



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Bernardo Junqueira de Moraes Arnoso

**Efeito terapêutico do extrato do caroço do açaí sobre as alterações
cardiovasculares na obesidade: estudo comparativo com a
Rosuvastatina**

Rio de Janeiro

2020

Bernardo Junqueira de Moraes Arnoso

Efeito terapêutico do extrato do caroço do açaí sobre as alterações cardiovasculares na obesidade: estudo comparativo com a Rosuvastatina

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Aguiar da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Beltrame Daleprane

Rio de Janeiro

2020

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

A763	Arnos, Bernardo Junqueira de Moraes. Efeito Terapêutico do Extrato do Caroço do Açaí Sobre as Alterações Cardiovasculares na Obesidade: Estudo Comparativo com a Rosuvastatina/ Bernardo Junqueira de Moraes Arnoso. – 2020. 89 f. Orientadora: Cristiane Aguiar da Costa. Coorientador: Julio Beltrame Daleprane. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. 1. Nutrição – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Coração – Teses. I. Costa, Cristiane Aguiar da. II. Daleprane, Julio Beltrane. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título. br CDU 612.3
------	---

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

Assinatura

Data

Bernardo Junqueira de Moraes Arnoso

**Efeito Terapêutico do Extrato do Carócio do Açaí Sobre as Alterações
Cardiovasculares na Obesidade: Estudo Comparativo com a Rosuvastatina**

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

Aprovada em 17 de novembro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Cristiane Aguiar da Costa (Orientadora)

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Coorientador)

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Dayane Teixeira Ognibene

Departamento de Farmacologia e Psicobiologia - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Caroline Fernandes dos Santos Bottino

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na produção deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde (UERJ), por todos os ensinamentos e sugestões. Agradeço também à secretária do programa pela atenção, paciência e simpatia.

Muito obrigado a todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia, tanto alunos quanto Professores, por estarem sempre dispostos a prestar ajuda nos experimentos, além dos ótimos momentos e conhecimentos compartilhados. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, que ajudou muito a viabilizar meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço, especialmente, à querida orientadora Professora Cristiane Aguiar e ao coorientador Professor Julio Beltrame pela oportunidade, por todo apoio e confiança.

Agradeço também a todos que aqui não foram citados e que, de alguma forma, têm sua parcela de contribuição para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Bernardo Junqueira de Moraes Arnoso. *Efeito Terapêutico do Extrato do Caroço do Açaí Sobre as Alterações Cardiovasculares na Obesidade: Estudo Comparativo com a Rosuvastatina*. 2020. 89 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A obesidade é um problema de saúde global crescente e fortemente associado a comorbidades, como as doenças cardiovasculares. Os Camundongos C57BL/6 são um ótimo modelo de estudo de obesidade induzida por dieta. Alimentos ricos em polifenóis, como o açaí, promovem benefícios à saúde em geral, refletindo-se também em benefícios cardiovasculares. O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) demonstrou previamente propriedades cardiovasculares benéficas, superiores às aquelas demonstradas pela polpa ou extrato aquoso do açaí. Também demonstrou efeito preventivo de diversas complicações em modelos de hipertensão, diabetes e obesidade, porém, não se sabe ainda o efeito de ASE especificamente no coração e na aorta, no contexto de terapia da obesidade induzida por dieta. A Rosuvastatina (ROSU) é uma estatina frequentemente prescrita para dislipidemia e demais riscos de doenças cardiovasculares. Este fármaco desempenha efeitos pleiotrópicos, influenciando benéficamente na saúde cardiovascular através de efeitos que vão além da melhora do perfil lipídico, porém, ainda não bem elucidados. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do ASE no coração e na aorta de camundongos C57BL/6 machos, em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, comparando-os com os efeitos da ROSU. Para isso, 5 grupos foram criados, onde os animais foram alimentados com dieta padrão por 12 semanas (grupo Controle) ou dieta hiperlipídica (60% lipídeos) por 12 semanas (grupos HF12, HF+ASE e HF+ROSU) ou por 8 semanas (grupo HF8). O grupo HF+ASE foi tratado com ASE (300mg/kg/dia) e HF+ROSU com ROSU (20mg/kg/dia) a partir do final da 8ª semana até o final da 12ª semana. A dieta hiperlipídica deixou os animais obesos e com o perfil lipídico e a glicemia alterados. Também tiveram alterações na morfologia e no status redox do coração e da aorta, bem como diminuição da expressão de Nrf2 e SIRT1 nestes órgãos. Ambos os tratamentos reduziram o ganho de peso e melhoraram o perfil lipídico, mas somente ASE melhorou a glicemia. Os tratamentos desempenharam ações benéficas na morfologia do coração, evitando hipertrofia do septo interventricular, e na morfologia da aorta, evitando hipertrofia da túnica média e maior deposição de colágeno. Os tratamentos também melhoraram o status redox nestes dois órgãos, o que influencia positivamente na saúde cardiovascular. Entretanto, ASE desempenhou efeito antioxidante mais proeminente que ROSU, pois, diferente da ROSU, ASE melhorou a expressão e a atividade da enzima GPx no coração, além de aumentar a expressão de SOD1 e diminuir a expressão de NOX4 na aorta, onde apresentou menor peroxidação lipídica. Os dados obtidos sugerem potencial terapêutico do ASE em complicações cardiovasculares na obesidade, por promover efeitos antioxidantes e melhora de parâmetros morfológicos no coração e na aorta.

Palavras-chave: Obesidade, saúde cardiovascular, status redox, açaí, rosuvastatina.

ABSTRACT

Arnos, Bernardo Junqueira de Moraes. *Therapeutic Effect of Açai Stone Extract on Cardiovascular Alterations in Obesity: Comparative Study with Rosuvastatin*. 2020. 89 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Obesity is a growing global health problem and is strongly associated with comorbidities, such as cardiovascular diseases. The C57BL/6 mice are a great model for studying diet-induced obesity. Foods rich in polyphenols, such as açai, promote health benefits in general, also reflected in cardiovascular benefits. The hydroalcoholic açai stone extract (ASE) previously demonstrated beneficial cardiovascular properties, superior to those demonstrated by the pulp or aqueous extract of the açai. It also demonstrated the preventive effect of several complications in different studied models, however, the effect of ASE specifically on the heart and aorta, in the context of diet-induced obesity therapy, is not yet known. Rosuvastatin (ROSU) is a statin often prescribed for dyslipidemia and other risks of cardiovascular diseases. This drug has pleiotropic effects, beneficially influencing cardiovascular health through effects that go beyond improving the lipid profile, however, still not well understood. The aim of this study was to evaluate the effects of ASE on the heart and aorta of male C57BL/6 mice, with obesity induced by a high-fat diet, comparing them with the effects of ROSU. For this, 5 groups were created, where the animals were fed a standard diet for 12 weeks (Control group) or a high-fat diet (60% lipids) for 12 weeks (groups HF12, HF+ASE and HF+ROSU) or for 8 weeks (group HF8). The HF+ASE group was treated with ASE (300mg/kg/day) and HF+ROSU with ROSU (20mg/kg/day) during the last 4 weeks of the study. The high-fat diet made the animals become obese and have altered lipid profile and blood glucose levels. They also had changes in the morphology and redox status of the heart and aorta, as well as decreased expression of Nrf2 and SIRT1 in these organs. Both treatments reduced weight gain and improved the lipid profile, but only ASE improved blood glucose levels. The treatments performed beneficial effects in the morphology of the heart, avoiding hypertrophy of the interventricular septum, and in the morphology of the aorta, preventing hypertrophy of the tunica media and greater collagen deposition. The treatments also improved the redox status in these two organs, which positively influences cardiovascular health. However, ASE performed a more prominent antioxidant effect than ROSU, because, unlike ROSU, ASE improved expression and activity of the GPx enzyme in the heart, in addition to increasing SOD1 expression and decreasing NOX4 expression in the aorta, where it caused less lipid peroxidation. The data obtained suggest a therapeutic potential of ASE in cardiovascular complications in obesity, as it promotes antioxidant effects and improves morphological parameters in the heart and aorta.

Keywords: Obesity, cardiovascular health, redox status, açai, rosuvastatin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão simplificada dos substratos utilizados na produção de ATP no coração.	21
Figura 2 - Matriz extracelular e interação com a célula.	23
Figura 3 - Palmeiras de <i>E. oleracea</i> e distribuição geográfica na Amazônia.	32
Figura 4 - Divisão dos grupos ao longo do tempo.....	37
Figura 5 - Peso médio dos grupos Controle, HF12, HF+ASE e HF+ROSU.....	45
Figura 6 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU no peso do VE (A), na espessura da parede livre do VE (B), na espessura do septo intraventricular (C) e no diâmetro do lúmen do VE (D).	47
Figura 7 - Imagens representativas do ventrículo esquerdo.	48
Figura 8 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão de Nrf2 (A) e de SIRT1(B), no coração.....	49
Figura 9 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 (A), SOD2 (B), CAT (C) e GPx (D), no coração.....	50
Figura 10 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão da enzima MMP2 (A), e NOX4 (B), no coração.	50
Figura 11 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B) e GPx (C), e sobre o dano oxidativo (D), no coração.	51
Figura 12 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica coradas com hematoxilina e eosina (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU na espessura da túnica média da aorta torácica (B).	52
Figura 13 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica coradas com picrosirius red (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a deposição de colágeno na aorta torácica (B).....	53
Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão de Nrf2 (A) e de SIRT1(B), na aorta torácica.....	54
Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 (A), SOD2 (B), CAT (C) e GPx (D), na aorta torácica.....	55

Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão da enzima MMP2 (A), e NOX4 (B), na aorta torácica.	55
Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a atividade da enzima antioxidante CAT na aorta torácica.	56
Figura 18 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica marcadas com DAB (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a peroxidação lipídica na aorta torácica (B).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas AIN-93M: padrão e hiperlipídica	35
Tabela 2 - Divisão dos grupos e tratamentos.....	37
Tabela 3 - Parâmetros metabólicos dos grupos Controle, HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2K-1C	Dois rins-um clipe
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
AGL	Ácidos Graxos Livres
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ASE	<i>Açaí Stone Extract</i>
AVE	Acidente Vascular Encefálico
COX	Ciclooxigenases
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EOx	Estresse Oxidativo
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HVE	Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LAM	Leito Arterial Mesentérico
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL_{ox}	Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
LDL_r	Receptores de Lipoproteína de Baixa Densidade
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinases
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NOX	NADPH Oxidase
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor</i>
ON	Óxido Nítrico

PKC	Proteínas Kinase C
PL	Parede Livre (coração)
RCV	Risco Cardiovascular
RI	Resistência à Insulina
ROSU	Rosuvastatina
SIRT1	Sirtuína 1
SIV	Septo Interventricular (coração)
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
TAPV	Tecido Adiposo Perivascular
TG	Triglicerídeos
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
VE	Ventrículo Esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Obesidade e risco cardiovascular	13
1.2	Hiperglicemia, estresse oxidativo e risco cardiovascular	15
1.3	Dislipidemia e risco cardiovascular.....	18
1.4	Remodelamento cardíaco e vascular	19
1.5	Sirtuínas, Nrf2 e risco cardiovascular.....	24
1.6	Modelo experimental de obesidade: Camundongo C57BL/6	27
1.7	Estatinas: Rosuvastatina	28
1.8	Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí - <i>Açaí Stone Extract</i> (ASE).....	30
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	Animais	34
3.2	Dietas	34
3.3	Tratamentos	35
3.3.1	<u>ASE (Extrato hidroalcoólico do caroço do Açaí)</u>	35
3.3.2.	<u>Rosuvastatina</u>	36
3.4	Divisão de grupos e eutanásia	36
3.5	Peso dos animais.....	38
3.6	Dosagens Séricas	38
3.6.1	<u>Glicemia</u>	38
3.6.2	<u>Perfil lipídico</u>	38
3.7	Morfologia do coração	38
3.8	Morfologia da aorta torácica	39
3.9.	Imunohistoquímica	39
3.10.	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em Coração.....	40
3.11.	Atividade Antioxidante Enzimática em Coração e Aorta	41
3.11.1	<u>Medida da Superóxido Dismutase (SOD) em Coração</u>	41
3.11.2	<u>Medida da Catalase (CAT) em Coração e Aorta</u>	41
3.11.3	<u>Medida da Glutathione Peroxidase (GPx) em Coração e Aorta</u>	42

3.12	Western Blotting de Coração e Aorta	42
3.13	Análise Estatística	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Efeitos no Peso, Ingestão Calórica e Marcadores Metabólicos	44
4.2	Efeitos na Estrutura do Ventrículo Esquerdo.....	46
4.3	Efeitos na Expressão de Proteínas do Coração	48
4.4	Efeitos na Atividade Antioxidante e Dano Oxidativo no Coração	51
4.5	Efeitos na Estrutura da Aorta Torácica	52
4.6	Efeito na Expressão de Proteínas da Aorta Torácica	54
4.7	Efeitos na Atividade Antioxidante e Dano Oxidativo na Aorta Torácica	56
5	DISCUSSÃO.....	58
6	CONCLUSÃO	70
7	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade e risco cardiovascular

A obesidade é caracterizada por um grande acúmulo de tecido adiposo em um indivíduo, causando uma relação desproporcional do peso em relação à altura do mesmo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que a obesidade, um problema de saúde pública mundial, atinge aproximadamente 650 milhões de adultos. Um índice simples e ainda muito utilizado para definir graus de obesidade é o índice de massa corporal (IMC), calculado em Kg/m^2 , onde indivíduos com IMC a partir de 30kg/m^2 são considerados obesos (OMS, 2018). Todavia, este índice é considerado muito limitado, pois não observa outros parâmetros mais específicos, como composição corporal e quantidade de tecido adiposo visceral, parâmetros estes que podem predizer riscos à saúde (Müller e Geisler, 2017; De Lorenzo *et al.*, 2019). Outros parâmetros e métodos de avaliação, como exemplo, exames de imagem que analisam composição corporal e tecido adiposo visceral, podem identificar melhor os riscos à saúde que acompanham a obesidade, pois indivíduos obesos apresentam riscos mais elevados para o desenvolvimento de diversas doenças, como doenças metabólicas, cardiovasculares e câncer (Mechanick *et al.*, 2017; Müller e Geisler, 2017; OMS, 2018; Rangel-Huerta *et al.*, 2019; De Lorenzo *et al.*, 2019).

Muitos são os fatores que podem influenciar na causa e agravamento da obesidade. Dentre eles, possivelmente os mais proeminentes são a alimentação inadequada, sedentarismo, poluição ambiental, predisposição genética e microbioma (Hruby A e Hu, 2015; Nappi *et al.*, 2016; Requena *et al.*, 2018). A distribuição do tecido adiposo em seus diferentes compartimentos pode dizer muito sobre o aumento dos riscos à saúde relacionados à obesidade. Este excesso de adipócitos se distribui em tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral. Apesar de o tecido adiposo visceral parecer propiciar maiores riscos à saúde, ambos podem ser relacionados aos riscos metabólicos e cardiovasculares associados à obesidade (Anthony *et al.*, 2019).

O risco cardiovascular (RCV) é a probabilidade de desenvolver uma doença cardiovascular (DCV) dentro de um período de tempo definido, levando em consideração vários fatores de risco simultaneamente. Pode ser considerado hoje como uma ferramenta potencial de prevenção que integra o aspecto multifatorial dessas doenças (Amouyel e Deverly, 2000). Fatores de RCV bem estabelecidos, como o envelhecimento, são grandes preditores de resultados adversos. Hipertensão arterial e

dislipidemia são fatores de RCV com alguns dos principais focos de intervenções terapêuticas. Outros fatores, como a obesidade, resistência à insulina (RI) ou diabetes Mellitus (DM), histórico familiar (genética) e tabagismo aumentam o risco de um indivíduo desenvolver DCV (Huang, 2009; Payne, 2012).

Muitas pessoas obesas que desenvolvem DCV comumente apresentam um conjunto de alguns destes fatores de risco citados, podendo caracterizar a síndrome metabólica (SM). A SM é considerada como uma condição pré-mórbida e não exatamente um diagnóstico clínico. Ela refere-se à coocorrência de fatores de RCV bem conhecidos, incluindo a obesidade, hiperglicemia/resistência à insulina (RI), hipertensão arterial e dislipidemia. Estas condições estão fortemente relacionadas e compartilham entre si mediadores e mecanismos em comum. Modificações no estilo de vida e também o tratamento farmacológico podem diminuir o RCV e, por isso, investigar as relações entre os componentes da SM, pode nos ajudar a entender melhor a fisiopatologia que os conectam e os relacionam ao aumento do RCV (Huang, 2009; Simmons, 2010; Sung J *et al.*, 2018).

Existe uma grande associação entre a obesidade e aumento do risco de desenvolvimento de DCV, em especial a insuficiência cardíaca que pode ocorrer com o remodelamento cardíaco, além de doença arterial coronariana (DAC) (Carbone *et al.*, 2019). O risco de insuficiência cardíaca atribuível à população devido ao excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) é de 14% nas mulheres e 8,8% nos homens e, na obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$), os riscos correspondentes em mulheres e homens são 13,9 e 10,9%, respectivamente (Aurigemma *et al.*, 2013). Estudos epidemiológicos mostram que obesidade abdominal é positivamente correlacionada a fatores de RCV, como níveis aumentados de pressão arterial sistólica e de triglicerídeos (TG), tanto em adultos obesos quanto em crianças obesas (Geiger e Stein, 2018). Além disso, foi demonstrado que o RCV de obesos com RI é maior que o RCV de obesos sem RI, e que a perda de peso reduz os riscos dos indivíduos obesos com RI (Hulsmans e Holvoet, 2010). Perturbações da hemodinâmica e a produção de citocinas pró-inflamatórias podem alterar a estrutura cardíaca. Na obesidade, o tecido adiposo recruta mais macrófagos que podem adotar um fenótipo pró-inflamatório, além dos próprios adipócitos e outras células do sistema imune que também contribuem para o efeito geral do tecido adiposo sobre o RCV e também sobre a RI (Ying *et al.*, 2017; Geiger e Stein, 2018; Chylikovaa *et al.*, 2018).

