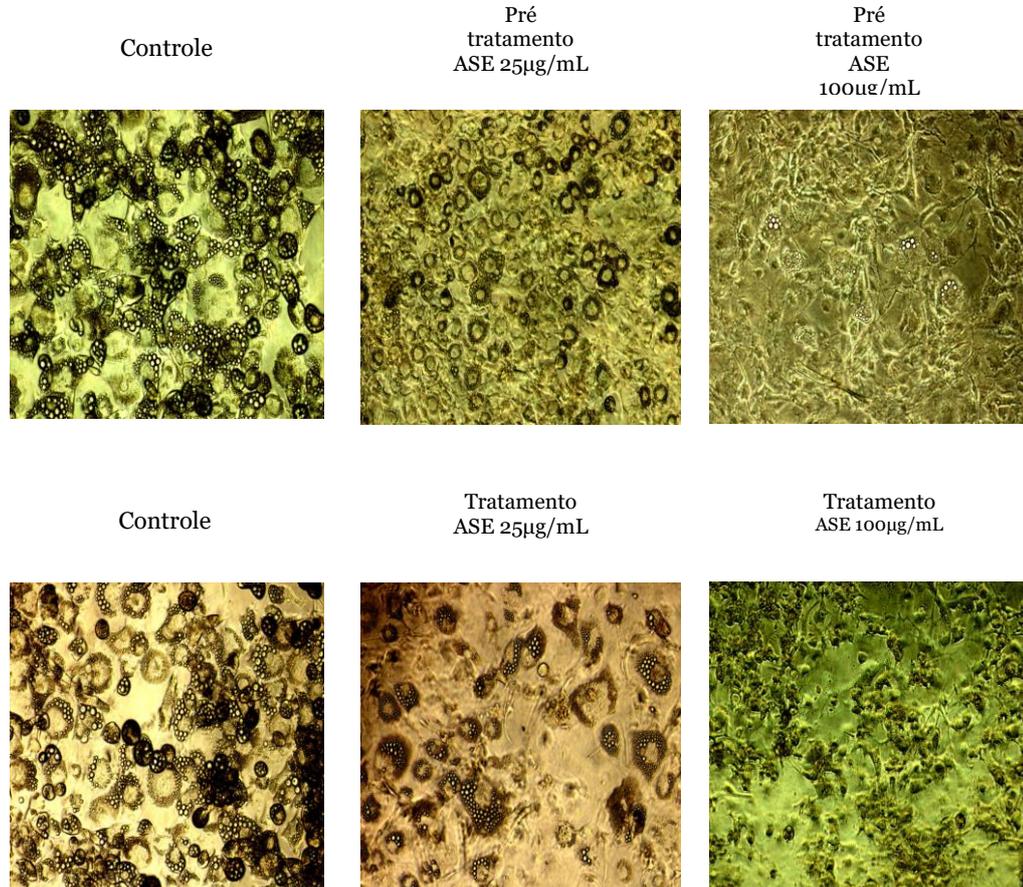
Valores expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas). Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 04. Efeito do ASE na diferenciação celular e incorporação de triglicerídeos – Grupo Tratamento.

Grupo	% de Incorporação de triglicerídeos
Controle	100
ASE 10 µg/ml	92,5
ASE 25 µg/ml	86,1
ASE 50 µg/ml	80,5
ASE 100 µg/ml	73,1

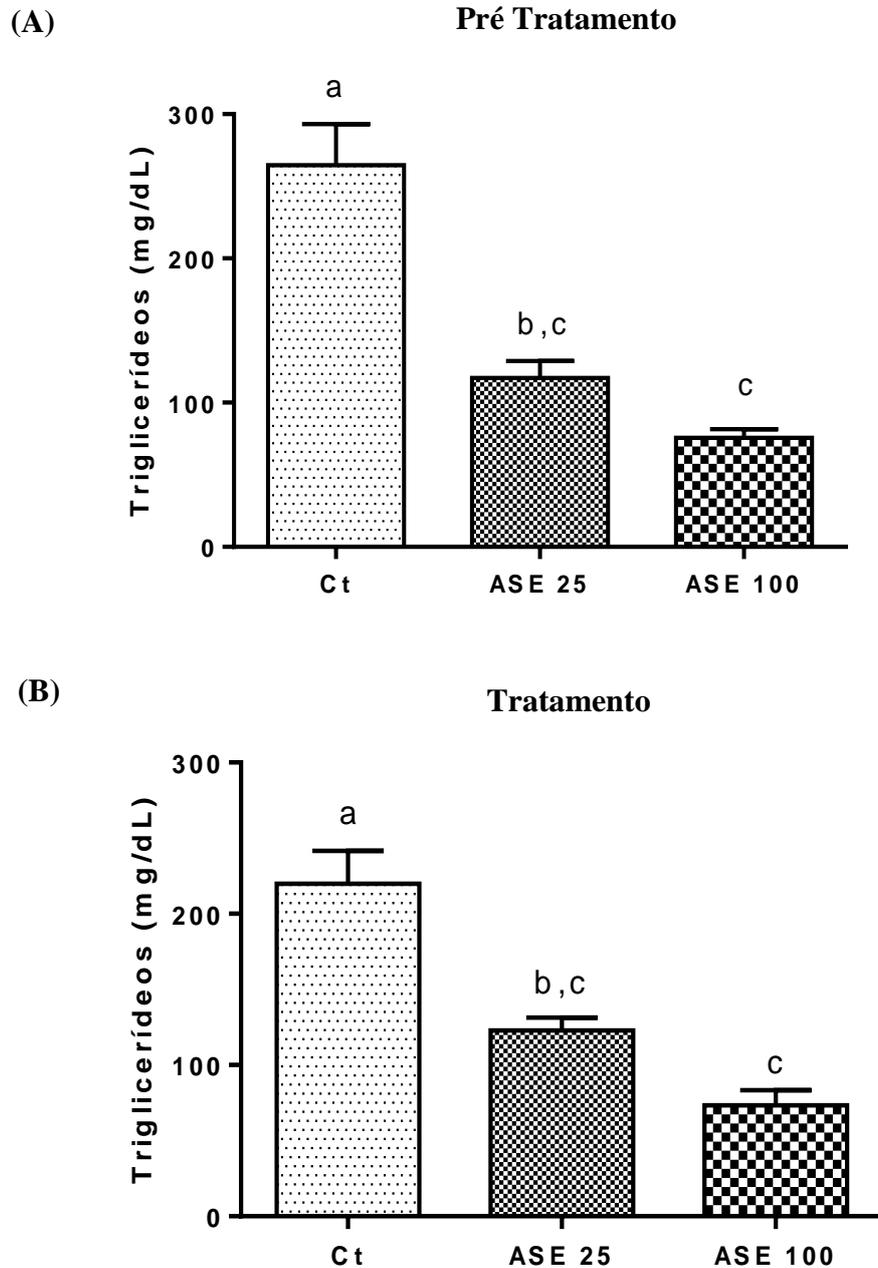
Valores expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas). Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata.

Figura 11 - Microscopia pré ensaio de quantificação de triglicerídeos (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



Microscopia pré-ensaio enzimático colorimétrico em células dos grupos Pré Tratamento e Tratamento ao final de onze dias de diferenciação celular.

Figura 12 - Efeito do ASE na quantificação de triglicerídeos (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



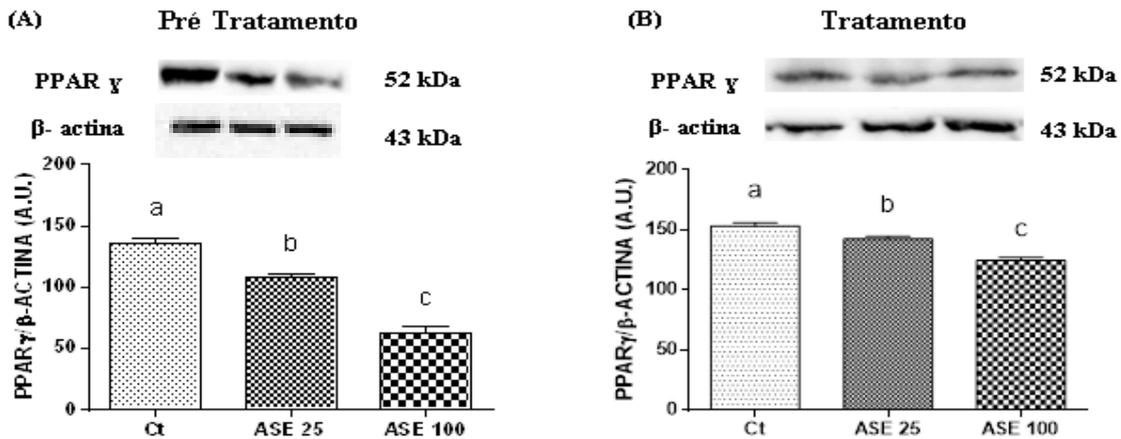
Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100 $\mu$ g/mL), sobre quantificação de triglicerídeos. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3 Efeito do ASE na expressão de proteínas envolvidas no processo de adipogênese

Os resultados obtidos pela análise de Western Blotting, demonstram diminuição da expressão proteica do receptor PPAR $\gamma$  (Figura 13) em células 3T3-L1 diferenciadas em