1.2. Hiperglicemia, estresse oxidativo e risco cardiovascular

A hiperglicemia é caracterizada pelos níveis elevados de glicose no sangue. É um dos principais fatores que caracterizam doenças como o DM tipo 1 e tipo 2. Atualmente a *American Diabetes Association* (ADA) caracteriza como pré-diabetes quando: 1) a glicemia em jejum (mínimo de oito horas) fica entre 100mg/dL e 125mg/dL, ou - 2) duas horas após o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) a glicemia ainda encontrar-se entre 140mg/dL e 199mg/dL, ou - 3) hemoglobina glicada entre 5.7% e 6.4%. Já o DM pode ser diagnosticado quando a glicemia encontra-se a partir de 126 mg/dL em jejum, ou a partir de 200mg/dL duas horas após TOTG ou em qualquer medição no dia, ou a hemoglobina glicada a partir de 6.5%. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) segue estes parâmetros descritos pela ADA. Mouri e Badireddy (2019) caracterizam a hiperglicemia em humanos como glicemia em jejum também igual ou maior que 100 mg/dL, porém, maior que 180 mg/dL duas horas pós-prandial.

Se não for tratada, a hiperglicemia pode afetar diversos órgãos e tecidos, ocasionando problemas nos olhos, rins, nervos, coração e ao sistema vascular. A redução da secreção ou da ação da insulina, a redução da utilização da glicose pelos tecidos e a superprodução de glicose pelo fígado, são os principais fatores que ocasionam a hiperglicemia. Para a homeostase do metabolismo da glicose, o hormônio insulina é fator chave, por isso, distúrbios que interfiram na produção ou sinalização da insulina, como ocorre na RI, poderão gerar a hiperglicemia (El-Najjar *et al.*, 2017; Mouri e Badireddy, 2019). As complicações resultantes podem comprometer em nível microvascular, ocasionando retinopatia, nefropatia e neuropatia, e em nível macrovascular, como ocorre na aterosclerose, na DAC e na doença arterial periférica. Portanto, a hiperglicemia é um grande fator de risco para DCV (El-Najjar *et al.*, 2017). Além disso, existe forte correlação entre hiperglicemia e hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE). Hiperglicemia, RI e dislipidemia costumam estar presentes em casos de obesidade e de SM, e podem precipitar disfunção endotelial e acelerar o processo de aterosclerose (Mapanga e Essop, 2016).

Estudos apontam que hiperglicemia pode ocasionar disfunção de cardiomiócitos e de células endoteliais (Clark *et al.*, 2003; Brownlee, 2005; Joseph *et al.*, 2014; Mapanga e Essop, 2016). Estes efeitos podem parcialmente ser explicados pelo estresse

oxidativo (EOx). O quadro de EOx ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e de nitrogênio (ERNs) é maior que a capacidade do organismo de neutralizar ou combater estas espécies. Este desequilíbrio em favor da maior produção de espécies reativas pode gerar danos a proteínas, lipídeos (como os presentes nas membranas celulares) e inclusive ao DNA. O EOx vem sendo muito explorado pela ciência nas últimas décadas, principalmente por estar comumente ligado, tanto como consequência quanto causa, à fisiopatologia de muitas doenças, como câncer e DCV (Schohraya *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2017; Tun *et al.*, 2020).

As espécies reativas podem ser geradas em nosso organismo de diversas formas e em diferentes contextos, agindo inclusive como mecanismos de defesa e como moléculas de sinalização. Entretanto, a produção exacerbada destas espécies pelas mitocôndrias, principalmente aquelas disfuncionais que tendem a produzir mais EROs, podem levar à problemas como o EOx. Para neutralizar as EROs, dispomos de defesas antioxidantes, compostas por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Além de enzimas, nossos sistemas de defesa antioxidante contam também com moléculas antioxidantes advindas da dieta, como vitamina C e vitamina E. Compostos fenólicos ou polifenóis advindos da dieta também podem desempenhar ação antioxidante (Schulz *et al.*, 2014; Schohraya *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2017; Tun *et al.*, 2020).

Diferentes vias que ligam hiperglicemia ao EOx têm em comum a superprodução da ERO ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. De acordo com Brownlee (2005), a cadeia de transporte de elétrons é fonte da produção exacerbada de $O_2^{\bullet-}$ induzida por hiperglicemia, tanto que, o aumento de UCP-1 (proteína desacopladora) ou SOD2 (MnSOD, ou SOD mitocondrial) evitaram os danos causados pela superprodução de superóxido (Brownlee, 2005; Mapanga e Essop, 2016). A maior produção de superóxido ocorre em detrimento da diminuição da produção de ATP pela mitocôndria. Esta ERO pode ser dismutada pela enzima antioxidante SOD, neste caso, a SOD2, gerando como subproduto desta reação outra ERO, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fiorentino *et al.*, 2013).

Uma das consequências da RI é o aumento do fluxo de ácidos graxos livres (AGL) dos adipócitos para o endotélio arterial, onde serão oxidados pelas mitocôndrias, aumentando a produção de EROs (Brownlee, 2005). Em estudos onde a produção de

EROs pela mitocôndria foi normalizada, houve inibição de vias específicas que promovem dano vascular (Nishikawa *et al.*, 2000; Fiorentino *et al.*, 2013). O aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ pode aumentar a suscetibilidade da interação entre esta ERO e óxido nítrico (ON), resultando na formação de peroxinitrito ($ONNO_2^-$), uma potente ERN. Este composto pode ser um importante agente causador de DCV relacionadas ao DM, além de também poder formar radical hidroxil, uma das EROs mais reativas e danosas (Mapanga e Essop, 2016).

A sinalização redox é um processo onde espécies reativas agem como moléculas de sinalização, sendo este um importante processo para o metabolismo do tecido. Contudo, havendo um desequilíbrio neste processo, pode instalar-se o quadro de EOX, havendo, portanto, uma linha tênue entre estas duas situações, sobretudo no coração. Os cardiomiócitos são células que contêm grande densidade de mitocôndrias, que são responsáveis pela maior parte do ATP produzido nestas células, demandando, portanto, grandes quantidades de oxigênio. Por esta grande atividade mitocôndrial e presença de oxigênio, este órgão é altamente suscetível a dano oxidativo e isto é relacionado a diversas DCV (Schulz *et al.*, 2014).

O aumento de $O_2^{\bullet-}$ pelas mitocôndrias e consequente ativação das proteínas quinase C (PKC), além de resultar no aumento de ciclooxigenases (COX), resulta também em ativação de NADPH oxidases (NOX), que são complexos enzimáticos compostos de multi subunidades. As NOX também produzem os EROs, utilizando NADPH como substrato. Estas EROs também ativam NOX, gerando um círculo vicioso. Estes complexos enzimáticos também podem ser ativados pelo peptídeo angiotensina II (AngII), ativando em cascata as PKC e alimentando este círculo (Cosentino *et al.*, 2003; Paneni *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2014). Existem diferentes isoformas de NOX e, as EROs derivadas da isoforma NOX4, parecem desempenhar importante papel em complicações cardiovasculares (Doughan *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2014).

Outra possível fonte contribuidora para o quadro de EOX ocorre por intermédio do desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), onde elétrons são transferidos para o oxigênio molecular. Este processo gera $O_2^{\bullet-}$ ao invés de ON, o que também está intimamente ligado à saúde vascular (Yang *et al.*, 2009; Cosentino-Gomes *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2014).

1.3. Dislipidemia e risco cardiovascular

O metabolismo de lipídeos pode ser desregulado de diversas formas, alterando os níveis de lipoproteínas plasmáticas e suas respectivas funções. A dislipidemia representa uma das alterações metabólicas mais comumente associadas à obesidade. Consiste tipicamente em hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento dos níveis de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de LDL pequenas e densas. Este quadro já caracteriza um RCV, sobretudo se somado a outros riscos já mencionados. Das DCV atribuídas à dislipidemia, a DAC talvez seja a mais proeminente. Dislipidemias podem também ocorrer como consequência de outras doenças e condições, além de questões genéticas e fatores ambientais. As elevações de colesterol total e de LDL podem ser modificadas por mudanças de hábitos de vida e também por fármacos, e receberam muita atenção nas últimas décadas por sua relação com a saúde cardiovascular, principalmente em questões relacionadas a placas ateroscleróticas (Reiner *et al.*, 2011; Pedro-Botet *et al.*, 2018).

Comumente, terapias para diminuição da LDL utilizam estatinas que agem reduzindo a síntese de colesterol e podem aumentar os receptores de LDL (LDLr) hepáticos, ocasionando a diminuição dos níveis plasmáticos dessas lipoproteínas. A principal fonte do colesterol plasmático total é a síntese endógena, mas parte de nosso colesterol vem da dieta. Estas proporções podem mudar de acordo com o genótipo do indivíduo e a própria dieta. Importante ressaltar que as lipoproteínas mencionadas não são o colesterol em si, mas estas os carregam pela corrente sanguínea, por exemplo do fígado para as células (LDL) e das células para o fígado (HDL) (Seo e Choi, 2015; Weingärtner *et al.*, 2016; Lütjohann *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas associadas à dislipidemia costumam envolver macrófagos juntos ao endotélio que, através de receptores *scavenger*, estão diretamente envolvidos na formação das placas ateroscleróticas que eventualmente culminam em DCV. Sendo assim, receptores e transportadores de macrófagos das células endoteliais e hepáticas são de profunda importância no funcionamento e dinâmica das lipoproteínas, influenciando diretamente no acúmulo intracelular de lipídeos, desencadeando respostas inflamatórias e de apoptose (Moore e Freeman, 2006; Seo e Choi, 2015).

Através dos receptores *Scavenger*, os macrófagos presentes junto ao endotélio arterial internalizam partículas de LDL oxidadas (LDLox) ou glicadas. Existe um mecanismo de contraregulação que ocorre fisiologicamente quando há muito colesterol intracelular, autolimitando sua produção e também a dos LDLr na membrana. Todavia, ao internalizar LDLox, este mecanismo de contraregulação não ocorre. Isto também pode desencadear a formação das células espumosas. Diversos tipos de receptores *scavenger* já foram descritos e a estes ligam-se outras substâncias que não só partículas de LDL alteradas como LDLox (Moore e Freeman, 2006; Leança *et al.*, 2010).

Moléculas de adesão, como a *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e E-selectina, também são importantes estruturas responsáveis pelo recrutamento de células imunológicas para o endotélio. Este recrutamento de monócitos e subsequente transformação em macrófagos e formação de células espumosas, também caracteriza um fator chave no início da formação da placa aterosclerótica. As proteínas *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) também desempenham importante papel na quimiotaxia e infiltração de monócitos/macrófagos na parede arterial. Estas células imunológicas geram EROs que, como descrito anteriormente, estão diretamente ligadas ao RCV (Hulsmans e Holvoet, 2010).

1.4. Remodelamento cardíaco e vascular

O coração requer um fornecimento constante de energia e oxigênio para manter seu nível intracelular de ATP, essencial para o ciclo ininterrupto de contração e relaxamento deste órgão. Sob condições fisiológicas, a produção de ATP provém majoritariamente de ácidos graxos através da oxidação mitocondrial, em seguida de glicose e, em menor escala, lactato (Figura 1) (Gibb e Hill, 2018; Anaruma *et al.*, 2020). Por outro lado, quando as concentrações de glicose e insulina estão aumentadas no sangue, pode ocorrer uma mudança nas proporções de utilização de substrato energético e isto influencia na hipertrofia através da produção de EROs (Bertrand *et al.*, 2008; Anaruma *et al.*, 2020). A insulina compartilha vias de sinalização com diferentes hormônios hipertróficos que ativam sinalizações metabólicas envolvidas na estimulação do crescimento celular e síntese proteica, que podem levar à hipertrofia cardíaca. Outros fatores patológicos como hipertensão e disfunção valvular também estão ligados à estimulação crônica destas vias que levam à hipertrofia cardíaca patológica (Bertrand *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2011). Estudos apontam ainda que o acúmulo de lipídeos

intermediários no miocárdio e consequente lipotoxicidade ocasionam aumento da inflamação e EOX, sendo estes os possíveis mecanismos pelos quais as disfunções e alterações da estrutura cardíaca ocorrem na obesidade (Van Gaal *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2013; Abdurrachim *et al.*, 2014).

O remodelamento cardíaco refere-se às mudanças estruturais do coração, como a hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE), que permitem que cardiomiócitos e matriz extracelular (MEC) adaptem-se às novas necessidades de trabalho deste órgão. Esta alteração trata-se de uma resposta adaptativa ao aumento da atividade ou sobrecarga funcional do coração. Portanto, não necessariamente o termo remodelamento cardíaco sempre diz respeito a questões patológicas, porém, é geralmente associado a doenças e complicações cardíacas, sendo nestes casos denominado remodelamento cardíaco adverso ou patológico. Situações em que o remodelamento cardíaco é considerado fisiológico são o remodelamento cardíaco induzido por exercício físico e o remodelamento cardíaco reversível induzido por gravidez (Varga *et al.*, 2017; Gibb e Hill, 2018; Aimo *et al.*, 2019).

Embora o remodelamento adverso possa, a curto prazo, compensar parâmetros hemodinâmicos anormais, se não for tratado, está associado à piora da função cardíaca e a um prognóstico ruim (Varga *et al.*, 2017; Aimo *et al.*, 2019). O remodelamento cardíaco compreende mudanças moleculares, celulares e intersticiais, manifestando-se clinicamente em mudanças no tamanho, forma e função. Hipertrofia dos cardiomiócitos e maior deposição de colágeno na MEC, com consequente HVE, são considerados os maiores fenômenos que ocorrem no remodelamento cardíaco adverso, além de também poder ocorrer fibrose (Riaz *et al.*, 2017; Varga *et al.*, 2017). Complicações advindas da obesidade e patologias como hipertensão arterial, DM e isquemia miocárdica podem levar a HVE (Filho, 2012; Anaruma *et al.*, 2020). Outros fatores associados à obesidade também vêm chamando a atenção nas últimas décadas por influenciarem no remodelamento cardíaco adverso. Hormônios do trato gastrointestinal como grelina, leptina e GLP-1, comumente estão alterados em obesos e vem demonstrando papel importante na patofisiologia do remodelamento cardíaco nesta população (Sanches *et al.*, 2019).

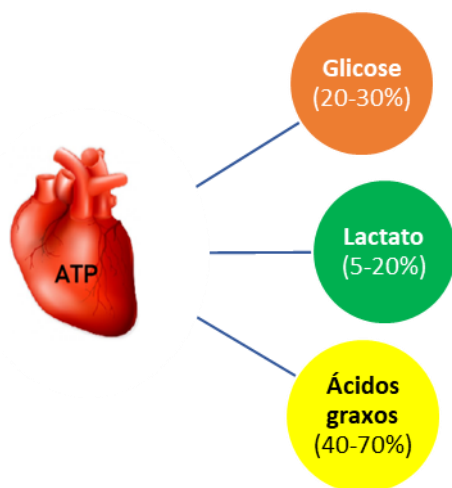


Figura 1 - Visão simplificada dos substratos utilizados na produção de ATP no coração.

Legenda: Esquema representando percentualmente os três principais substratos utilizados em condições fisiológicas.

Fonte: Adaptado de Gibb e Hill, 2018.

A ocorrência do remodelamento cardíaco é influenciada pela hemodinâmica, ativação neuro-hormonal e outros fatores ainda sob investigação (Aimo *et al.*, 2019). A perturbação da estrutura da MEC, que em parte ocorre por metaloproteinases (MMP), prejudica a irrigação dos cardiomiócitos pelos vasos sanguíneos. Além disso, também pode ocorrer o enrijecimento do miocárdio, comprometendo a contração e o relaxamento. Tudo isso pode afetar a integridade estrutural e funcional do coração como um todo (Cohn *et al.*, 2000; Riaz *et al.*, 2017). Das células que compõem o coração, os cardiomiócitos representam aproximadamente 30% e fibroblastos entre 40 e 60%, além de outras células como células endoteliais, células do sistema imunológico, entre outras (Cohn *et al.*, 2000; Baum e Duffy, 2011; Varga *et al.*, 2017). Como resultado de um insulto, o número de cardiomiócitos pode diminuir e os restantes podem adotar uma conformação mais alongada ou de maior diâmetro, na tentativa de compensar a perda de tecido contrátil (Cohn *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2017).

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como concêntrica ou excêntrica, dependendo de suas características relacionadas ao crescimento do VE. Quando há um remodelamento compensatório como em casos de hipertensão arterial ou doenças valvulares, onde há elevação da pós-carga (pressão no ventrículo ao ejetar o sangue), a hipertrofia é concêntrica. É caracterizada por adição em paralelo dos sarcômeros dos cardiomiócitos, onde o septo interventricular e a parede livre ficam mais espessos, aumentando a relação massa/volume, ou seja, inicialmente a dilatação do lúmen

ventricular não acompanha proporcionalmente o aumento das paredes. A insuficiência cardíaca costuma vir posteriormente, acompanhada do aumento da cavidade ventricular. No caso da hipertrofia excêntrica, com o aumento da pré-carga (distensão do VE ao encher de sangue) e consequente estresse diastólico, ocorre o aumento do raio da cavidade do VE. Com este aumento de volume, por consequência pode ocorrer o aumento do estresse sistólico, que pode ocasionar o aumento da espessura do miocárdio de forma compensatória. Neste caso, a adição dos sarcômeros dos cardiomiócitos ocorre em série. É o tipo de hipertrofia compensatória que pode ocorrer, por exemplo, com o exercício físico resistido, onde a relação massa/volume não é tão alterada (Swynghedauw, 1999; Filho, 2012; Anaruma *et al.*, 2020).

A obesidade induz alterações hemodinâmicas, como o aumento do volume sanguíneo. A sobrecarga crônica de volume sanguíneo, que pode gerar estresse de pré-carga, em combinação com hipertensão (pós-carga), leva a mecanismos compensatórios que podem resultar em HVE. Além do distúrbio na hemodinâmica, adipocinas produzidas onde há excessivo tecido adiposo, como a leptina, resistina, autotaxina, entre outras, também levam a HVE e influenciam na iniciação e progressão das DCV (Anthony *et al.*, 2019; Sanches *et al.*, 2019; Anaruma *et al.*, 2020).

O aumento da deposição de colágeno na MEC e a mudança de sua estrutura podem levar à fibrose. Estes são alguns dos principais fatores relacionados à rigidez cardíaca e disfunção diastólica subclínica. Isto pode ocorrer por diversos fatores que desencadeiem respostas inflamatórias, respostas hormonais, assim como isquemia e demais fatores associados. Morte celular por necrose ou apoptose está normalmente associada ao remodelamento cardíaco adverso (Tate *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018).