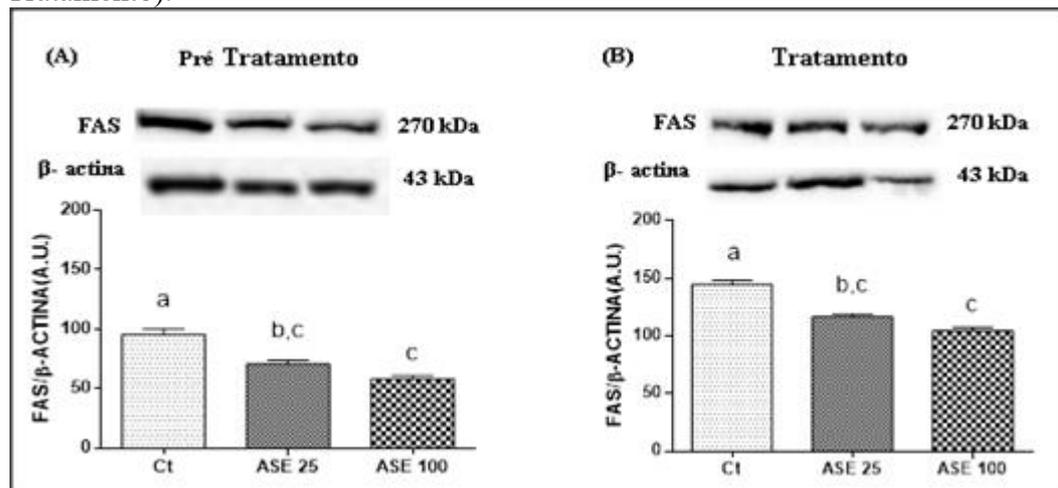
adipócitos, quando estas foram pré tratadas ou tratadas com as concentrações de 25 e 100µg/mL de ASE. Os mesmos resultados se repetem quando observamos a expressão de FAS (Figura 14) e SREBP-1 (Figura 15) em células tratadas nas mesmas condições supracitadas, tendo significância estatística ( $p<0,05$ ) em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle (células não tratadas).

Figura 13 - Efeito do ASE na expressão de PPAR $\gamma$  (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



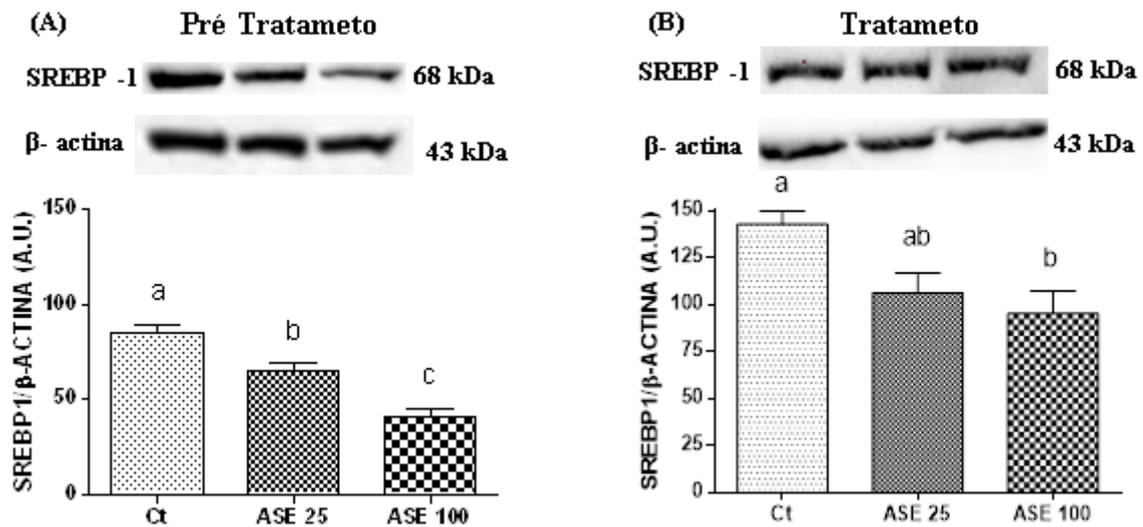
Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100µg/mL), sobre a expressão de PPAR $\gamma$ . (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ).

Figura 14 - Efeito do ASE na expressão de FAS (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100µg/mL), sobre a expressão de FAS. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ).

Figura 15 - Efeito do ASE na expressão de SREBP-1 (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



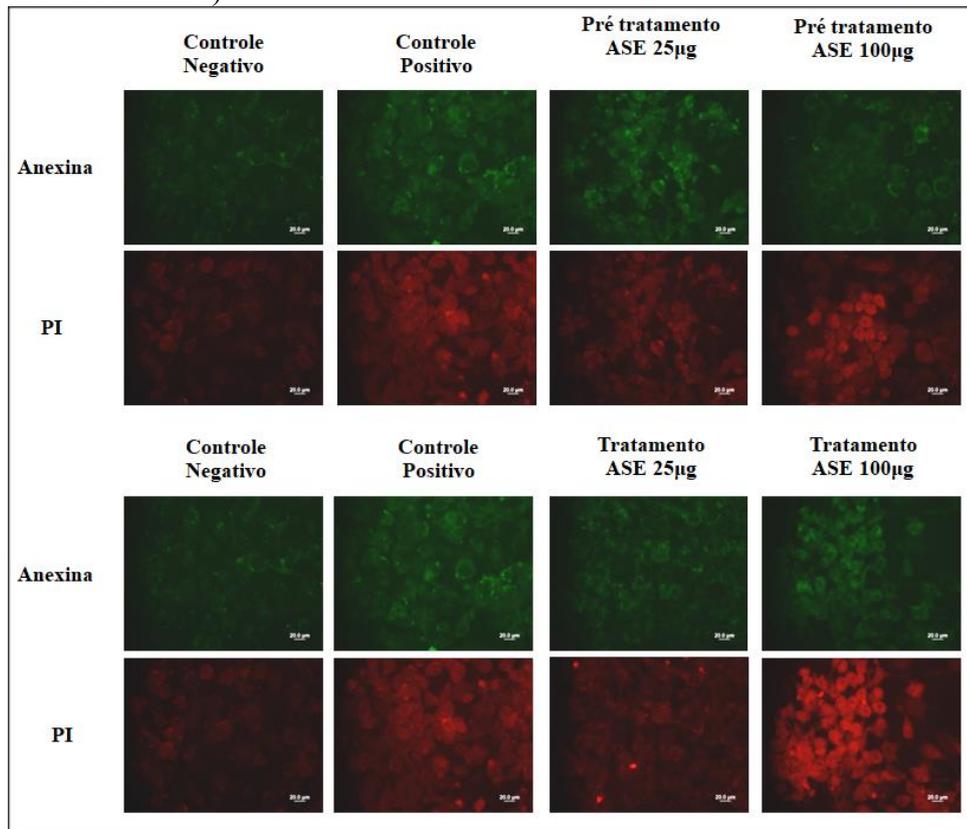
Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ), sobre a expressão de SREBP-1. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Efeito do ASE sobre a morte celular de adipócitos 3T3-L1

Para investigar se a exposição ao ASE poderia induzir morte celular por apoptose ou necrose, foi realizado um ensaio de dupla marcação das células 3T3-L1 com Anexina V-FITC e PI, com subsequente análise por microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos mostraram que a exposição ao ASE, em todas as concentrações empregadas (0, 25 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ), tanto no grupo Pré Tratamento quanto no grupo Tratamento, induziu às células aos processos de apoptose e necrose, de forma mais expressiva, conforme o aumento da concentração de exposição (**Figura 16**).

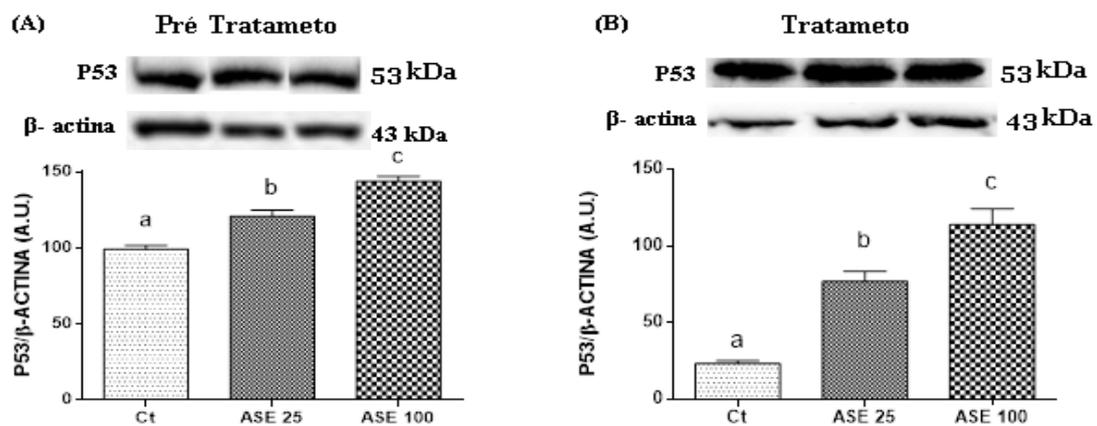
Além deste resultado, a mensuração da expressão proteica de P53, pela realização de Western Blotting, evidenciou aumento progressivo, em ambos os grupos de tratamento, de forma proporcional às concentrações aplicadas de ASE (**Figura 17**).

Figura 16 - Efeito do ASE na indução da morte celular por apoptose e necrose (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100µg/mL), sobre a indução de morte celular via apoptose e necrose. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação.

Figura 17 - Efeito do ASE na expressão proteica de P53 (Grupo Pré Tratamento e Tratamento).



Efeito do tratamento com ASE, em concentrações crescentes (0, 25 e 100µg/mL), sobre a expressão de P53. (A) Grupo Pré Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE antes do processo de diferenciação; (B) Grupo Tratamento, após o décimo primeiro dia da diferenciação celular, exposto ao tratamento com ASE depois da indução à diferenciação. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos é regulada por diferentes fatores de transcrição, onde o PPAR $\gamma$  e membros da família C/EBP iniciam e regulam o processo de diferenciação celular. Neste contexto, o estudo de compostos fenólicos, encontrados em frutas e vegetais, tem demonstrado efeitos benéficos à saúde humana por atuarem na possível modulação das vias metabólicas da adipogênese (QUEIROZ et al., 2009; YUN, 2010).