Os fibroblastos compõem a maior parte do tecido conjuntivo e produzem componentes da MEC, como as fibras e substância fundamental amorfa, além de serem essenciais no processo de cicatrização, tendo assim grande papel no remodelamento, patológico e fisiológico (Baum e Duffy, 2011). São encontrados em todos os compartimentos do coração e produzem os colágenos tipo I, III, V e VI, dentre outros componentes da MEC cardíaca. Estas proteínas formam uma rede estrutural que liga-se a fibronectinas e integrinas, que conectadas ao citoesqueleto, estabelecem uma espécie de comunicação do meio extracelular com o meio intracelular através de estresse mecânico, por exemplo (figura 2) (Cohn *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2017). Os adipócitos encontrados no coração, mais especificamente no epicárdio (camada mais externa do coração) e vasos coronarianos é um tipo de tecido metabolicamente ativo. Este tecido

secreta moléculas bioativas como adipocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e fatores cardioprotetores. A interação deste tecido com o remodelamento do miocárdio é bastante plausível e também pode influenciar em doenças como a DAC, pois foi observado que indivíduos com DAC possuem este tecido adiposo mais espesso que indivíduos sem DAC (Varga *et al.*, 2017; Anthony *et al.*, 2019).

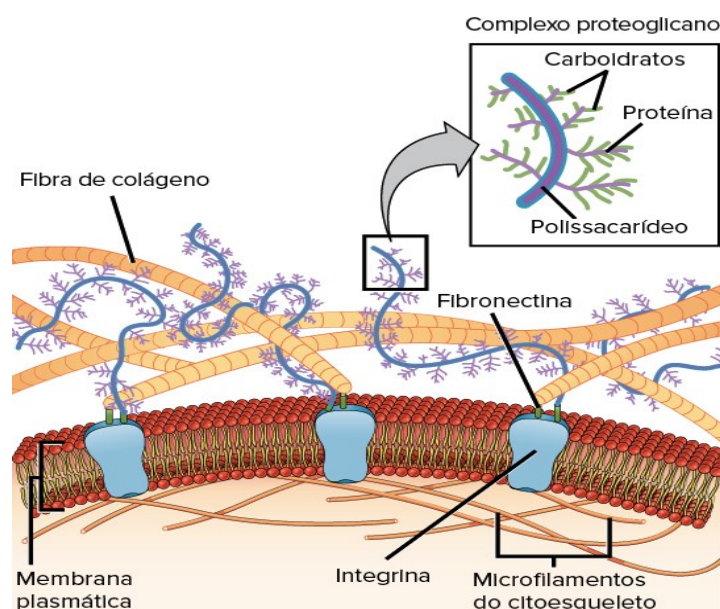


Figura 2 - Matriz extracelular e interação com a célula.

Legenda: O meio extracelular comunica-se com o meio intracelular através de uma rede de fibras de colágeno, fibronectinas e integrinas.

Fonte: Adaptado de OpenStax College, Biology. 2013.

O aumento da produção de EROs e inflamação também estão diretamente relacionados ao quadro de remodelamento. A idade é um fator independente de hipertensão que influencia nas medidas histológicas de colágeno e elastina na aorta (Guzik e Touyz, 2017). Contudo, o aumento de EROs é provável peça central nos mecanismos por trás do remodelamento. De fato, fatores como inflamação, angiogênese, hipertrofia de cardiomiócitos, apoptose, fibrose e disfunção contrátil, são sensíveis a reações redox (Wilson *et al.*, 2018).

Condições que afetam o balanço entre função arterial e sua estrutura, como a obesidade, podem causar ou acelerar o remodelamento adverso arterial. É difícil analisar até que ponto um único mecanismo contribui para o remodelamento arterial, que pode ser hipertrófico (para dentro, quando há espessamento da parede vascular) ou

hipotrófico (para fora, com afinamento da parede vascular) (Van Varik *et al.*, 2012). A organização das camadas de fibras elásticas e de células musculares lisas na túnica média de artérias saudáveis permitem que o vaso se expanda. Isso faz com que, aos pulsos de pressão sistólica, a estrutura do vaso mantenha-se estável, em uma sinergia entre a elasticidade passiva das fibras elásticas e a contratilidade dinâmica das células musculares lisas. Já no caso de remodelamento, as camadas de fibras elásticas tornam-se fragmentadas e fibróticas (Van Varik *et al.*, 2012).

Em resposta a condições patológicas como a inflamação, as células endoteliais produzem citocinas e fatores de crescimento que também influenciam na homeostasia da parede vascular. Particular atenção deve ser dada à inflamação do tecido adiposo perivascular (TAPV), que parece desempenhar um papel importante na patogênese de DCV. Em doenças vasculares, o TAPV aumenta em volume e torna-se disfuncional, adotando características pró-inflamatórias e com produção diminuída de fatores vasoprotetores. Substâncias como resistina, Interleucina 6 (IL-6) e *Tumor Necrosis Factor Alpha* ou Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) estão aumentados no TAPV inflamado. Fatores que desempenham um papel de proteção, como a adiponectina, podem, por exemplo, reduzir a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelas NOX e aumentar a disponibilidade de ON na parede do vaso, enquanto as citocinas inflamatórias podem induzir disfunção da enzima eNOS. Estes eventos relacionam o TAPV disfuncional à disfunção vascular (Nosalski e Guzik, 2017, Sanches *et al.*, 2019).

1.5. Sirtuínas, Nrf2 e risco cardiovascular

Sirtuínas constituem uma família de enzimas, dependentes de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD), que catalisam modificações pós-traducionais em proteínas, em especial a desacetilação. O DNA, quando acetilado, fica menos ligado às histonas, tornando-se disponível para a transcrição. Quando desacetilado, o DNA fica tipicamente inacessível à transcrição por estar fortemente ligado às histonas (Bitto *et al.*, 2015).

Em camundongos e também em humanos, sete sirtuínas foram identificadas (SIRT1-7). A Sirtuína 1 (SIRT1) é uma das sete isoformas das sirtuínas presentes nos mamíferos e é uma das mais estudadas. Ela tem sido associada tanto a proteção como a fator de risco em diversas desordens relacionadas ao envelhecimento, incluindo DCV, câncer, SM e doenças degenerativas, por regular proteínas e genes envolvidos na

resposta antioxidante, resposta anti-inflamatória, resposta anti-apoptótica, resposta insulínica e biogênese mitocondrial (Bonda *et al.*, 2011; Sin *et al.*, 2015; Bitto *et al.*, 2015). A SIRT1 localiza-se no núcleo e transloca-se para o citosol sob condições específicas e, embora sua superexpressão em todo o organismo não aparente estender o tempo de vida em camundongos, pode melhorar alguns parâmetros metabólicos que podem estar associados com a qualidade de vida (Satoh *et al.*, 2011; D'Onofrio *et al.*, 2018).

O mesmo parece acontecer no contexto de tecidos e células específicas (Bitto *et al.*, 2015). Nos mamíferos, as sirtuínas regulam respostas metabólicas em múltiplos tecidos. No fígado, a SIRT1 regula positivamente receptores que funcionam como sensores de colesterol, influenciando na homeostasia de lipídeos e colesterol no plasma. Além disso, SIRT1 é também importante para a regulação de gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos quando em privação de nutrientes (Satoh *et al.*, 2011). No músculo esquelético de camundongos e de humanos, a melhora da captação de glicose obtida com suplementação de resveratrol, um polifenol natural encontrado em uvas tintas, é possivelmente mediada pela SIRT1 (Sin *et al.*, 2015). Neste tecido, a oxidação de ácidos graxos pela mitocôndria é essencial para a preservação de glicose/glicogênio para outros tecidos como o cérebro, principalmente em caso de privação de nutrientes e após exercícios. A SIRT1 aumenta a oxidação de ácidos graxos pela mitocôndria e, considerando que a desregulação desta oxidação no músculo esquelético é associada com obesidade e RI, a maior expressão de SIRT1 pode melhorar o metabolismo energético no músculo esquelético destas populações (Newgard *et al.*, 2009; Satoh *et al.*, 2011).

Sabe-se que a sinalização insulínica, metabolismo energético alterado e disfunção mitocondrial, modificações pós-traducionais de proteínas e alterações na homeostase da célula, podem resultar em EOX e apoptose, que são associados à RCV, onde a SIRT1 pode desempenhar um papel benéfico (Karbasforooshan e Karimi, 2017). Além da SIRT1, as sirtuínas SIRT3 e SIRT6 também exercem efeitos protetores no coração e atenuam a hipertrofia cardíaca. A SIRT7 também pode regular apoptose e resposta induzida por estresse no coração (Matsushima e Sadoshima, 2015).

A inibição de SIRT1 aumenta a atividade das NADPH Oxidases e a produção vascular de $O_2^\bullet$. Já foi demonstrado que polifenóis como o resveratrol podem atenuar

essas alterações, que inclusive levam à disfunção endotelial, possivelmente porque resveratrol tem a capacidade de aumentar expressão de SIRT1. Ainda, tanto SIRT1 quanto NADPH Oxidases (como a NOX4, principal isoforma nos cardiomiócitos), dependem de NAD/NADH para exercerem suas funções, o que levanta a possibilidade das NOX regularem a atividade das sirtuínas, por uma espécie de competição por substrato (Matsushima e Sadoshima, 2015). A SIRT1 é altamente sensível ao estado redox da célula e, ao contrabalançar os efeitos nocivos das EROs através da desacetilação de múltiplos alvos, confere cardioproteção e mantém a função vascular. Além disso, SIRT1 influencia diretamente na saúde vascular também através de uma relação mútua com o ON. A SIRT1 desacetila e aumenta a atividade da eNOS, aumentando assim a produção de ON, melhorando a vasodilatação dependente de endotélio. Somado a isso, existe um *feedback* positivo entre SIRT1 e eNOS, uma vez que ON pode aumentar a expressão de SIRT1 (D'Onofrio *et al.*, 2018). O NF-κB também é sensível ao status redox e, a nível vascular, este fator de transcrição é altamente influenciado pelo EOx, que faz aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e marcadores pró-trombóticos. A SIRT1 desacetila o complexo NF-κB fazendo com que haja inibição de sua cadeia de transcrição que resulta em inflamação (Dias *et al.*, 2015; D'Onofrio *et al.*, 2018).

Flavonas, estilbenos e antocianinas são compostos fenólicos que podem estimular diretamente a atividade de SIRT1 *in vitro*. Resveratrol (estilbeno) é bem conhecido como um potente ativador natural de SIRT1. No entanto, mais de 3.500 compostos ativadores de sirtuínas, também conhecidos como STACs de primeira, segunda e de terceira geração, já foram sintetizados e analisados (Bitto *et al.*, 2015; Matsushima e Sadoshima, 2015). Os resultados de resveratrol são encorajadores no que diz respeito à ativação de SIRT1 por polifenóis. Portanto, é de grande interesse avaliar como o perfil de polifenóis contidos em frutas como o açaí, pode agir neste contexto no coração e vasos como a aorta torácica.

O fator de transcrição nuclear *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) é peça chave em uma das vias que controlam toda uma programação genética que auxilia a homeostase redox, protegendo as células do quadro de EOx. A proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) é a principal reguladora da ação do Nrf2, através de sua ubiquitinação, controlando os seus níveis e localização na célula. No citosol, o Nrf2 é direcionado pela proteína inibitória Keap1 para ser degradado por proteossomos

(Zhang *et al.*, 2004; Hybertson e Gao, 2014). Além da Keap1, a kinase *Glycogen synthase kinase-3* (GSK-3), e possivelmente outras proteínas, também podem inibir e degradar o Nrf2 (Cuadrado, 2015). Quando estimulado por EROs e outros compostos com propriedades eletrofilicas, ocorre uma mudança na conformação do complexo Nrf2-Keap1, impedindo a degradação do Nrf2 pelos proteossomos, ocasionando maior acúmulo deste fator de transcrição no núcleo, formando heterodímeros e, por fim, ligando-se ao *Antioxidant Response Element* (ARE) em regiões promotoras de uma variedade de genes relacionados à resposta antioxidante, detoxificação e controle metabólico (Zhang *et al.*, 2004; Hybertson e Gao, 2014; Ajit *et al.*, 2016).

Basicamente, três principais mecanismos participam na regulação da quantidade e atividade do Nrf2, sendo: 1) o supracitado controle de degradação proteossomal do Nrf2 citosólico por ubiquitinação, 2) sua própria expressão gênica e, 3) expressão gênica de sua proteína supressora, Keap1, e sua interação com outras proteínas ligantes, que não o Nrf2 (Hybertson e Gao, 2014).

Diversos fitoquímicos, como os polifenóis da polpa do açaí, podem influenciar na repressão do Nrf2 mediada por Keap1, levando à liberação deste fator de transcrição no citoplasma e sua translocação para o núcleo e subsequente ligação ao ARE, promovendo a transcrição de enzimas de fase II. Estas enzimas desempenham um papel importante na detoxificação e citoproteção, bem como na regulação da homeostase redox (Zhang *et al.*, 2004; Ajit *et al.*, 2016).

As mudanças estruturais e funcionais nos vasos, como na espessura da parede do vaso, disfunção endotelial, desregulação de enzimas da MEC (como as MMP) e, sobretudo, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e da produção de EROs, são fatores que constituem um múltiplo processo apelidado de ‘*inflammaging*’, pois se relaciona diretamente ao envelhecimento celular e tecidual. Este processo tem como peças chave o NF-kB, AMPK e sinalização de Nrf2, fatores estes que influenciam e/ou são influenciados pela SIRT1 (D’Onofrio *et al.*, 2018).

1.6. Modelo experimental de obesidade: Camundongo C57BL/6

Muitos dos aspectos da obesidade podem ser induzidos em modelos animais experimentais que apresentam predisposição para o ganho de peso e desenvolvimento da obesidade, dislipidemia e RI. Os camundongos C57BL/6 submetidos à dieta

hiperlipídica são um modelo muito utilizado nestes contextos. O modelo que mais se aproxima da obesidade humana é aquele que se baseia em uma dieta rica em gorduras saturadas, as chamadas *high-fat diet* ou dieta hiperlipídica, pois demonstra o papel da dieta no desenvolvimento da obesidade e nas alterações metabólicas (Buettner *et al.*, 2007).

A linhagem do camundongo C57BL/6 produz um fenótipo obeso quando alimentados por dietas hiperlipídicas e hipercalóricas, enquanto animais submetidos a uma dieta pobre em lipídeos e normocalóricas permanecem eutróficos. Dentre diferentes tipos de lipídeos testados nas dietas para estes animais, Buettner *et al.* (2006) observaram que a banha de porco é a que mais promoveu obesidade, RI e esteatose hepática. Por isso, este modelo experimental é considerado padrão ouro para modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Buettner *et al.*, 2006; Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Abdurrachim *et al.*, 2014). Além de RI e hiperinsulinemia, animais desta linhagem são também suscetíveis ao desenvolvimento de dislipidemia e demais alterações metabólicas (Gallou-Kabani *et al.*, 2007), e também reproduzem diversas alterações cardiovasculares, como disfunção endotelial, aumento da massa do coração, hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose e compensações metabólicas no coração (Oliveira *et al.*, 2010; Calligaris *et al.*, 2013; Abdurrachim *et al.*, 2014; Boardman *et al.*, 2017).

1.7. Estatinas: Rosuvastatina

A Rosuvastatina (ROSU) é uma potente estatina encontrada no mercado, aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e, assim como outros medicamentos da classe das estatinas, são considerados para o tratamento de dislipidemias (Grundy e Stone, 2018). Os efeitos da ROSU sobre redução do colesterol total, de LDL e de TG no sangue, bem como possível elevação de HDL, são dose-dependente e reduzem o risco de morbidade e mortalidade cardiovascular (Nicholls *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2016; Grundy e Stone, 2018). O metabolismo da ROSU utiliza menos o citocromo P450 quando comparado a outras estatinas, o que oferece menor risco de interação com outras drogas (Kostapanos *et al.*, 2010).

As estatinas tem como mecanismo de ação a inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima crítica na síntese de colesterol a partir de Acetil-CoA, ao catalisar a conversão de HMG-CoA em mevalonato (Goodman e Gilman, 2005; Feliciano-Alfonso, 2013). As estatinas possuem fórmula química semelhante, porém, a ROSU possui uma característica própria quando comparada às demais estatinas, um grupamento metil-sulfato amida, o qual proporciona uma elevada afinidade com o sítio ativo da enzima alvo e uma maior interação com a mesma (McTaggart, 2001; Feliciano-Alfonso, 2013).

A ROSU, como toda estatina, também é hepatotóxica, porém esta estatina é relativamente hidrófila em comparação às outras estatinas, o que aumenta sua seletividade hepática. Consequentemente, sua absorção por outros tipos de célula é limitada. Possui uma meia vida mais longa entre as estatinas, o que a torna uma opção terapêutica importante, pois no contexto de intolerância às estatinas, ela é administrada com menor frequência, ainda mantendo o efeito desejado. Mesmo a dose mínima de ROSU, mostrou-se mais eficiente na redução do LDL-C do que fluvastatina, pravastatina, sinvastatina, lovastatina e atorvastatina (Feliciano-Alfonso, 2013).

Além dos efeitos de redução de colesterol, principal objetivo da ROSU, as estatinas também tem potencial antineoplásico e exibem atividades pró-apoptóticas, inibidoras do crescimento e pró-diferenciação em uma variedade de tipos de células tumorais (NCI, 2020). Outros efeitos pleiotrópicos são atribuídos à rosuvastatina. No contexto de camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica, Neto-Ferreira *et al.* (2013) destacam efeitos dose-dependente na melhora da intolerância à glicose e da sensibilidade à insulina. Além destes efeitos pleiotrópicos, observaram também uma mudança na compartimentalização de tecido adiposo, onde este apresentou uma tendência a acumular mais como subcutâneo e menos como visceral (Neto-Ferreira *et al.*, 2013).

Hermida *et al.*, (2013) relatam que, em modelo animal de SM, o tratamento crônico com ROSU desempenhou benefícios cardiovasculares, em especial em casos de fibrose no miocárdio e disfunção diastólica. O estudo aponta que o efeito antifibrótico é mediado pela AMPK nos fibroblastos, sendo esta uma possível via pela qual a ROSU desempenha seus efeitos pleiotrópicos, além do efeito antioxidante desempenhado pelo fármaco (Hermida *et al.*, 2013). Além disso, outros efeitos benéficos à saúde

cardiovascular, que não necessariamente atribuídos diretamente à redução de colesterol, foram associados à ROSU, como melhora na produção de ON e melhora na variabilidade da frequência cardíaca, efeitos estes que influenciam direta ou indiretamente no remodelamento cardíaco (Pelat *et al.*, 2003). Liao (2004) ressalta que ROSU pode desempenhar efeitos benéficos relacionados à hipertrofia cardíaca mesmo em pacientes não dislipidêmicos.