A linhagem celular 3T3-L1 que é amplamente utilizada como modelo *in vitro* de ensaios, tem fornecido suporte para a pesquisa de adipócitos ao longo de várias décadas. Mesmo que o resultado obtido por este modelo possua limitações e que a extrapolação dos resultados para condições *in vivo* deva ser realizada com cautela. Este ainda é o meio mais indicado e utilizado, por fornecer uma população celular homogênea, permitindo a realização de culturas indefinidamente e assim possibilitando a sua reprodutibilidade (FÈVE, 2005; MORENO; MARTÍNEZ, 2002; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000).

No presente estudo, objetivamos identificar o possível papel modulador do ASE sob o processo de adipogênese *in vitro*, por meio de duas vias de atuação. A primeira, denominada grupo Pré Tratamento, na qual fibroblastos não induzidos à diferenciação celular foram tratados com o extrato por um período pré-determinado e depois induzidos à diferenciação. E a segunda, denominada grupo Tratamento, onde as mesmas células foram expostas ao ASE, somente após a indução da diferenciação celular, de forma contínua, até sua maturação.

Em relação à toxicidade exercida pelo ASE, tanto o grupo Pré Tratamento quanto o grupo Tratamento, promoveram redução progressiva da viabilidade celular, à medida que as concentrações de ASE foram aumentadas nos respectivos ensaios. Assim como em nosso estudo, trabalhos que utilizaram compostos fenólicos, como a epicatequina galato (EGCG) e resveratrol, apresentaram em seus resultados, efeito anti adipogênico, pela redução da viabilidade dos pré adipócitos, além de expressarem resultados condizentes com a diminuição da proliferação celular (KWON et al., 2012; LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005a; WU et al., 2005), corroborando nossos achados e reforçando nossa hipótese do possível efeito do ASE como potencial modulador no processo de adipogênese. Todavia vale ressaltar que a toxicidade exercida pelo ASE só pôde ser observada nos pré adipócitos e adipócitos, o que nos faz crer numa seletividade de ação deste extrato, visto que os fibroblastos que não sofreram indução da diferenciação celular e foram expostos ao ASE não apresentaram redução da sua viabilidade.

A incorporação e a quantificação de triglicerídeos também foram afetadas de maneira dose-dependente, em ambos os modelos experimentais aplicados neste trabalho. Diversos estudos que utilizaram compostos fenólicos, como os presentes no chá verde e a ECGC isoladamente, expressaram resultados que se assemelham aos nossos achados, como a inibição da proliferação de pré adipócitos, supressão da diferenciação dos adipócitos e do acúmulo de triglicerídeos intracelulares. Tais resultados, nestes estudos, são elucidados pelo efeito modulador destes compostos na sinalização de PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (LAO et al., 2015; WANG et al., 2014). Além destes estudos, trabalhos que utilizaram compostos como resveratrol e curcumina, também obtiveram resultados similares aos obtidos em nosso estudo, na indução da inibição da diferenciação de pré adipócitos e supressão da lipogênese (MEYDANI; HASAN, 2010), com concomitante supra regulação da expressão de genes lipogênicos como PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e FAS (KWON et al., 2012; RAYALAM et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Uma vez observada a diminuição no acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos 3T3-L1 submetidos aos tratamentos com ASE, investigamos a possibilidade de alteração da expressão dos genes específicos envolvidos na adipogênese, em busca da melhor elucidação das vias moleculares envolvidas neste processo. Confirmando nossas hipóteses, podemos observar em nossos ensaios a redução, condicionada ao aumento das concentrações de ASE (0. 25 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ), em ambos os modelos experimentais, de PPAR $\gamma$ , SREBP -1 e FAS. Nossos resultados corroboram os dados da literatura que mostram que estudos realizados com compostos como a arctina, genisteína, gingerol e resveratrol, em diferentes concentrações, podem atuar no bloqueio da conversão de pré adipócitos em adipócitos, além de reduzirem e/ou inibirem a expressão de PPAR $\gamma$ , SREBP-1 e FAS (HARMON; HARP, 2001; MIN et al., 2014; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016; TZENG; LIU, 2013).

Sabe-se que o receptor PPAR- $\gamma$  possui um papel importante na regulação do metabolismo de triglicerídeos nos adipócitos e no controle da mobilização de lipídeos nestas células, apresentando um papel essencial na manutenção do fenótipo dos adipócitos (FERRÉ, 2004; GRUN; BLUMBERG, 2007), assim como a proteína de ligação de elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), é referida como determinante à diferenciação de adipócitos e à homeostase de colesterol. A SREBP-1 desempenha um papel importante na expressão gênica dos adipócitos, regulando a expressão de FAS, enzima responsável pela formação dos adipócitos maduros, e da LPL, genes importantes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, além da indução da expressão de PPAR $\gamma$  (MIN et al., 2014; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Sendo assim, neste contexto, nossos resultados demonstram que o ASE inibiu a

adipogênese através da supra regulação de fatores de transcrição adipogênicos e seus genes alvo.