1.8. Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí - *Açaí Stone Extract* (ASE)

O açaí (*Euterpe oleracea* Martius) é um fruto originário da Amazônia e consumido mundialmente. A espécie vegetal pertence à família botânica *Arecaceae* e consiste em uma palmeira de múltiplos caules. O fruto apresenta cor violeta, diâmetro de cerca de 13,5 milímetros e peso de cerca de 2g, e tem sua maturação completa em até 175 dias. Seu caroço apresenta cor bege e representa até 83% do peso do fruto (Figura 3). Apesar de o consumo do açaí ser amplamente difundido no Brasil sob a forma de bebidas e sorvetes, o caroço é usualmente desprezado e pode representar relevante impacto ambiental. Além do uso como alimento, o açaí tem sido utilizado no tratamento de diversos sintomas (tais como febre e dores) por comunidades amazônicas e populações indígenas (Yamaguchi *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

Recentemente, seu papel como alimento funcional vem ganhando destaque, atribuído primordialmente ao seu conteúdo de compostos fenólicos. Estudos demonstram que a polpa do açaí é rica em epicatequinas, catequinas, homoorientina, orientina, isovitexina e antocianinas, sendo as mais abundantes cianidina 3-*O*-glicosídeo e cianidina 3-*O*-rutinosídeo. É importante destacar sua elevada capacidade antioxidante *in vitro*, em especial contra radicais superóxido e peróxil. O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí, ou *Açaí Stone Extract* (ASE) é rico em epicatequinas, catequinas e proantocianidinas. O conteúdo de fenólicos totais na polpa é de 18% e no caroço cerca de 25% (Rocha *et al.*, 2007; De Moura *et al.*, 2012).

Estudos recentes demonstraram efeitos benéficos no sistema cardiovascular exercidos pelo ASE, como em Rocha *et al.* (2007), onde ASE promoveu efeito vasodilatador dependente do endotélio em leito arterial mesentérico (LAM) de ratos *Wistar*. Foi sugerido que este efeito deva ocorrer via produção do ON e possivelmente via liberação de *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Em trabalho posterior (Rocha *et al.*, 2008), os autores relataram que o ASE reverteu a

hipertensão instaurada em 4 diferentes modelos de hipertensão experimental, provavelmente por ação antioxidante e vasodilatadora. Em modelo *spontaneously hypertensive rats* (SHR), ratos que receberam ASE tiveram a instauração do quadro hipertensivo prevenida, onde a expressão de eNOS aumentada em LAM de ratos SHR em comparação aos animais normotensos foi diminuída com ASE (Cordeiro *et al.*, 2015). No estudo de Oliveira *et al.* (2010), os autores avaliaram a resposta vasodilatadora dependente do endotélio em LAM de camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura saturada (dieta hiperlipídica, indutora da SM). Essa resposta era menor em animais do grupo *high-fat* em comparação ao grupo controle, que recebeu dieta normolipídica. Neste mesmo estudo, a administração do ASE na dose de 300 mg/kg/dia foi capaz de restaurar a resposta vasodilatadora do endotélio. Os marcadores da SM avaliados, tais como perfil lipídico, glicemia, sensibilidade à insulina e marcadores do dano oxidativo celular foram aumentados com a dieta hiperlipídica, sendo este aumento prevenido pelo ASE.

Da Costa *et al.* (2012, 2017) avaliaram o efeito protetor do ASE em modelo de hipertensão renovascular causada pela estenose da artéria renal (dois rins-um clipe; 2K-1C), que é associado a alterações morfofuncionais na vasculatura e alterações renais. Os autores observaram que o ASE foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial sistólica em animais 2k-1C. A vasodilatação dependente do endotélio em resposta à acetilcolina foi inferior em modelo 2K-1C em relação ao grupo controle, sendo essa resposta restaurada em LAM de animais tratados com ASE. Houve redução do EOX em LAM de animais tratados com ASE, mensurado através da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e de marcadores do dano oxidativo celular. O tratamento com ASE foi eficaz na redução dos danos estruturais e no remodelamento de artérias mesentérica e aorta induzidos pelo modelo de hipertensão renovascular.

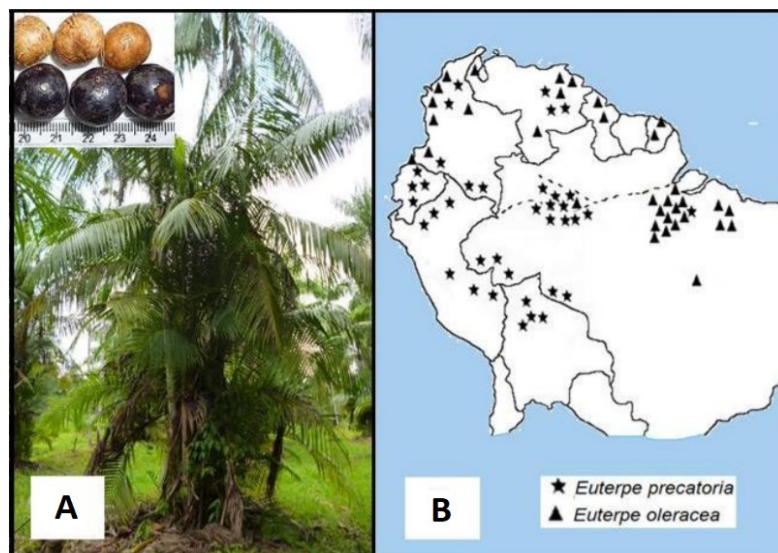


Figura 3 - Palmeiras de *E. oleracea* e distribuição geográfica na Amazônia.

Legenda: (A) Sementes, frutos e palmeiras de *E. oleracea* e (B) distribuição geográfica das espécies de açaí.

Fonte: Adaptado de Yamaguchi *et al.*, 2015.

Visto que a maior parte das sementes do açaí acabam sendo dispensadas por não terem utilidade na indústria alimentícia, e como foram observados diversos benefícios à saúde desempenhados pelo ASE, inclusive benefícios cardiovasculares, parece promissor que uma matéria-prima que, em princípio viraria lixo, possa tornar-se um potencial agente na prevenção e tratamento de DCV. Além disso, de forma geral, compostos naturais tendem a exercer menos efeitos adversos quando comparados a fármacos e moléculas sintéticas, porém, isto depende muito de cada caso, e por isso maiores estudos com compostos naturais devem ser encorajados.

No entanto, os efeitos do ASE especificamente no coração e na aorta torácica, no contexto da obesidade e remodelamento cardíaco, ainda não foram diretamente explorados. Além disso, muitos dos efeitos benéficos do ASE foram avaliados em estudos de prevenção (Oliveira *et al.*, 2010; da Costa *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2017), mas os efeitos terapêuticos da administração de ASE precisam ser melhor explorados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos terapêuticos do tratamento com ASE sobre alterações morfológicas e sobre o status redox, em coração e aorta torácica de camundongos C57BL/6 machos, submetidos à dieta hiperlipídica, comparando-os com os efeitos da rosuvastatina.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar se os tratamentos de quatro semanas com ASE, ou com ROSU, influenciam:

- O peso corporal, a glicemia e o perfil lipídico;
- A morfologia do coração e da aorta torácica;
- O dano oxidativo e a capacidade antioxidante no coração e na aorta torácica.
- A expressão de proteínas envolvidas no status redox e no remodelamento cardiovascular

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (Nº CEUA/036/2015).

Foram utilizados 70 camundongos da linhagem C57BL/6, machos, de 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/IBRAG/ UERJ, alocados no mesmo, para experimentação.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura média de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade ($60 \pm 10\%$) controladas. O ciclo de claro-escuro foi de 12 horas, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã.

3.2. Dietas

Os camundongos tiveram acesso à ração e água *ad libitum*, durante todo o tempo do experimento. A partir dos 30 dias de idade, durante 12 semanas, alimentaram-se de dieta controle de manutenção para roedores (AIN-93M) com 10% das kcal provenientes de gordura, baseando-se em Reeves *et al.* (1993), ou dieta hiperlipídica (AIN-93M modificada) com 60% das kcal provenientes de lipídeos, majoritariamente banha de porco, de acordo com Oliveira *et al.* (2010, 2015). Ambas as dietas foram elaboradas pela Rhoster®, São Paulo (tabela 1).

A dieta controle, peletizada, foi ofertada uma vez por semana. A oferta de ração foi pesada em uma balança digital (Shimadzu, UX4200H - precisão 0,01g) e após uma semana, foram recolhidas as sobras, pesadas na mesma balança e a diferença para o peso ofertado foi considerado como o total ingerido por caixa. A ingestão por animal foi calculada como o total ingerido por caixa, dividido pelo número de animais da caixa.

Para a dieta hiperlipídica, em pasta, foi feito o mesmo procedimento, porém, a troca e mensuração foram feitas diariamente, pois trata-se de uma dieta que oxida mais rapidamente. A ingestão calórica individual diária foi calculada de acordo com as respectivas dietas (dieta padrão: 3,8 kcal/g, dieta hiperlipídica: 5,4 kcal/g), a partir da média de consumo individual diário, de acordo com as informações nutricionais oferecidas pelo fabricante (Rhoster®, São Paulo) (tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas AIN-93M: padrão e hiperlipídica

Nutriente (g/kg dieta)	Padrão (AIN-93M)	Hiperlipídica (AIN-93M modificada)
Caseína (g)	140	190
Amido de milho (g)	620,7	250,7
Sacarose (g)	100	100
Óleo de soja (g)	40	40
Banha de porco (g)	-	320
Fibras (g)	50	50
Mistura de minerais (g)	35	35
Mistura de vitaminais (g)	10	10
L-cistina (g)	1,8	1,8
Colina (g)	2,5	2,5
Energia (Kcal/g)	3,8	5,4
Carboidratos (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídios (%)	10	60

Fonte: Rhoister, SP, Brasil (Reeves *et al.*, 1993).

3.3. Tratamentos

3.3.1. ASE (Extrato hidroalcoólico do caroço do Açaí)

Os frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (açaí), provenientes de Belém - PA, Brasil, foram fornecidos pelo Professor Dr. Pergentino José Cunha Souza, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Pará. A obtenção do ASE, foi reproduzida conforme Rocha *et al.*, 2007. Os frutos foram lavados e despulpados, sobrando somente os caroços. Foram pesados 200g de caroços, triturados e misturados a 400 mL de água destilada. Esta mistura foi então fervida por cinco minutos. Após a fervura, foram acrescentados 400 mL de etanol e esta mistura foi armazenada em geladeira e agitada por duas a quatro horas por dia, por dez dias. Após este período, o extrato passou por processo de filtração em filtros de papel. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão, entre 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado (modelo LIOTOP 202, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda – São Paulo, SP, Brasil) e mantido a -20 °C até o uso (Rocha *et al.*, 2007).

Após o preparo do extrato, o conteúdo de polifenóis foi dosado pelo método Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). O potencial vasodilatador foi verificado através da reatividade vascular, para assegurar eficácia do extrato. Estas medidas são utilizadas como controle de qualidade e para averiguar a viabilidade do extrato

para a posterior utilização nos experimentos. O perfil toxicológico do ASE foi observado após administração de 1,5g/Kg (dados não publicados).

A dose utilizada foi de 300mg/kg/dia e baseou-se em estudos prévios de nosso grupo, que demonstraram efeitos benéficos como melhora de parâmetros metabólicos, efeito antioxidante e vasodilatador (Oliveira *et al.*, 2010). O pó do ASE foi diluído em água filtrada e foi administrado aos animais por gavagem orogástrica, 1 vez ao dia. O volume administrado foi corrigido semanalmente de acordo com o peso dos animais, ficando em torno de 0,3ml para cada animal.

3.3.2. Rosuvastatina

O medicamento Crestor® - AstraZeneca (Rosuvastatina Cálcica), em comprimido de 20mg, foi utilizado na formulação. O comprimido foi macerado com grau em pistilo de porcelana, um comprimido por dia. O pó do comprimido macerado foi diluído em água filtrada para a dose de 20mg/Kg/dia e foi administrado por gavagem orogástrica, 1 vez ao dia. A dose utilizada baseou-se em Fraulob *et al.* (2012). O volume administrado foi corrigido semanalmente de acordo com o peso dos animais, ficando em torno de 0,3ml para cada animal.

3.4. Divisão de grupos e eutanásia

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais aos 30 dias de idade (Figura 4, Tabela 2). O grupo Controle (n=15) foi alimentado com a dieta padrão por 12 semanas. O grupo HF12 (n=15) alimentado com a dieta hiperlipídica por 12 semanas, sendo que ao final da oitava semana, parte destes animais foi eutanasiada (grupo HF8, n=10) para avaliação do efeito da dieta hiperlipídica antes do início do tratamento, outra parte iniciou tratamento com ASE (grupo HF+ASE, n=15) e outra parte iniciou tratamento com ROSU (grupo HF+ROSU, n=15). Ambos os grupos tratados continuaram com a dieta hiperlipídica durante o período do tratamento (4 semanas).

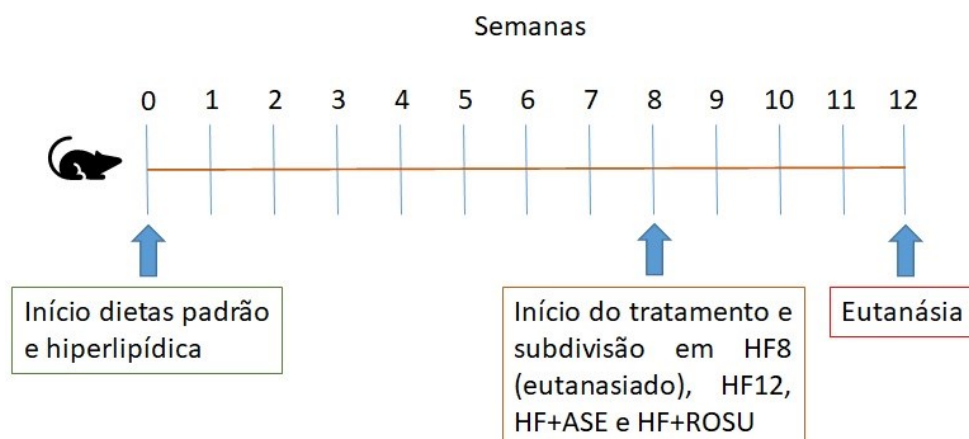


Figura 4 - Divisão dos grupos ao longo do tempo.

Após 12 semanas com as respectivas dietas, os grupos restantes (Controle, HF12, HF+ASE e HF+ROSU) foram eutanasiados. Os animais jejuaram por 06 horas e foram anestesiados (tiopental sódico 70 mg/kg, intraperitoneal). Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e o plasma centrifugado (4°C a 4.500 RPM por 15 minutos) e armazenadas a -80°C para posterior análise.

O coração foi parado em diástole (KCl 30mM), removido, pesado, e então o VE foi isolado e pesado (balança semi-analítica AD500, Marte). A aorta torácica foi removida e pesada (balança semi-analítica AD500, Marte). Ambos os tecidos foram imersos em formalina (1.27 mol/L formaldeído, 0.1 M tampão fosfato-salina, pH 7,2) ou congelados a -80°C, a depender da técnica a ser utilizada, para posterior análise. O comprimento da tíbia foi medido em centímetros para estabelecer uma razão do peso do coração com o comprimento da tíbia em g/cm (Yin *et al.*, 1982).

Tabela 2 - Divisão dos grupos e tratamentos

Animais			Gavagem		
Grupo	Tempo (semanas)	Dieta	Substância	Dose (diária)	Tempo (semanas)
Controle	1 - 12	Padrão	Água	-	8 - 12
HF8	1 - 8	Hiperlipídica	-	-	-
HF12	1 - 12	Hiperlipídica	Água	-	8 - 12
HF+ASE	8 - 12	Hiperlipídica	ASE	300mg/kg	8 - 12
HF+ROSU	8 - 12	Hiperlipídica	ROSU	20mg/kg	8 - 12

3.5. Peso dos animais

O registro do peso corporal de cada animal foi realizado semanalmente, do início do estudo (semana 1) até ao dia da eutanásia (semana 12). Foi utilizada uma balança digital (Shimadzu, UX4200H - precisão 0,01g) e foram calculadas as médias dos pesos dos grupos para a análise estatística.

3.6. Dosagens Séricas

3.6.1. Glicemia

Para a aferição da glicemia, os animais permaneceram em jejum por 06 horas, de acordo com protocolo utilizado previamente por nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2015). Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda por um pequeno corte. Para realizar as dosagens, foi utilizado um glicosímetro digital (Accu-Chek-Active, Roche®), com concentrações expressas em mg/dL.

As coletas e dosagens foram realizadas em três momentos:

- 1) No primeiro dia, antes de iniciar a dieta específica de cada grupo (início 1ª semana);
- 2) Final da 8ª semana, antes de iniciar o tratamento;
- 3) No último dia de tratamento, exceto o grupo HF8.

3.6.2. Perfil lipídico

A determinação dos níveis séricos de TG, do colesterol total e da LDL foi obtida com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os kits baseiam-se em métodos colorimétricos. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

3.7. Morfologia do coração

Para a análise morfológica, o VE foi seccionado em plano transversal ao eixo base-ápice, aproximadamente na metade da altura. A parte do ápice foi desidratada e incluída em blocos de paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Posteriormente foram seccionados em cortes de 5 µm em micrótomo (EasyPath Ep-31-20091, manual, São Paulo, SP, Brasil) e postos em lâminas histológicas.

Para a morfometria, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Seis imagens, de cinco animais de cada grupo, foram obtidas com microscópio Nikon

Eclipse E200 e câmera Optikam Wi-fi 4083, utilizando objetiva de 2x e software SXView, versão 2.2.0.172 Beta.

Com o software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), foram aferidas as medidas da parede livre (PL), lúmen e septo interventricular (SIV). Tomando os pontos de clivagem do ventrículo direito como base para traçar uma linha reta imaginária entre eles, as medições da PL, lúmen e SIV foram feitas transversalmente a esta linha imaginária (Pereira-Silva *et al.*, 2019).

3.8. Morfologia da aorta torácica

Para a análise morfológica, o tecido foi desidratado e incluído em blocos de paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Posteriormente foram seccionados em cortes de 5 µm em micrótomo (EasyPath Ep-31-20091, manual, São Paulo, SP, Brasil) e postos em lâminas histológicas.

Para morfometria, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram obtidas cinco imagens de aorta de cinco animais de cada grupo, totalizando vinte e cinco imagens por grupo. As capturas das imagens (formato JPEG, colorida 36-bit, 1280-1024 pixels) foram obtidas com uma câmera LC Evolution e um microscópio de fluorescência Olympus BX40 com lente objetiva de 40x. Para as medições da espessura da túnica média foi utilizado o software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), com a ferramenta '*Manual Measurements > Creating Line*', traçando uma reta perpendicular à túnica média, excetuando-se a túnica adventícia.

Para avaliar a deposição de colágeno na matriz extracelular, os cortes de 5 µm foram corados com picrosirius red. Foram obtidas imagens de cinco cortes histológicos por animal, sendo 5 animais de cada grupo (formato JPEG, colorida 36-bit, 1280-1024 pixels). Cada corte foi fotografado com lente objetiva de 40x, em quadrantes, com câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX40. A marcação de colágeno foi determinada calculando-se a porcentagem da área total do campo marcado com picrosirius-red (em vermelho). Para esta análise e quantificação foi utilizado o software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

3.9. Imunohistoquímica

As aortas torácicas foram desidratadas e incluídas em blocos de paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Posteriormente os blocos foram seccionados

em cortes de 5 µm em micrótomo (EasyPath Ep-31-20091, manual, São Paulo, SP, Brasil) e postos em lâminas histológicas.

Os cortes de 5 µm passaram pelo processo de desparafinização e reidratação. Após isso, foram incubados com água oxigenada 0,3% por 15 minutos. Então foi adicionado tampão tripsina (1%). Para bloquear ligações não específicas, os cortes foram incubados com *horse serum* por 20 minutos, com posterior incubação *overnight* a 4°C do anticorpo primário diluído em tampão fosfato salino (PBS - 1,38g NaH₂PO₄, 6,96g KH₂PO₄, 7,2g NaCl, pH 7.2) (1:1000). No dia seguinte, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário em temperatura ambiente por 30 minutos e submetidos à lavagem com PBS seguido de incubação com estreptavidina por 30 minutos. Após isso, os cortes foram incubados com DAB (K3466, DAB; Universal Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), lavados em água destilada e corados com hematoxilina. O *horse serum* utilizado, anticorpo secundário e estreptavidina compõem o kit Vectastain® Universal Quick HRP R.T.U kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Foram obtidas imagens dos quadrantes de 3 cortes, de 3 animais de cada grupo, com câmera Olympus DP71 e com microscópio de fluorescência Olympus BX40, utilizando lente de 40x. A quantificação foi determinada calculando-se a porcentagem da área total do campo marcado com DAB (em marrom). Para isso, foi utilizado o software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

3.10. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em Coração

A padronização deste ensaio foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990), na qual um dos subprodutos da peroxidação lipídica de membranas biológicas, o malondialdeído (MDA), reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um produto colorido róseo capaz de ser lido e quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm. Foram utilizados 50µl de homogenato de coração em KPE para 100µl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 2000 RPM à 4°C. Separou-se 100µl do sobrenadante em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 100 µl de TBA (0.67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (95 °C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Plate ChameleonTMV, Hidex Oy).

3.11. Atividade Antioxidante Enzimática em Coração e Aorta

3.11.1. Medida da Superóxido Dismutase (SOD) em Coração

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação dos ânions superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Baseando-se na medida da concentração de adrenocromo que resulta da oxidação da noradrenalina pelo superóxido, foi determinada a atividade da SOD. Baseando-se em Bannister e Calabrese (1982), com as modificações necessárias para realizar o ensaio em coração, foram utilizadas alíquotas de 10, 20 e 30µL das amostras de homogenato de coração em tampão fosfato (KPE). As amostras foram incubadas com 1.940µL de tampão glicina (3,75 mg/ml de água destilada) e 20µL da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada), para metabolizar o peróxido de hidrogênio formado como subproduto da reação da SOD. Então foi adicionado 40µL da solução noradrenalina (19 mg/ml de água destilada). A concentração de adrenocromo foi medida no espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) no comprimento de onda 480 nm, com duração de 180 segundos com intervalo de 10 segundos entre as leituras feitas separadamente para cada concentração de amostra. Os valores obtidos foram corrigidos pela dosagem de proteína.

3.11.2. Medida da Catalase (CAT) em Coração e Aorta

A partir de duas moléculas de peróxido de hidrogênio, a enzima catalase, uma peroxidase, gera oxigênio molecular e água, eliminando o peróxido de hidrogênio. Nos ensaios, a atividade desta enzima foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio pela reação. A padronização desta técnica foi feita baseando-se em Aebi (1984), modificando parâmetros necessários para avaliação no coração e na aorta. Foram utilizados 20µL de homogenato de coração e 20µL de homogenato de aorta diluída (20x) em tampão fosfato (KPE) em cubetas de quartzo separadas. As amostras foram incubadas com 1.980µL de solução de KPE e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de H₂O₂ foi avaliada por espectrofotometria (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) durante 60 segundos, com intervalo de 30 segundos entre as leituras (tempos 0, 30 e 60 segundos). Os valores obtidos foram corrigidos pela dosagem de proteína.

3.11.3. Medida da Glutathione Peroxidase (GPx) em Coração e Aorta

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, utilizando como substrato a glutathione reduzida (GSH), para doação de elétrons. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340nm.

Foram utilizados 2,5µL de homogenato de coração diluído (1:8) e 15µL de homogenato de aorta diluído (1:8) em placas de ELISA. As amostras foram incubadas com 100 µL de tampão fosfato, glutathione reduzida (2mM), GR (0,11mg/mL) e azida sódica (0,065) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, 100µL de NADPH (10mM) foi adicionado e foram feitas leituras em intervalo de 180 segundos. Posteriormente, 100 µL de H₂O₂ (3%) foram adicionados e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340nm, Plate CHAMELEON™V, Hidex Oy). Esta padronização baseou-se na técnica descrita por Flohé e Günzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados. Os valores obtidos foram corrigidos pelas dosagens de proteína.

3.12. Western Blotting de Coração e Aorta

Amostras foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4), com coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugadas (13.000 RPM, 4°C por 25 min) para posterior coleta do sobrenadante.

A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico através do kit BCA ProteinAssay (ThermoScientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) na proporção de 80µL de homogenato para 20µL de tampão de amostra. Esta solução foi então aquecida a 95°C por 5 min.

De acordo com o peso molecular de cada proteína a ser analisada, foram aplicadas alíquotas destas soluções em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- 45 PAGE), em concentrações de 8%, 10%, ou 12% de poliacrilamida para eletro-

separação, sendo 10µg das amostras de aorta e 30µg das amostras de coração. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de difluoreto de polivinilidina (PVDF) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas em TBS-T acrescido de albumina a 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 60 min, sob agitação constante. Posteriormente as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (overnight, a 5°C), sendo: anti-catalase (1:1000); anti-glutationa peroxidase (1:1000); anti-superóxido dismutase 1 (1:1000); anti-superóxido dismutase 2 (1:1000); anti-metaloproteinase 2 (1:1000); anti-NADPH oxidase 4 (1:1000); anti-Nrf2 (1:500); anti-SIRT1 (1:1000). O anticorpo constitutivo utilizado foi o anti-β actina (1:500) (Anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA).

Após este período de incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T, três vezes por 10 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário biotilado específico para cada anticorpo primário: anti-rabbit (1:1000), anti-mouse (1:1000) e antigoat (1:1000), por 60 minutos (25°C) sob agitação constante (anticorpos Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA). As membranas foram então novamente lavadas com TBS-T, três vezes por 10 minutos cada e incubadas com estreptavidina (1:1000), por 60 minutos sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T, três vezes por 10 minutos cada e para revelação foram tratadas com o kit de quimioluminescência (Amersham ECL Prime Western Blotting, GE Healthcare, UK) e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS+ de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria no software Adobe Photoshop CS6 (Adobe System Inc; CA).

3.13. Análise Estatística

Para comparar as diferenças entre os grupos experimentais, os resultados foram analisados por *one way analysis of variance* (ANOVA), com teste Tukey para todas as análises, sendo consideradas significativas as diferenças quando $P < 0,05$. Para a geração dos gráficos e para realizar as análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos no Peso, Ingestão Calórica e Marcadores Metabólicos

No início do estudo (momento zero), não havia diferença estatística entre o peso dos animais. Com as diferentes dietas ofertadas e separação entre grupos, houve aumento do peso médio dos animais com dieta hiperlipídica, onde já se pode observar aumento significativo de 12% na 5ª semana e 40% na 8ª semana em comparação ao grupo Controle ($P < 0,05$, Figura 5). Ao final das 12 semanas, observaram-se aumentos de 54% do peso médio do grupo HF12, 28% do HF+ASE e 31% do HF+ROSU em relação ao Controle ($P < 0,05$, Figura 5). No entanto, com os tratamentos o peso dos grupos HF+ASE e HF+ROSU foram respectivamente 17% e 15% menores do que do grupo HF12, mostrando que os tratamentos com ASE e ROSU foram capazes de reduzir o ganho de peso dos animais ao longo dos tratamentos, mesmo que ainda submetidos à dieta hiperlipídica ($P < 0,05$, Figura 5).

A ingestão calórica diária média das 12 semanas foi calculada para cada animal. Os animais dos grupos HF12, HF+ASE e HF+ROSU ingeriram respectivamente 57%, 41% e 38% mais calorias em média do que os animais do grupo Controle ($P < 0,05$, Tabela 3), porém, sem diferença estatística entre si.

Os grupos não apresentaram diferença estatística de glicemia inicial (momento zero). Porém, após oito semanas de dieta hiperlipídica, antes de iniciar os tratamentos a glicemia avaliada nestes animais foi 39% maior em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$, Tabela 3). O tratamento de quatro semanas com ASE reduziu a glicemia a níveis não estatisticamente diferentes do Controle e 33% menores que o grupo HF12. O tratamento com a ROSU, no entanto, não foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos nos animais HF+ROSU, que tiveram valores estatisticamente semelhantes aos do grupo HF12 (Tabela 3).

Os grupos HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU apresentaram um aumento nos níveis de colesterol total (58%, 148%, 54%, 91%, respectivamente) quando comparados ao grupo Controle ($P < 0,05$, Tabela 3). Entretanto, quando comparando ao grupo HF12, os tratamentos com ASE ou ROSU reduziram o colesterol total destes grupos em 37% e 22%, respectivamente ($P < 0,05$, Tabela 3). Não houve diferença estatística entre os grupos HF8, HF+ASE e HF+ROSU.

Comparando ao grupo Controle, os níveis de TG foram maiores no grupo HF8 (104% maior) e HF12 (98% maior), assim como os níveis de LDL, que foram 243% e 308% maiores, respectivamente. Quanto aos efeitos dos tratamentos sobre os níveis de TG, o grupo HF+ASE teve redução de 38% em relação a HF8 e de 36% em relação a HF12, ao passo que HF+ROSU teve TG 52% mais baixo que HF8 e 51% mais baixo que HF12 ($P < 0,05$, Tabela 3).

O tratamento com ASE resultou na redução de 64% dos níveis de LDL em relação a HF8 e de 72% em relação a HF12. Já o tratamento com ROSU resultou na redução de 71% dos níveis de LDL em relação a HF8 e de 77% em relação a HF12 ($P < 0,05$, Tabela 3).

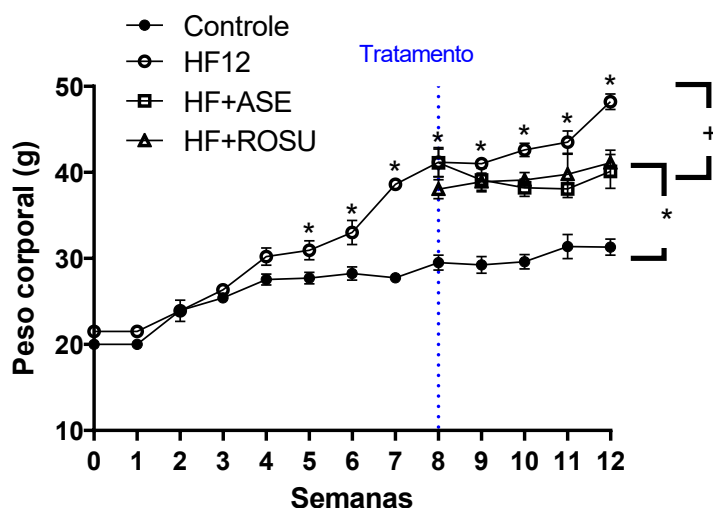


Figura 5 - Peso médio dos grupos Controle, HF12, HF+ASE e HF+ROSU.

Nota: Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão, $n = 15$ para todos os grupos. * $P < 0,05$ em relação aos grupos Controle e + $P < 0,05$ em relação ao grupo HF12. A linha pontilhada azul corresponde ao início do tratamento com ASE e ROSU.

Tabela 3 - Parâmetros metabólicos dos grupos Controle, HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU.

Parâmetro	Tempo	Controle	HF8	HF12	HF+ASE	HF+ROSU
Ingestão calórica (kcal)	<i>total (média)</i>	13,59 ± 0,24	-	21,35 ± 0,15 *	19,28 ± 0,63 *	18,77 ± 1,68 *
Glicemia (mg/dL)	<i>inicial</i>	127,62 ± 3,96	-	119,73 ± 9	-	-
	<i>pré-tratamento</i>	131 ± 6,8	-	182 ± 3,9 *	-	-
	<i>final</i>	133,6 ± 9,3	-	217,6 ± 7,2 *	145,2 ± 3,98 +	216 ± 7,1 *\$
Colesterol Total (mg/dL)	<i>final</i>	100,3±5,1	158,7±4,6 *	249,0±15,0 *#	155,2±13,4 **	192±15,8 **
Triglicerídeos (mg/dL)	<i>final</i>	34,3±3,5	70,2±2,2 *	68,0±7,7 *	43,25±6,2 +#	33,7±4,0 +#
LDL (mg/dL)	<i>final</i>	142,9±56,9	346,1±76,9*	440±13,8 *	123±37,7+##	99,2±37,3 +#

Legenda: Valores estão expressos como média ± erro padrão, n=15 para todos os grupos. *p < 0,05 em relação ao grupo C, +p < 0,05 em relação ao grupo HF.

Nota: Valores de glicemia inicial, glicemia pré-tratamento, glicemia final, níveis plasmáticos de colesterol total final, triglicerídeos final e LDL final dos grupos Controle, HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU. Valores estão expressos como média + erro padrão, n=15 para as glicemias de todos os grupos, n=6 para colesterol total, triglicerídeos e LDL de todos os grupos. *p < 0,05 em relação ao grupo Controle, +p < 0,05 em relação ao grupo HF12, #p < 0,05 em relação ao grupo HF8, \$p < 0,05 em relação ao grupo HF+ROSU.

4.2. Efeitos na Estrutura do Ventrículo Esquerdo

Foi calculada a razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia e os grupos HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU tiveram esta razão maior que o grupo controle (22%, 32%, 20% e 16%, respectivamente). Entretanto, o grupo HF+ROSU teve esta razão estatisticamente menor (12%) que o grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 6).

Os grupos HF8 e HF12 desenvolveram aumentos da espessura da PL do VE em relação ao grupo Controle de 27% e 33%, respectivamente ($P < 0,05$, Figuras 6 e 7). Os grupos HF+ASE e HF+ROSU tiveram aumentos de 27% e 35% em relação ao Controle, respectivamente ($P < 0,05$, Figuras 6 e 7). Embora os tratamentos não tenham mudado estatisticamente os valores de espessura da PL, nota-se que o tratamento com ASE ocasionou um menor aumento deste parâmetro, ainda que não significativo estatisticamente, com valores semelhantes aos do grupo HF8.

Em relação ao SIV, todos os grupos com dieta hiperlipídica (HF8, HF12, HF+ASE e HF+ROSU) tiveram a espessura maior que do grupo Controle, sendo 13% maior no grupo HF8, 22% no HF12 e 12% nos grupos HF+ASE e HF+ROSU. Os tratamentos com ASE e ROSU evitaram a progressão da hipertrofia do SIV, pois reduziram 8,5% e 5,1% em relação ao grupo HF12, respectivamente ($P < 0,05$, Figuras 6 e 7), ficando nos mesmos patamares ($\pm 1\%$) do grupo HF8.

Analizando o diâmetro do lúmen do VE, não foi observado aumento do grupo HF8 em relação ao grupo Controle, no entanto, houve aumento desse parâmetro nos grupos HF12, HF+ASE e HF+ROSU, sendo 38%, 36% e 26% maiores que o controle, respectivamente ($P < 0,05$, Figuras 6 e 7). Os tratamentos não alteraram esse parâmetro quando comparados ao grupo HF12.

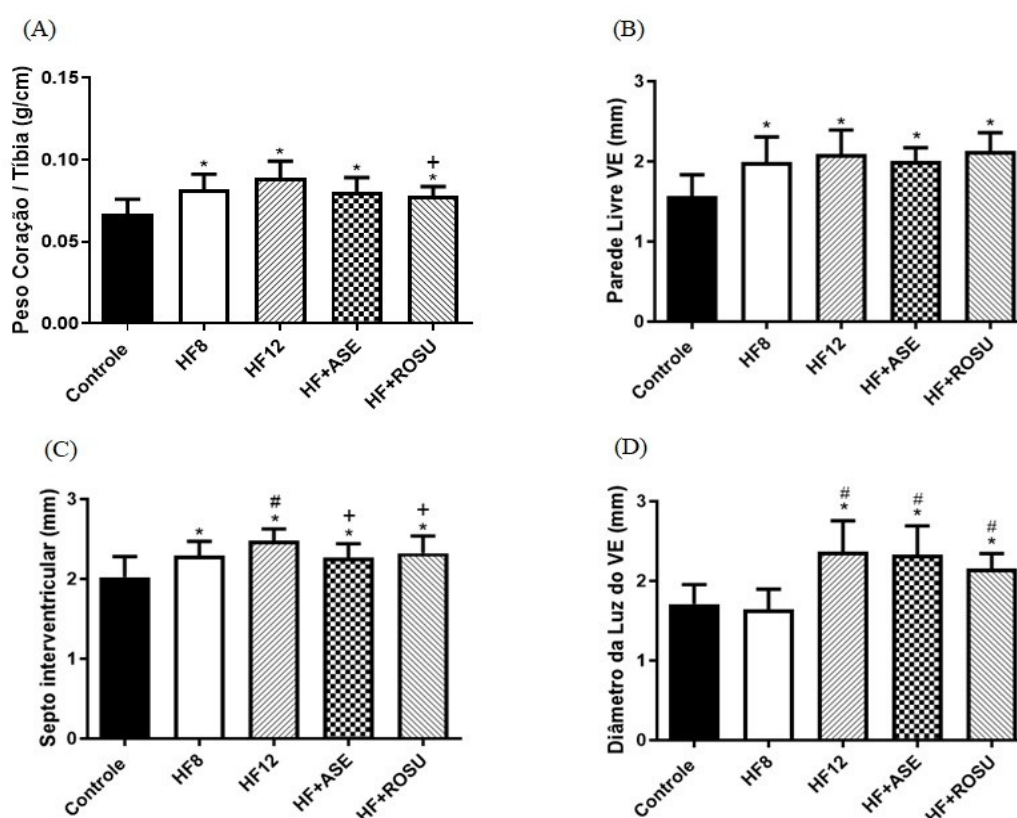


Figura 6 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU no peso do VE (A), na espessura da parede livre do VE (B), na espessura do septo intraventricular (C) e no diâmetro do lúmen do VE (D).