O ciclo de vida dos adipócitos inclui a alteração da forma celular, a parada do crescimento, a expansão clonal e uma sequência complexa de alterações na expressão gênica levando ao armazenamento de lipídios e, finalmente, à morte celular (RAYALAM et al., 2008). Células que sofrem injúrias podem sofrer morte celular via necrose ou apoptose. A necrose é um tipo de morte celular na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana citoplasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

As células em apoptose sofrem morte celular programada sem acometer estruturas vizinhas. A célula encolhe e condensa, o seu citoesqueleto sofre colapso, a membrana nuclear torna-se desestruturada e o DNA sofre fragmentação. A superfície celular sofre alterações revelando propriedades que resultam em sua morte e posterior fagocitose por células vizinhas ou por macrófagos (EDINGER; THOMPSON, 2004; GALLUZZI et al., 2015).

Em nosso estudo, após a obtenção dos resultados da viabilidade celular, onde constatamos a sua diminuição progressiva após exposição à concentrações crescentes de ASE, enveredamos nossa pesquisa para a avaliação de morte celular. Para avaliação de necrose e apoptose optamos pelo ensaio de fluorescência por dupla marcação das células 3T3-L1 com Anexina V-FITC e PI.

A anexina V é uma proteína de ligação de fosfolípidos dependente de cálcio que possui alta afinidade para a fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que é distribuído no folheto intracelular da membrana celular em células normais, mas translocado para o folheto externo desta membrana durante a apoptose. A exposição da fosfatidilserina é, portanto, acessível para detecção AV. PI é um corante fluorescente que se liga ao DNA, não sendo capaz de permear células viáveis com membranas celulares intactas. Assim, é utilizado para distinguir células mortas de células viáveis em culturas celulares (LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005).

Pela análise visual de nossas amostras, constatamos a indução de apoptose e necrose. No grupo Pré-Tratamento percebemos maior indução de apoptose na menor concentração (25 µg/ml) de ASE, enquanto na maior (100 µg/ml) temos aparente predominância de morte induzida por necrose. No grupo Tratamento constatamos maior indução à apoptose e necrose, conforme o aumento da concentração empregada de ASE.

Como já exposto, compostos fenólicos afetam funções celulares, como crescimento, diferenciação e apoptose. Assim como verificamos em nosso experimento, diversos estudos indicam que os flavonóides, como a naringenina, rutina, hesperidina, resveratrol, naringina e quercetina, inibem o crescimento celular e induzem apoptose em adipócitos (HSU; YEN, 2006) ratificando nossos achados.

Sabendo que a proteína p53 é um fator de transcrição que responde a diversos sinais de estresse e pode atuar na inibição do crescimento celular tanto através da ativação da parada do ciclo celular, como na apoptose (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014). Constatamos ao final do experimento, aumento da expressão da p53 de maneira proporcional, à medida que as concentrações (0, 25 e 100 µg/dl) de ASE aumentaram. RAYALAM et al., 2008 e HASTAK et al., 2003, demonstraram que extratos de chá verde e resveratrol promoveram uma redução da gordura corporal em modelo experimental de obesidade. Já em experimentos *in vitro* com adipócitos expostos à ECGC isolada, obtida a partir do extrato de chá verde, e resveratrol foi evidenciada morte celular por apoptose mediada pela proteína p53, além do aumento da atividade da caspase 3 (HSU; YEN, 2006; LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005b). Desta forma tais resultados, apontam a p53 como molécula / proteína chave no processo de apoptose, corroborando com nossos dados com o ASE sobre a morte celular dos adipócitos.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o ASE demonstrou capacidade de redução da concentração de triglicerídeos intracelulares dos adipócitos submetidos à sua exposição, além de reduzir a viabilidade celular de forma proporcional às suas doses administradas durante os experimentos.

Assim, o ASE foi capaz de modular o processo adipogênico, atuando na regulação da expressão de fatores de transcrição responsáveis pelo comprometimento dos fibroblastos com a linhagem adipocitária e na regulação da expressão fenotípica do adipócito, além de exercer papel modulador nos processos de morte celular por necrose e apoptose, mediada por p53.

Uma vez que a adipogênese está intrinsecamente relacionada à diferenciação e maturação de adipócitos, a indução da apoptose e a inibição da adipogênese em vários estágios do ciclo de vida dos adipócitos, a atuação dos compostos fenólicos presentes no ASE, se apresenta como um possível mecanismo de inibição da adipogênese sugerindo que o ASE pode ser uma ferramenta importante para o tratamento preventivo ou terapêutico da obesidade.

## REFERÊNCIAS

AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of White Adipose Tissue. In: BRAY, G.; BOUCHARD, C. (Eds.). . **Handbook of Obesity**. [s.l.] CRC Press, 2003. p. 481–514.

ALWAN, A.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011.

AMRI, E. Z. et al. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. **Journal of Lipid Research**, v. 32, n. 9, p. 1449–1456, set. 1991.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, 17 abr. 2014.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, ago. 2013.

CHAN, D. C. et al. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 63, n. 2, p. 77–85, fev. 2004.

CHEN, Q. et al. Polyphenol-rich extracts from *Oiltea camellia* prevent weight gain in obese mice fed a high-fat diet and slowed the accumulation of triacylglycerols in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 148–155, jul. 2014.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 134–176, mar. 2004.

DA COSTA, C. A. et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, dez. 2012a.

DA COSTA, C. A. et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, dez. 2012b.

DE BEM, G. F. et al. Protective effect of Euterpe oleracea Mart (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1328–1338, set. 2014.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619–626, dez. 2010.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015a.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2 dez. 2015b.

DE SOUZA, M. O. et al. The hypocholesterolemic activity of açai (Euterpe oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 12, p. 976–984, dez. 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, 24 mar. 2004.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 10 maio 2013.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663–669, dez. 2004.

EJAZ, A. et al. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 5, p. 919–925, maio 2009.

EMANUELA, F. et al. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 476380, 2012.

FERRÉ, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S43-50, fev. 2004.

FÈVE, B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 483–499, dez. 2005.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192–S203, nov. 2007.

FRAGA, C. G. et al. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435–445, dez. 2010.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 4, p. 813–823, 15 ago. 2011.

FRAYN, K. N. In: **Metabolic Regulation: a Human Perspective**. 2. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2003. p. 339.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58–73, jan. 2015.

GARCÍA-CONESA, M.-T. Dietary Polyphenols against Metabolic Disorders: How Far Have We Progressed in the Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of These Compounds? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 0, 9 jun. 2015.

GENUTH, S. M. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: **BERNE, R.M. et al.** Fisiologia. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 815–843.

GOODPASTER, B. H.; THAETE, F. L.; KELLEY, D. E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 885–892, abr. 2000.

GOSMANN, G. et al. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 67, n. 2, p. 156–161, jun. 2012.

GREGOIRE, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 226, n. 11, p. 997–1002, dez. 2001.

GRUN, F.; BLUMBERG, B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 161–171, 17 set. 2007.

GUERRA, J. F. DA C. et al. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188–194, nov. 2011.

HALLENBORG, P. et al. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 2, p. 235–246, fev. 2009.

HANSEN, J. B.; KRISTIANSEN, K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation: Figure 1. **Biochemical Journal**, v. 398, n. 2, p. 153–168, 1 set. 2006.

HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 280, n. 4, p. C807-813, abr. 2001.

HASTAK, K. et al. Role of p53 and NF- $\kappa$ B in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. **Oncogene**, v. 22, n. 31, p. 4851–4859, 31 jul. 2003.

HELTON, E. S.; CHEN, X. p53 modulation of the DNA damage response. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 4, p. 883–896, 1 mar. 2007.

HSU, C.-L.; YEN, G.-C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1072–1079, nov. 2006.

IBRAHIMI, A. et al. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 2646–2651, 2 abr. 1996.

IKEOKA, D.; MADER, J. K.; PIEBER, T. R. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. **Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 56, n. 1, p. 116–121, fev. 2010.

ISHIBASHI, J.; SEALE, P. Beige Can Be Slimming. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1113–1114, 28 maio 2010.

ITOH, M. et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 720926, 2011.

JOHNSON, R.; BRYANT, S.; HUNTLEY, A. L. Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. **Maturitas**, v. 73, n. 4, p. 280–287, dez. 2012.

JOSEPH, S. V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Berries: anti-inflammatory effects in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 3886–3903, 7 maio 2014.

KANG, J. et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610–617, out. 2010.

KATO, Y. et al. H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A. **Life Sciences**, v. 80, n. 5, p. 476–483, 9 jan. 2007.

KLAUS, S. et al. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 6, p. 615–623, jun. 2005.

KOUTNIKOVA, H. et al. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR $\gamma$  hypomorphic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14457–14462, 25 nov. 2003.

KWON, J. Y. et al. An inhibitory effect of resveratrol in the mitotic clonal expansion and insulin signaling pathway in the early phase of adipogenesis. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 8, p. 607–616, ago. 2012.

LAO, W. et al. Comparison of Cytotoxicity and the Anti-Adipogenic Effect of Green Tea Polyphenols with Epigallocatechin-3-Gallate in 3T3-L1 Preadipocytes. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 06, p. 1177–1190, jan. 2015.

LATHAM, L. S.; HENSEN, Z. K.; MINOR, D. S. Chocolate-Guilty Pleasure or Healthy Supplement? **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 16, n. 2, p. 101–106, fev. 2014.

LICHTENTHÄLER, R. et al. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53–64, fev. 2005.

LIN, J.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. **Obesity Research**, v. 13, n. 6, p. 982–990, jun. 2005a.

LIN, J.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. **Obesity Research**, v. 13, n. 6, p. 982–990, jun. 2005b.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3 Suppl, p. 517S–520S, set. 2003.

MARÍN, L. et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 905215, 2015.

MARTINEZ-SANTIBAÑEZ, G.; CHO, K. W.; LUMENG, C. N. Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. **Methods in Enzymology**, v. 537, p. 17–30, 2014.

MCARDLE, M. A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 52, 2013.