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle; + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12; # $p<0,05$ em relação ao grupo HF8.

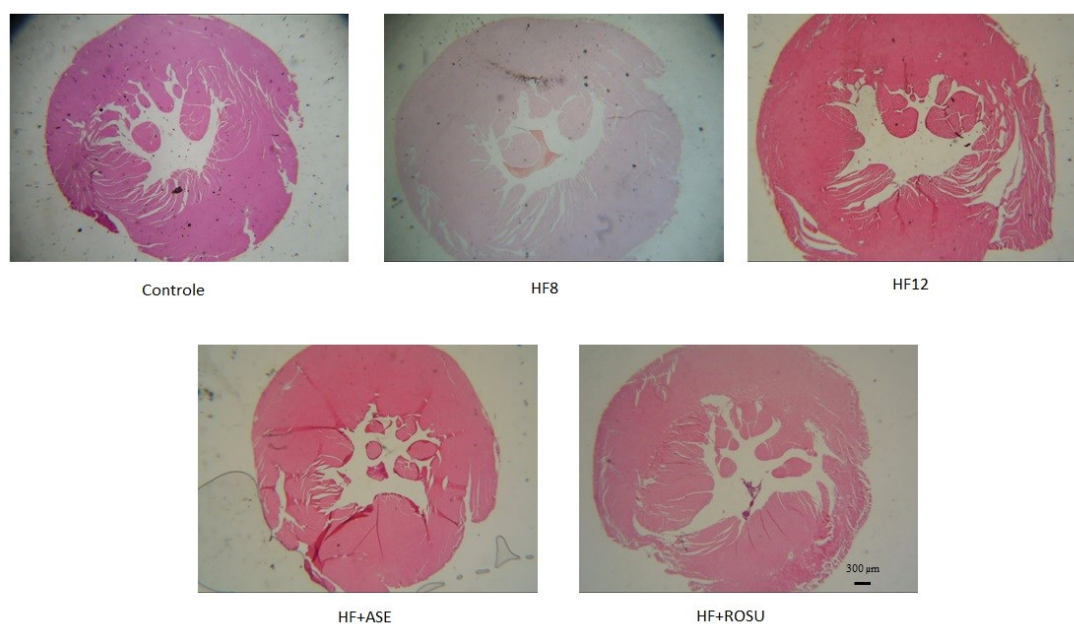


Figura 7 - Imagens representativas do ventrículo esquerdo.

Legenda: Fotomicrografias com imagens representativas do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina e eosina. Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 2X).

4.3. Efeitos na Expressão de Proteínas do Coração

Foi observada menor expressão do fator de transcrição Nrf2 no grupo HF12 (-33%) em relação ao grupo Controle e, nos grupos HF+ASE e HF+ROSU, a expressão de Nrf2 também foi reduzida em relação ao Controle (-15% e -16%, respectivamente), porém, nestes grupos tratados, a expressão foi em média 20% maior que no grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 8).

Quanto à expressão da SIRT1, o grupo HF12 teve uma diminuição de 42% na expressão desta proteína, quando comparada ao grupo Controle ($P < 0,05$, Figura 8). Já os grupos HF+ASE e HF+ROSU não demonstraram diferença estatística em relação ao grupo controle. Sendo assim, os tratamentos foram capazes aumentar as expressões de SIRT1 em HF+ASE (+51%) e em HF+ROSU (+54%) quando comparados ao grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 8).

Estes dados em conjunto indicam que a dieta hiperlipídica utilizada com este modelo influencia negativamente na expressão destas proteínas e ambos os tratamentos são capazes de melhorar os níveis das mesmas, apresentando importante efeito terapêutico.

Quanto à avaliação da expressão das enzimas antioxidantes, não foi observada diferença entre os grupos para as enzimas SOD1 e SOD2. O resultado das análises da enzima CAT, mostrou que esta enzima teve uma diminuição de 23% no grupo HF12 em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$), e que os grupos HF+ASE e HF+ROSU tiveram aumento de 44% e 45%, respectivamente, ao comparar ao grupo HF12, deixando-os em níveis semelhantes ao grupo controle ($P < 0,05$, Figura 9). A expressão da GPx do grupo HF12 demonstrou forte tendência à diminuição em relação aos demais grupos, porém esta diferença não alcançou significância estatística, com exceção do grupo HF+ASE, que apresentou maior expressão (+54%) da GPx do que o grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 9).

Ao analisar as expressões das enzimas MMP2 e NOX4 no coração destes animais, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos, para nenhuma das duas enzimas, mostrando que as dietas e tratamentos não exerceram influencia neste parâmetro durante este período (Figura 10).

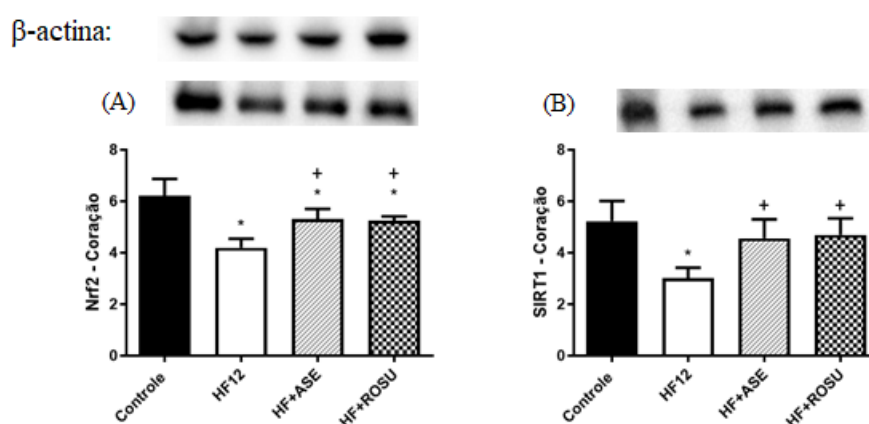


Figura 8 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão de Nrf2 (A) e de SIRT1(B), no coração.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle e + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12.

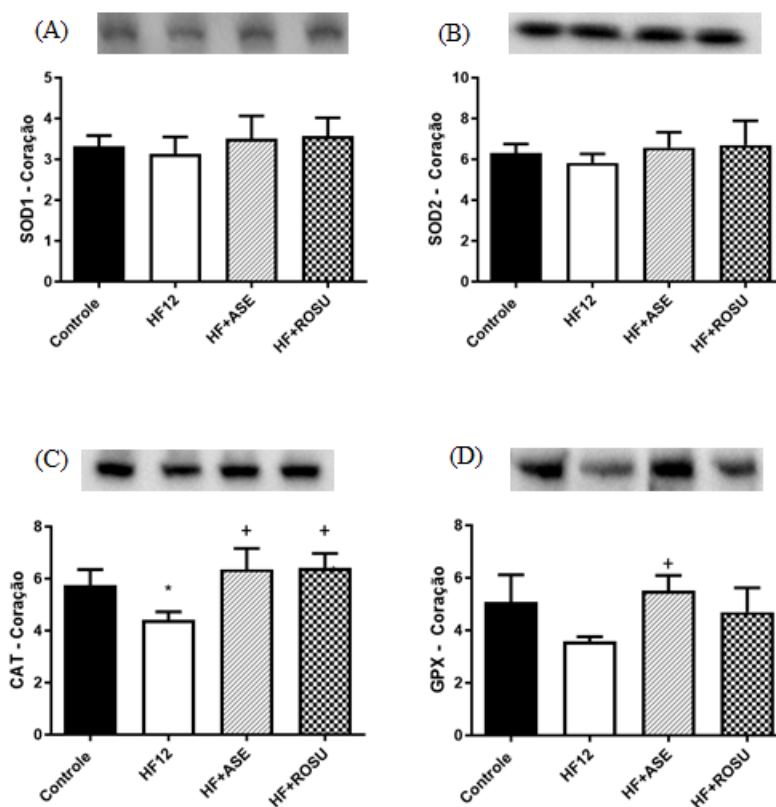


Figura 9 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 (A), SOD2 (B), CAT (C) e GPx (D), no coração.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle e + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12.

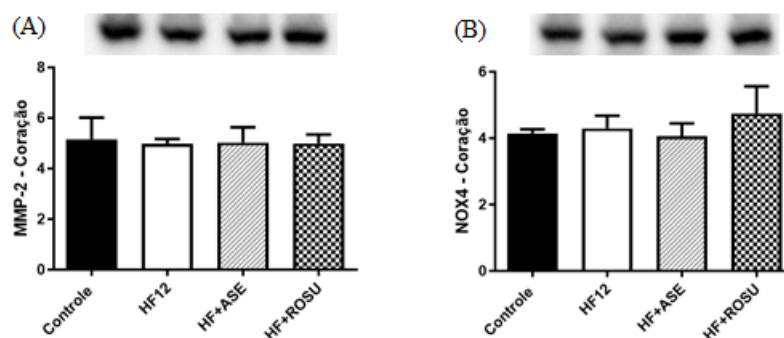


Figura 10 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão da enzima MMP2 (A), e NOX4 (B), no coração.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n = 4$.

4.4. Efeitos na Atividade Antioxidante e Dano Oxidativo no Coração

A atividade da enzima SOD foi diminuída em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparada ao grupo controle, onde os grupos HF12, HF+ASE e HF+ROSU tiveram respectivamente 45%, 74% e 59% menor atividade desta enzima, sem diferença estatística entre eles ($P < 0,05$, Figura 11). O grupo HF12 teve tendência à diminuição da atividade da CAT em relação ao grupo controle, porém não estatisticamente diferente, ao passo que os grupos HF+ASE e HF+ROSU tiveram atividade da CAT 56% e 44% menores do que a do grupo controle, respectivamente. Quanto à atividade da enzima GPx, os grupos HF12 e HF+ROSU não foram estatisticamente diferentes do grupo controle. Já o grupo HF+ASE teve a atividade desta enzima 3.2 vezes maior que o controle, 6 vezes maior que HF12 e 3.3 vezes maior que HF+ROSU ($P < 0,05$, Figura 11). O dano oxidativo dosado pelo método TBARS não demonstrou diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 11).

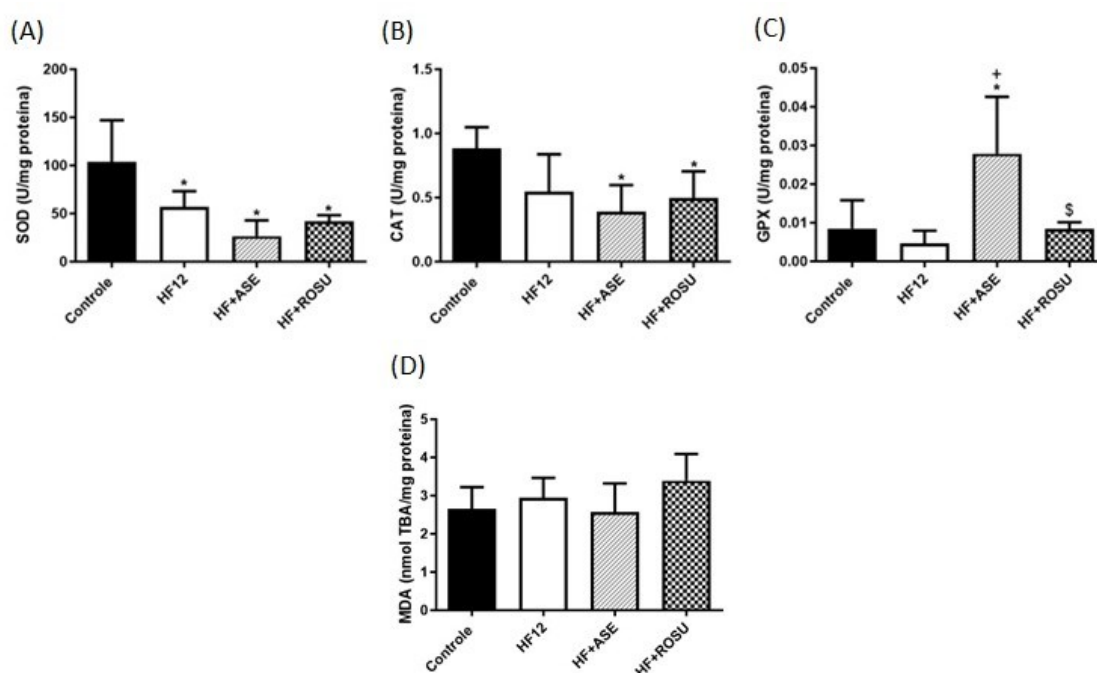


Figura 11 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B) e GPx (C), e sobre o dano oxidativo (D), no coração.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. (A) n Controle = 5, n HF12 = 8, n HF+ASE = 6, n HF+ROSU = 6. (B) n Controle = 6, n HF12 = 6, n HF+ASE = 6, n HF+ROSU = 5. (C) n Controle = 6, n HF12 = 5, n HF+ASE = 6, n HF+ROSU = 5. (D) n Controle = 6, n HF12 = 4, n HF+ASE = 6, n HF+ROSU = 8.

4.5. Efeitos na Estrutura da Aorta Torácica

A medida da túnica média da aorta torácica dos animais demonstrou que somente o grupo HF12 teve aumento da espessura da túnica média (14%) em relação ao Controle ($P < 0,05$, Figura 12). Ambos os grupos tratados apresentaram menor espessura da túnica média (HF+ASE em 15% e HF+ROSU em 20%) quando comparados ao grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 12). Os grupos HF8, HF+ASE e HF+ROSU foram estatisticamente iguais entre si e ao Controle ($P < 0,05$, Figura 12).

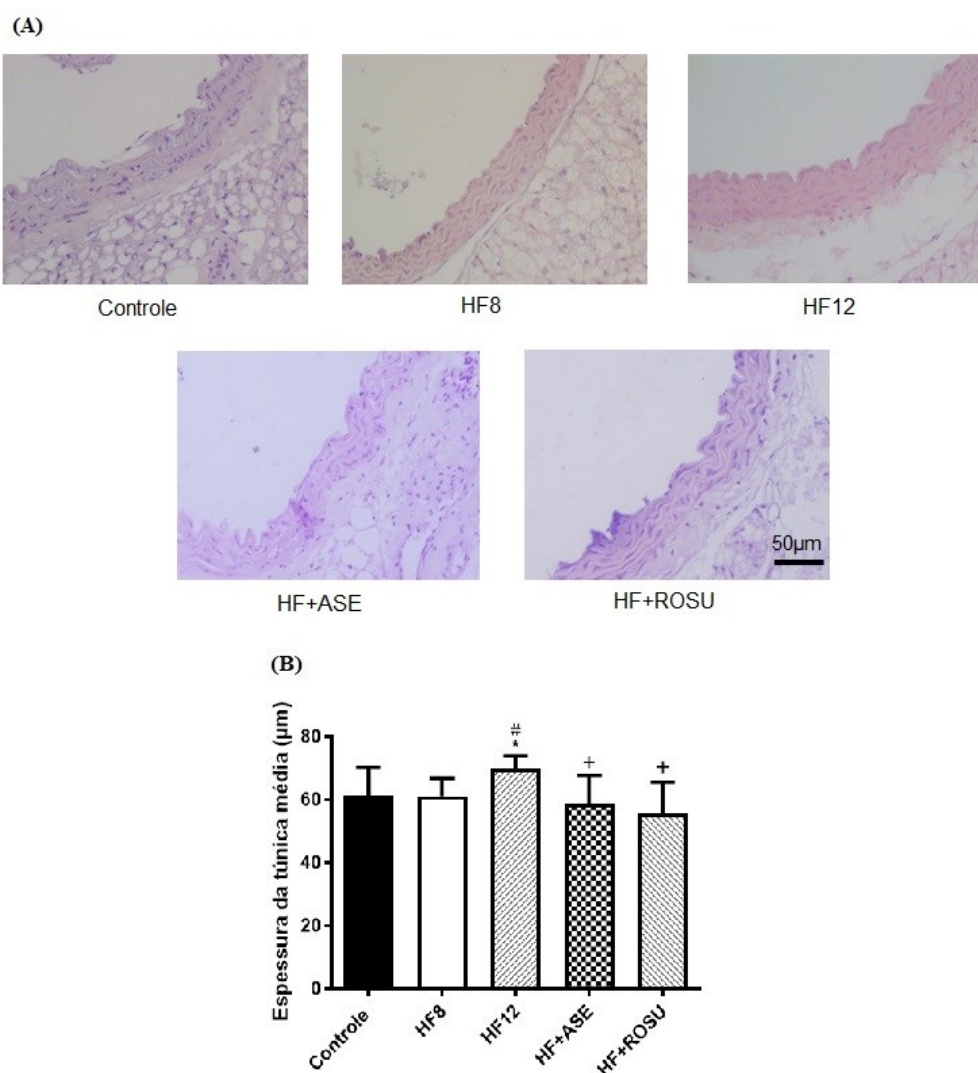


Figura 12 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica coradas com hematoxilina e eosina (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU na espessura da túnica média da aorta torácica (B).

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; + $p < 0,05$ em relação ao grupo HF12; # $p < 0,05$ em relação ao grupo HF8.

Em relação à deposição de colágeno nas aortas, houve diferença estatística na marcação por picosirius red em relação ao grupo Controle, somente no grupo HF12, que foi 40% maior ($P < 0,05$, Figura 13). Os tratamentos com ASE e ROSU promoveram menor deposição de colágeno (41% e 40%, respectivamente), quando comparados ao grupo HF12. Não houve diferença significativa entre os grupos HF8, HF+ASE e HF+ROSU ($P < 0,05$, Figura 13).

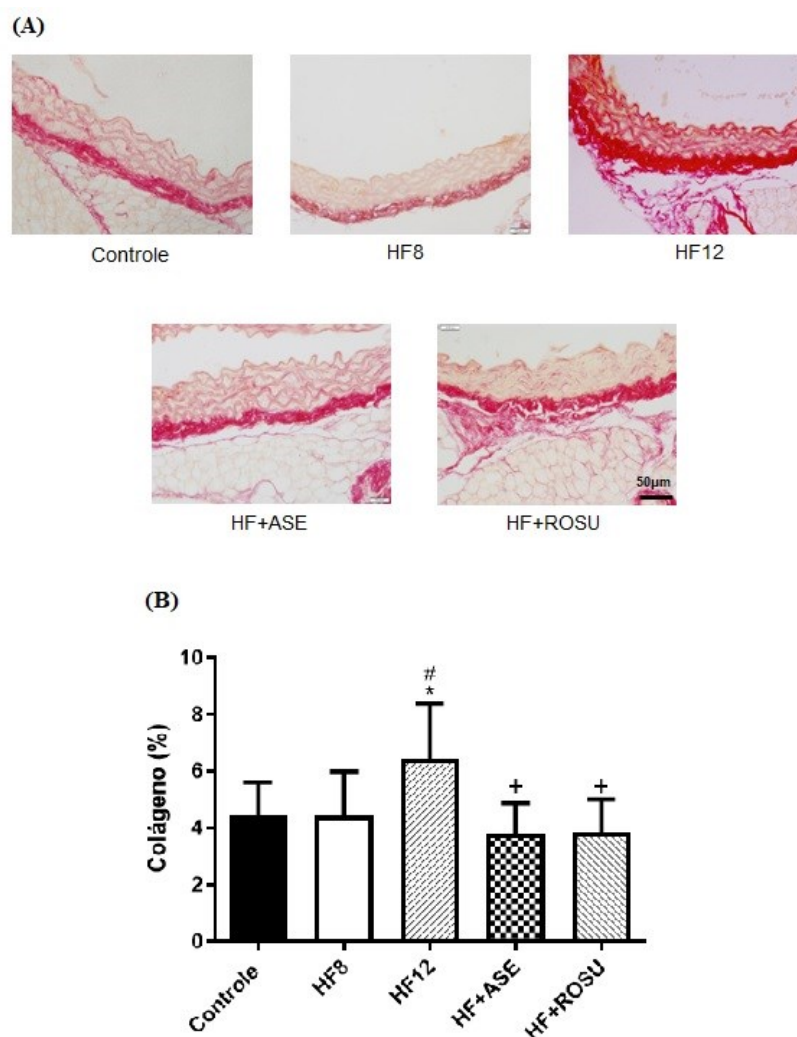


Figura 13 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica coradas com picosirius red (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a deposição de colágeno na aorta torácica (B).

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; + $p < 0,05$ em relação ao grupo HF12; # $p < 0,05$ em relação ao grupo HF8.

4.6. Efeito na Expressão de Proteínas da Aorta Torácica

A expressão do fator de transcrição Nrf2 na aorta foi 37% menor no grupo HF12 comparado ao controle. Os grupos HF+ASE e HF+ROSU tiveram a expressão 75% e 60% maiores que o grupo HF12, respectivamente ($P < 0,05$, Figura 14). Foi observada uma redução na expressão da SIRT1 na aorta em todos os grupos com dieta hiperlipídica quando comparando ao grupo Controle, sendo 46% menor no HF12, 42% menor no HF+ASE e 54% menor no HF+ROSU ($P < 0,05$, Figura 14).

Quanto à avaliação da expressão das enzimas antioxidantes na aorta torácica, foi observada diferença somente para a enzima SOD1, onde os grupos HF12 e HF+ROSU apresentaram redução de 34% e 37%, respectivamente, quando comparados ao grupo Controle ($P < 0,05$, Figura 15). Não houve diferença estatística do grupo Controle para o grupo HF+ASE, que por sua vez foi 48% e 56% maior que os grupos HF12 e HF+ROSU, respectivamente ($P < 0,05$, Figura 15). Para as demais enzimas avaliadas, não houve diferença estatística entre os grupos.

A expressão da enzima MMP2 não foi estatisticamente diferente entre os grupos. A expressão da enzima NOX4 foi 54% maior no grupo HF12 em comparação ao controle, já os grupos HF+ASE e HF+ROSU não foram estatisticamente diferentes do controle. No grupo HF+ASE, no entanto, a expressão foi 35% menor que no grupo HF12 ($P < 0,05$, Figura 16).

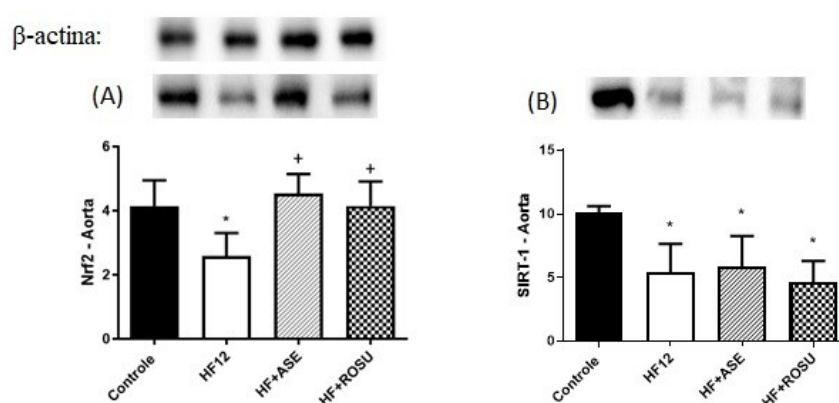


Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão de Nrf2 (A) e de SIRT1(B), na aorta torácica.

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, n=4. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo HF12.

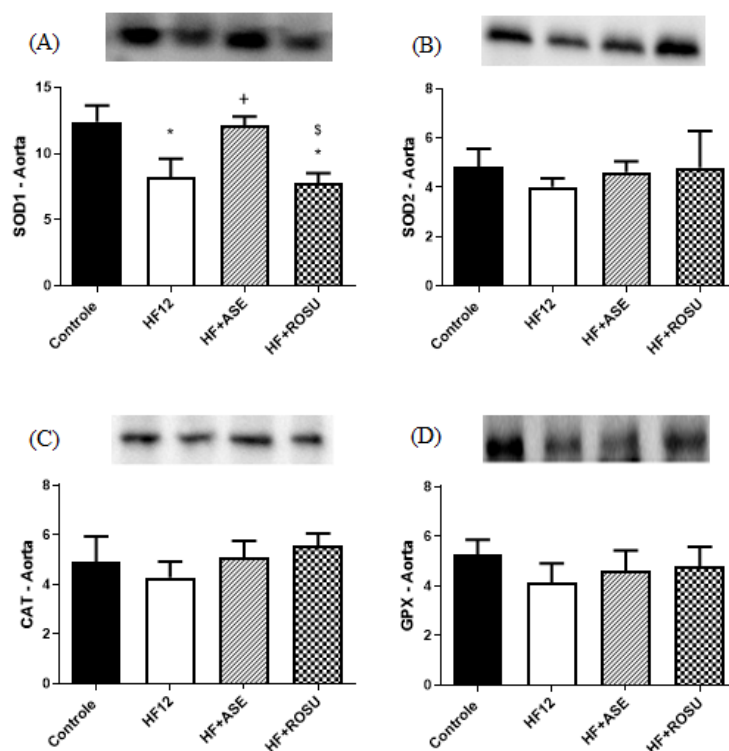


Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 (A), SOD2 (B), CAT (C) e GPx (D), na aorta torácica.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle, + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12 e \$ $p<0,05$ em relação ao grupo HF+ASE.

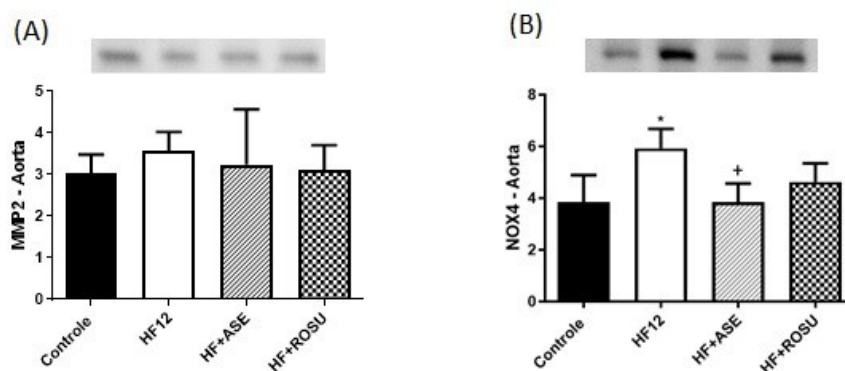


Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a expressão da enzima MMP2 (A), e NOX4 (B), na aorta torácica.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle, + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12 e \$ $p<0,05$ em relação ao grupo HF+ASE.

4.7. Efeitos na Atividade Antioxidante e Dano Oxidativo na Aorta Torácica

A enzima CAT no grupo HF12 teve tendência a menor expressão que o grupo controle, mas não chegou a ser significativamente menor. Já os grupos HF+ASE e HF+ROSU mostraram tendência ao aumento da atividade da CAT em relação ao controle e um aumento significativo em relação ao HF12, sendo 2,5 vezes maior no grupo HF+ASE e 3,2 vezes maior no grupo HF+ROSU ($P < 0,05$, Figura 17).

Comparando ao grupo controle, a enzima GPx teve atividade 68% menor no grupo HF12, 35% menor no HF+ASE e 39% menor no HF+ROSU. Os grupos tratados, no entanto, apresentaram maior atividade da GPx quando comparando ao grupo HF12, onde HF+ASE apresentou um aumento de 105% da atividade da enzima e o grupo HF+ROSU um aumento de 94% ($P < 0,05$, Figura 17).

Ao analisar peroxidação lipídica nas aortas, foi observado que em relação ao grupo Controle houve maior marcação de 8-isoprastano nos grupos HF8 (45%), HF12 (65%) e HF+ROSU (62%) ($P < 0,05$, Figura 18). Todavia, no grupo HF+ASE houve redução desta marcação, pois além de ter sido menor em relação aos grupos HF12 e HF+ROSU (37% e 36%, respectivamente), também foi 29% menor que HF8, não tendo valor estatisticamente diferente do grupo Controle ($P < 0,05$, Figura 18).

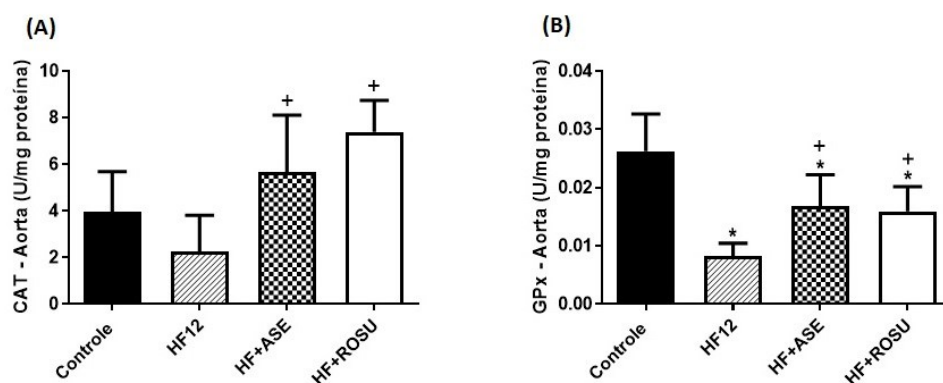


Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a atividade da enzima antioxidante CAT na aorta torácica.

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. n Controle = 4, n HF12 = 5, n HF+ASE = 8, n HF+ROSU = 6.

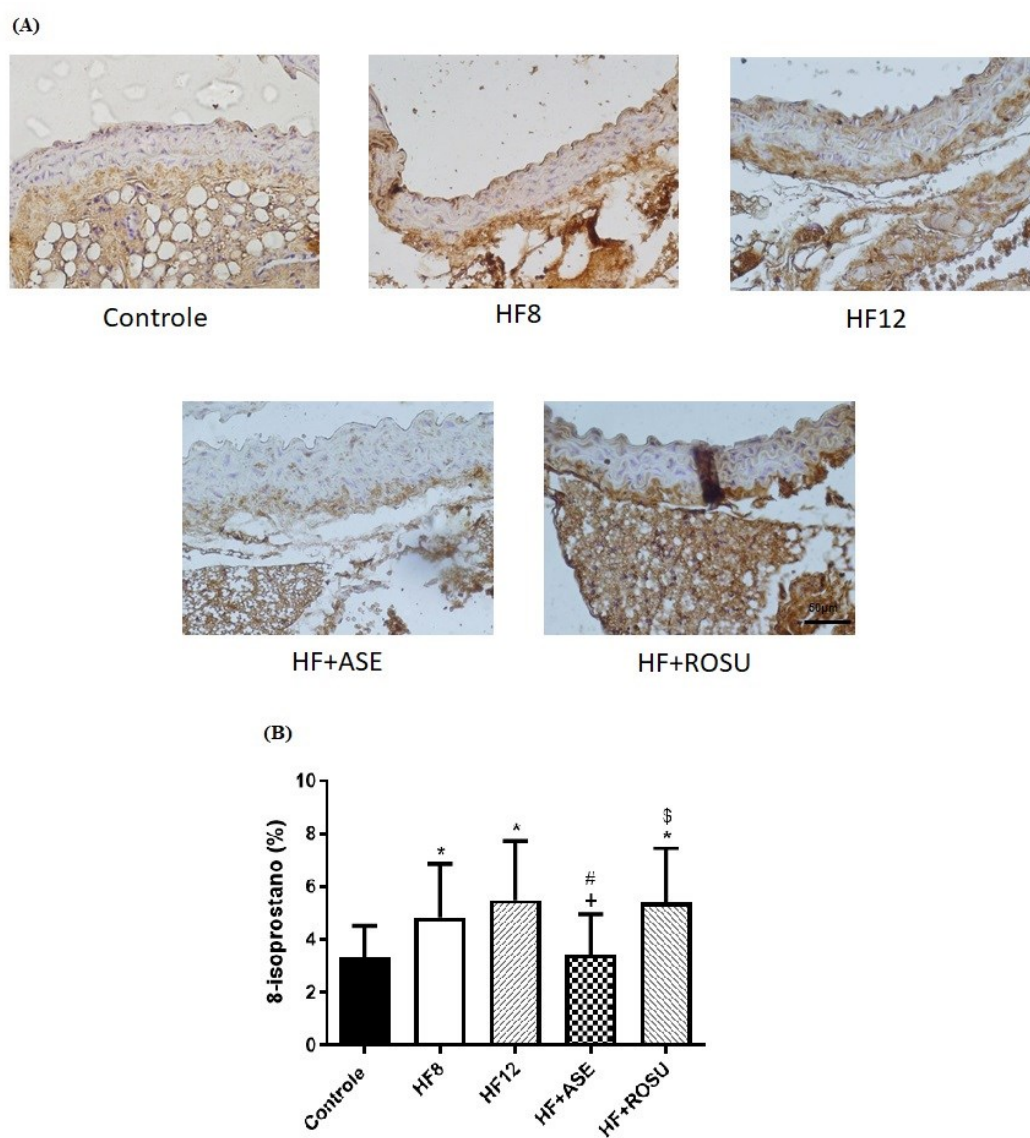


Figura 18 - Fotomicrografias com imagens representativas da aorta torácica marcadas com DAB (A). Mesma ampliação em todas as imagens (aumento de 40x). Efeito do tratamento com ASE e ROSU sobre a peroxidação lipídica na aorta torácica (B).

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=3$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos: * $p<0,05$ em relação ao grupo Controle; + $p<0,05$ em relação ao grupo HF12; # $p<0,05$ em relação ao grupo HF8; \$ $p<0,05$ em relação ao grupo HF+ASE.

5. DISCUSSÃO

Hoje é bem estabelecida a relação entre obesidade e DCV, tanto clinicamente quanto em modelos experimentais. A obesidade e dietas ricas em gorduras desencadeiam hiperlipidemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, DM tipo 2, hipertensão arterial, inflamação e lipotoxicidade, sendo estes considerados grandes fatores de risco para o remodelamento cardíaco (Van Gaal *et al.*, 2006; Gibb e Hill, 2018). O camundongo C57BL/6 é um ótimo modelo de estudo da obesidade induzido por dieta, sendo amplamente utilizado nos estudos que avaliam esta condição (Van Heek *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2012).

No estudo de Park e colaboradores (2005), camundongos da mesma linhagem alimentados por dieta com 55% das calorias proveniente de lipídeos por 3, 6 ou 20 semanas, também tiveram maiores ganhos de peso do que animais alimentados com dieta padrão. Este ganho de peso é uma tendência dessa linhagem de camundongos C57BL/6, quando alimentados por dietas hiperlipídicas, com 45% (Wang *et al.*, 2012), 55% (Park *et al.*, 2005) e, no nosso estudo, 60% das calorias provenientes de lipídeos. Notamos um ganho significativo de peso dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica a partir da 5ª semana, da mesma forma observada em Sánchez *et al.* (2018), com o mesmo modelo e proporção de lipídeos na dieta. Em nosso estudo, o grupo tratado com ASE apresentou uma evolução do peso corporal semelhante ao tratamento com ROSU, ambas estatisticamente menores que o grupo HF12. Este resultado vai de acordo com os resultados de Fraulob *et al.* (2012), onde camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (60% lipídeos) por 14 semanas, foram tratados com ROSU por 7 semanas e também observaram redução do ganho de peso.

Em nosso estudo, não houve diferença estatística da ingestão calórica entre todos os grupos com dieta hiperlipídica, sendo assim, a diferença no peso final entre estes grupos (tratados ou não) não foi ocasionada por menor ou maior ingestão calórica. Oliveira *et al.* (2010), utilizando o tratamento na mesma dosagem de ASE (300mg/kg), no mesmo modelo, de forma preventiva, também observaram o mesmo comportamento na evolução de peso, ou seja, menor ganho de peso do grupo tratado com ASE em comparação ao grupo não tratado. Nossos dados de peso corroboram os resultados encontrados por Oliveira *et al.* (2010), mesmo que iniciando o tratamento com ASE após oito semanas de dieta hiperlipídica. Isto demonstra o efeito terapêutico do ASE no

ganho de peso, em proporção semelhante à desempenhada pela ROSU, neste modelo de estudo.