MEYDANI, M.; HASAN, S. T. Dietary Polyphenols and Obesity. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 737–751, 8 jul. 2010.

MIN, B. et al. Arctiin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells and decreases adiposity and body weight in mice fed a high-fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 6, p. 655, 2014.

MORENO, M. J.; MARTÍNEZ, J. A. [Adipose tissue: a storage and secretory organ]. **Anales Del Sistema Sanitario De Navarra**, v. 25 Suppl 1, p. 29–39, 2002.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W.-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 124, 19 jan. 2016.

NOGUEIRA, A. K. M.; SANTANA, A. C. DE; GARCIA, W. S. A dinâmica do mercado de açaí fruto no Estado do Pará: de 1994 a 2009. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 324–331, jun. 2013.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte differentiation and gene expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3122S–3126S, dez. 2000.

OGLESBY, A. K. et al. The association between diabetes related medical costs and glycemic control: a retrospective analysis. **Cost Effectiveness and Resource Allocation: C/E**, v. 4, p. 1, 2006.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011.

PARK, A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 33, 2014.

PARK, J.-Y. et al. Inhibition of Adipogenesis by Oligonol through Akt-mTOR Inhibition in 3T3-L1 Adipocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014a.

PARK, J.-Y. et al. Inhibition of Adipogenesis by Oligonol through Akt-mTOR Inhibition in 3T3-L1 Adipocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014b.

PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **Journal of Obesity**, v. 2013, p. 616193, 2013.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. DE; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, abr. 2003.

QUEIROZ, J. C. F. DE et al. [Control of adipogenesis by fatty acids]. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582–594, jul. 2009.

RAYALAM, S. et al. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Phytotherapy research: PTR**, v. 22, n. 10, p. 1367–1371, out. 2008.

REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588–602, mar. 2013.

RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. Fisiologia Médica. In: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Tradução Charles Alfred Esbérard. 2. ed, 2005. p. 741.

ROCHA, A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, fev. 2007.

ROCHA, A. P. M. et al. Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of Euterpe oleracea Mart. (Acai). **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, n. 6, p. 435–448, 1 jun. 2008.

RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4162–4167, 14 jun. 2006.

ROSA, E. C. et al. [Visceral obesity, hypertension and cardio-renal risk: a review]. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 49, n. 2, p. 196–204, abr. 2005.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean Diet Based on Bioactive Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 145–152, 2 fev. 2009.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 215S–217S, jan. 2005.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleraceae mart. (acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 1 nov. 2006.

SEALE, P.; KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. **Genes & Development**, v. 23, n. 7, p. 788–797, 1 abr. 2009.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 1253–1262, jun. 2007.

SHINODA, K. et al. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. **Nature Medicine**, v. 21, n. 4, p. 389–394, 16 mar. 2015.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 3, n. 4, p. 506–516, jul. 2012.

SMITH, E. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 9, p. 904–904, set. 2007.

SOARES DE MOURA, R. et al. Vitis vinifera L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 268–276, fev. 2012.

STALLKNECHT, B. et al. Interstitial glycerol concentrations in human skeletal muscle and adipose tissue during graded exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 180, n. 4, p. 367–377, abr. 2004.

SUASTIKA, K. Update in the management of obesity. **Acta Medica Indonesiana**, v. 38, n. 4, p. 231–237, dez. 2006.

SUN, X. et al. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 3, p. 243–251, mar. 2010.

SUZUKI, M. et al. Lipid droplets: size matters. **Microscopy**, v. 60, n. suppl 1, p. S101–S116, 1 ago. 2011.

TAKENOUCI, T.; TAKAYAMA, Y.; TAKEZAWA, T. Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Cell Biology International**, v. 28, n. 3, p. 209–216, 2004.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 4, p. 526–533, jun. 2007.

THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. V. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3367–3387, set. 2013.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, out. 2006.

TONTONOZ, P. et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & Development**, v. 8, n. 10, p. 1224–1234, 15 maio 1994.

TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 49–65, fev. 2015.

TZENG, T.-F.; LIU, I.-M. 6-gingerol prevents adipogenesis and the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in 3T3-L1 cells. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 481–487, 15 abr. 2013.

WANG, S. et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1–18, jan. 2014.

WILDMAIER, E. P. et al. Fisiologia Humana: os mecanismos das funções corporais. In: [s.l.] Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 588.

WILLIAMS, G.; FRÜHBECK, G. (EDS.). **Obesity: science to practice**. Chichester, UK ; Hoboken, NJ: Wiley, 2009.

WU, B.-T. et al. The apoptotic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the Cdk2 pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5695–5701, 13 jul. 2005.

YANG, J.-Y. et al. Regulation of adipogenesis by medium-chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 537–543, jul. 2009.

YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature? A review. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14–15, p. 1625–1641, out. 2010.

ZHANG, M. et al. Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 5, p. 713–718, maio 2009.

ZHANG, X.-H. et al. Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 4, p. 286–293, ago. 2012.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, p. 124–128, jun. 2004.