É bem estabelecido que dietas hiperlipídicas ocasionam o desenvolvimento de hiperglicemia nos camundongos C57BL/6 (Calligaris *et al.*, 2013; Abdurrachim *et al.*, 2014). De fato, no presente estudo os animais HF8 e HF12 ficaram hiperglicêmicos. O efeito hipoglicemiante do ASE foi observado anteriormente em modelo de DM2 (De Bem *et al.*, 2018) e neste mesmo modelo, porém com o tratamento preventivo (Oliveira *et al.*, 2010). De Bem *et al.* (2018), analisando ratos wistar com DM2 induzido por dieta hiperlipídica e estreptozotocina, observaram que a associação do ASE ao exercício físico aeróbico promoveu uma redução da glicemia de forma mais eficaz do que o extrato ou o exercício isolados. Em estudos preventivos, onde a indução à hiperglicemia por dieta hiperlipídica e a administração de ASE eram iniciadas conjuntamente, ASE exerceu melhora da glicemia (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015). No presente estudo, avaliamos o efeito da administração do ASE após os animais já estarem hiperglicêmicos, como observado nos animais HF8, demonstrando também o efeito terapêutico na melhora da glicemia final.

A ROSU, por outro lado, nem sempre demonstra um desempenho favorável em relação à homeostasia da glicose e sensibilidade à insulina. Kostapanos *et al.* (2009) observaram que a administração de ROSU nas doses de 10, 20 e 40mg ao dia em humanos com hiperlipidemia primária foi associada a aumento dose-dependente de RI. No entanto, o estudo possui limitações como o design retrospectivo, observacional e pequena amostragem, além de curto período de observação. Em contrapartida, Fraulob *et al.* (2012) encontraram resultados benéficos na dinâmica da glicemia e insulina nos camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com ROSU 20mg/kg. Da mesma forma, Neto-Ferreira *et al.* (2013) observaram efeitos pleiotrópicos da ROSU, como na melhora dose-dependente da intolerância à glicose e na distribuição do tecido adiposo entre compartimentos subcutâneo e visceral, neste mesmo modelo de obesidade. Além disso, Naples *et al.* (2007) obtiveram achados semelhantes em hamsters com RI tratados com 10 mg/kg/dia de ROSU, por 10 dias. Em nosso estudo, entretanto, não observamos uma melhora significativa da glicemia pela ROSU.

Como a ROSU é um fármaco que melhora o perfil lipídico de forma geral, com diminuição de LDL, de colesterol total e de TG (Anderson *et al.*, 2016; Grundy e

Stone, 2018), encontramos em nosso estudo o resultado esperado na melhora destes três parâmetros nos animais tratados com a ROSU. Resultados bem semelhantes foram obtidos no grupo tratado com ASE. Este efeito do ASE no perfil lipídico foi demonstrado anteriormente em estudos preventivos (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015), onde a administração de ASE foi iniciada concomitantemente com a dieta hiperlipídica, porém, notamos agora um efeito terapêutico, ou seja, com o tratamento iniciado após os animais já estarem com o perfil lipídico alterado pela dieta, conforme observado no grupo HF8. Este fato é relevante, pois na rotina clínica os tratamentos costumam ser prescritos após o paciente já estar dislipidêmico. Conforme sugere o estudo de Oliveira *et al* (2015), o efeito do ASE na diminuição do colesterol pode se dar pelo aumento da excreção de colesterol e maior expressão de pAMPK no fígado, que modula negativamente a HMG-CoA redutase, enzima alvo da ROSU.

A obesidade ou dieta rica em lipídeos levam a níveis elevados de AGL circulantes e ao acúmulo excessivo de lipídios no miocárdio, gerando lipotoxicidade cardíaca, com inflamação e EOX, o que leva à HVE tanto em camundongos como em humanos (Liao, 2004; Van Gaal *et al.*, 2006; Abdurrachim *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015; Boardman *et al.*, 2017). No presente estudo, a razão peso do coração/comprimento da tíbia foi maior em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparando com o grupo controle. Já na 8ª semana de dieta hiperlipídica os animais do grupo HF8 apresentaram uma hipertrofia do SIV que se estendeu e agravou nos animais do grupo HF12. Os tratamentos com ASE e ROSU desempenharam uma melhora neste parâmetro, tendo menores espessuras do SIV do que a do grupo HF12.

O mesmo não ocorreu com as medidas da PL, aumentadas em todos os grupos de dieta hiperlipídica, e do lúmen do VE, aumentadas em todos com dieta hiperlipídica por 12 semanas, onde os tratamentos não desempenharam efeito durante o período avaliado. A obesidade ocasiona maior volume de sangue e já foi observado neste modelo que a dieta hiperlipídica e obesidade podem gerar um aumento da pressão arterial (Santos *et al.*, 2019). Estes fatores podem gerar um estresse pós-carga, o que poderia parcialmente explicar a dilatação da câmara do VE. Wang *et al.*, (2012) investigaram o papel da indução e redução da obesidade causada por dieta hiperlipídica na função e remodelamento cardíacos nos camundongos C57BL/6J, também

observando nos animais obesos um aumento da razão peso do coração/comprimento da tíbia e do diâmetro diastólico final do VE, além de demais parâmetros de função cardíaca alterados. Estas alterações, além de EOX e inflamação, foram atenuadas com a redução da obesidade, o que sugere que a perda de peso, por si só, já desempenhe algum papel na melhora destes parâmetros que costumam estar aumentados na obesidade. Em contextos semelhantes de C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica, foram também observados aumento da massa do VE (Costa *et al.*, 2011; Abdurrachim *et al.*, 2014) e aumento do tamanho do coração com espessamento do SIV e da PL, sem alteração do diâmetro interno do VE, constatando-se remodelamento cardíaco por hipertrofia concêntrica (Calligaris *et al.*, 2013). Já em Pereira-Silva *et al.* (2019), o efeito da dieta rica em lipídeos, sacarose e sódio nos C57BL/6 machos gerou hipertrofia do coração com dilatação do lúmen do VE, porém as espessuras do SIV e PL não foram alteradas por essa dieta. Em ratos obesos (dieta hiperlipídica 45% por 15 semanas) foram observadas anormalidades estruturais nos cardiomiócitos, alterações nas mitocôndrias, ausência ou desorganização dos miofilamentos, anormalidades no retículo sarcoplasmático e presença de grande quantidade de gotículas lipídicas entre as miofibrilas (Leopoldo *et al.*, 2010).

Moléculas com propriedades antioxidantes podem auxiliar na mitigação e no tratamento destes efeitos danosos ao coração que ocorrem na obesidade. No contexto de tratamento com compostos naturais, Zeng *et al.* (2015) observaram que curcumina suprimiu o remodelamento cardíaco causado por dieta hiperlipídica em camundongos, atribuindo este resultado às ações anti-inflamatória e antioxidante da curcumina. Bagul *et al.*, (2015) demonstraram que o resveratrol, um composto fenólico isolado, atenuou a hipertrofia cardíaca em ratos, induzida por dieta rica em frutose. É provável que o conteúdo de compostos fenólicos de ASE tenha desempenhado o efeito observado na atenuação da espessura do SIV, pois, além de ação antioxidante, estudos prévios com ASE demonstraram ação vasodilatadora e anti-inflamatória (Rocha 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Da Costa *et al.*, 2012; De Moura *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015), ações estas que influenciam de forma benéfica no remodelamento cardíaco adverso. Além disso, em ratos submetidos a infarto do miocárdio, o tratamento preventivo com ASE por 4 semanas evitou a hipertrofia cardíaca (Zapata-Sudo *et al.*, 2014). Agora observamos os efeitos do tratamento com ASE diretamente no remodelamento cardíaco, em contexto de obesidade induzida por dieta, onde por 4 semanas, ASE agiu terapeuticamente na

espessura do SIV, mas não nos demais parâmetros morfológicos avaliados durante este período.

No estudo de Wang *et al.* (2017) foi observado que ROSU pode agir de maneira benéfica na função e hipertrofia cardíacas, onde ratos induzidos à hipertensão e tratados com ROSU tiveram menor hipertrofia dos cardiomiócitos. Já Morimoto *et al.* (2015) relataram que tratamentos em humanos dislipidêmicos com ROSU ou Pitavastatina, não resultaram em melhora da disfunção diastólica, que é uma condição relacionada à hipertrofia e fibrose no miocárdio. Outros estudos, no entanto, relatam benefício de estatinas no remodelamento cardíaco em roedores (Takemoto *et al.*, 2001; Hermida *et al.*, 2013), em cães (Zacà *et al.*, 2007; Zacà *et al.*, 2012) e em humanos (Lee *et al.*, 2002). É sugerido que os mecanismos através dos quais as estatinas desempenham este efeito seja parcialmente por ação antioxidante e anti-inflamatória, envolvendo a inibição da geração de EROs e de TNF- α (Takemoto *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Liao, 2004; Zacà *et al.*, 2007; Zacà *et al.*, 2012). Além disso, outros efeitos da ROSU não ligados ao metabolismo de lipídeos, como o aumento de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), contribuindo para a angiogênese e melhora da função endotelial, podem contribuir para os efeitos inibitórios de hipertrofia cardíaca e melhora da função do VE (Liao, 2004; Erbs *et al.*, 2011; Zacà *et al.*, 2012).

No grupo HF+ASE a expressão de Nrf2 no coração foi maior que no grupo HF12. Foi demonstrado que o açaí ocasiona aumento da expressão de Nrf2 em astrócitos, *in vitro* (Ajit *et al.*, 2016) e no hipocampo e cortex frontal de ratos (Poulose *et al.*, 2017). Ainda, Soares *et al.* (2020) viram que a expressão de Nrf2 foi aumentada no músculo esquelético de ratos submetidos a exercício aeróbico associado ao ASE. Em nosso estudo também foi observada a maior ativação de Nrf2 no coração pelo tratamento com ROSU. Wang *et al.* (2017) sugerem que a melhora da hipertrofia cardíaca ocasionada pela ROSU é parcialmente mediada pela via do Nrf2. A ativação da via do Nrf2 é relacionada ao aumento da capacidade antioxidante intracelular e regulação de enzimas de fase II, que detoxificam xenobióticos, tornando-os mais hidrofílicos (Ma, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Tonelli *et al.*, 2018). Polifenóis são metabolizados como xenobióticos e exercem efeito hormético, ativando a via do Nrf2 que influencia positivamente a produção de uma gama de enzimas e moléculas antioxidantes (Sandoval-Acuña *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2019; González-Paramás *et al.*, 2020), como a síntese e manutenção dos níveis de GSH e da enzima GPx (Ma,

2013; Tonelli *et al.*, 2018). Em nosso estudo, tanto a atividade quanto a expressão da enzima GPx no coração foram maiores no grupo HF+ASE, o que reforça a hipótese de que os efeitos desempenhados pelo ASE no coração estejam parcialmente relacionados a sua ação antioxidante, e que esta ação seja parcialmente mediada pela via do Nrf2.

Estudos prévios que também analisaram o efeito do ASE na atividade e na expressão das enzimas antioxidantes aqui avaliadas, SOD, CAT e GPx, obtiveram resultados diversificados a depender do tecido e contexto. No modelo de ratos 2K-1C, ASE promoveu o aumento da atividade das 3 enzimas SOD, CAT e GPx nos rins e no LAM, assim como aumento da expressão de SOD1 e SOD2 no LAM, mas no rim somente aumentou a expressão da SOD1 (Da Costa *et al.*, 2012; Da Costa *et al.*, 2017). No tratamento de C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica, também houve aumento da atividade destas 3 enzimas no fígado (Oliveira *et al.*, 2015), porém, no tecido adiposo visceral, somente SOD e GPx tiveram suas atividades aumentadas, mas não a CAT (Santos *et al.*, 2020). Já De Moura *et al.* (2012), analisando os pulmões dos C57BL/6 com inflamação induzida por fumaça de cigarro e tratados por ASE, notou a diminuição da atividade das 3 enzimas (SOD, CAT e GPx). Nossos resultados mostram que nos casos onde a dieta hiperlipídica não gerou diminuição da expressão de enzimas, o tratamento também não exerceu influência sobre as mesmas, com exceção da expressão de GPx no coração, porém, apesar do HF12 ter apresentado tendência à diminuição, a diferença não chegou a ser estatística e, comparativamente, o HF+ASE demonstrou aumento. Nos casos onde a dieta influenciou negativamente a expressão enzimática, como a CAT e uma tendência à diminuição da GPx, ambos os tratamentos atuaram impedindo a diminuição da CAT e o tratamento com ASE ocasionou maior expressão da GPx, comparando ao grupo HF12.

Considerando que a degradação de peróxidos através de enzimas como a GPx (que estava aumentada em nosso estudo) seja um dos mecanismos pelos quais a via do Nrf2 influencia a homeostase de EROs e ERNs, além da síntese de agentes redutores (como GSH e NADPH) e da regeneração de moléculas oxidadas, (exemplo: GSSG é reduzida pela GSR) (Ma, 2013; Tonelli *et al.*, 2018), é plausível inferir que mesmo com a diminuição das atividades da SOD e CAT observadas no presente estudo, o aumento da atividade da GPx, assim como o aumento da expressão de GPx e de CAT em relação ao HF12, possam ter contribuído para os resultados benéficos de ASE em relação ao HF12, efeitos estes associados à ação antioxidante. Além disso, polifenóis podem

também exercer ação antioxidante diretamente na mitocôndria, independente da atividade das enzimas aqui avaliadas (Sandoval-Acuña *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2019). Ademais, Schaus *et al.* (2006) demonstraram que o fruto de *Euterpe oleraceae* exibiu notável capacidade antioxidante sobretudo de superóxido, a ERO neutralizada pela SOD, além de capacidade antioxidante contra o radical hidroxil, uma ERO extremamente reativa, e também contra a ERN, peroxinitrito. Somado a isso, Rodrigues *et al.* (2006) também demonstrou a capacidade antioxidante a estas espécies reativas ao avaliar um extrato alcoólico feito com o caroço do açaí. Sendo assim, tanto a polpa quanto extrato do caroço do açaí demonstram atividade antioxidante *scavenger*, o que aumenta a capacidade antioxidante do organismo independente das ações antioxidantes enzimáticas. Isso pode ter contribuído para os efeitos benéficos observados no presente estudo, mesmo com diminuição da atividade de algumas enzimas antioxidantes.

Neste estudo, não observamos diferença significativa entre os grupos no dano oxidativo medido pelos níveis de MDA no coração. Isso vai de acordo com os achados de Cordeiro *et al.* (2015) que, apesar de também não terem encontrado diferença nos níveis de MDA no coração (em modelo SHR), observaram diferença na carbonilação de proteínas, uma outra medida de dano oxidativo, porém em proteínas, não avaliada no presente estudo.

A SIRT-1 também influencia na capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Bonda *et al.*, 2011; Bagul *et al.*, 2015; D'Onofrio *et al.*, 2018; Alegre *et al.*, 2020). Ambos os tratamentos com ASE e ROSU promoveram maior expressão de SIRT-1 no coração, quando comparado ao grupo HF12. Este resultado é coerente com resultados encontrados na literatura, onde nota-se que o polifenol resveratrol, ao ativar mais a SIRT-1 promove maior desacetilação do complexo NF-kB, atenuando inflamação, EOX e a hipertrofia cardíaca (Bagul *et al.*, 2015). Além disso, SIRT-1 interage com FOXO1, aumentando expressão gênica de CAT (Alcendor *et al.*, 2007; Alegre *et al.*, 2020), o que é coerente com nosso resultado de maior expressão da CAT no coração, por ambos os tratamentos. Soares *et al.* (2020) avaliou o efeito de ASE no músculo esquelético de ratos submetidos a exercício aeróbico e também observou maior expressão de SIRT-1. Vale também ressaltar que no estudo de Alcendor *et al.* (2007) foi observado que um aumento leve a moderado da expressão de SIRT-1 em corações de camundongos adultos foi associada a diminuição de hipertrofia cardíaca, porém, quando esta superexpressão foi muito elevada, foi associada a situações patológicas como EOX.

Uma superexpressão ainda maior aumentou a hipertrofia e diminuiu a função cardíaca, estimulando assim o desenvolvimento de cardiomiopatia. Concluindo, sugeriram que a expressão leve a moderada de SIRT-1 retarda o envelhecimento do coração, ao passo que uma expressão muito alta induz cardiomiopatia (Alcendor *et al.*, 2007).

O resultado do tratamento com ROSU em nosso estudo está de acordo com os achados de Liu *et al.* (2019) que analisaram a expressão da SIRT-1 nos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica e também acharam menor expressão desta proteína, com maior expressão no grupo tratado com Atorvastatina que, apesar de diferente de ROSU, é também uma estatina e apresenta o mesmo mecanismo de ação. Em estudos avaliando o efeito da ROSU sobre a expressão de SIRT-1 *in vitro* (Lin *et al.*, 2014) e no tecido adiposo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (De Las Heras *et al.*, 2013), também foi observada a maior expressão de SIRT-1.

A expressão das enzimas MMP-2 e NOX4 no coração não foram diferentes entre os grupos. Como no presente estudo a dieta hiperlipídica não alterou as expressões de MMP-2 e NOX4 no coração, os tratamentos com ASE e ROSU também não exerceram influencia sobre elas. Todavia, de acordo com estudos que avaliaram os efeitos de ASE sobre a expressão dessas enzimas (Da Costa *et al.*, 2012), é plausível especular que em modelos onde as expressões destas encontram-se alteradas, ASE possa modulá-las. Ainda, Da Costa *et al.* (2012) encontrou maior atividade da enzima MMP-2 no LAM de ratos hipertensos (2K-1C). O tratamento com ASE reduziu essa atividade nos animais hipertensos, mas não exerceu influência nos animais normotensos. É possível também que a dieta hiperlipídica e EOx, apesar de não terem afetado a expressão, possam ter aumentado a atividade da enzima MMP-2 e de outras metaloproteinases da MEC do coração. De fato, Silva-Bertani *et al.* (2020) viram que ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica tiveram aumento da atividade de MMP-2 no miocárdio, o que foi relacionado com o aumento de leptina nestes animais obesos, relação esta que também foi confirmada por Schram *et al.* (2010) *in vitro*. Em Hermida *et al.* (2013), ao observarem que ROSU atenuou a ativação de MMP-1, uma outra metaloproteinase presente no coração, ressalta-se que não se pode excluir o fato de que outras metaloproteinases também influenciem no remodelamento cardíaco e que, inclusive, possam ser moduladas por ROSU. No entanto, no contexto do presente estudo, não observamos modulação da expressão de MMP-2 pela ROSU, ao menos quando a expressão desta enzima não foi alterada pela dieta hiperlipídica.

A dieta hiperlipídica por 12 semanas, mas não por 8 semanas, causou remodelamento da aorta torácica, com aumento da espessura da túnica média e da deposição de colágeno. Estes dados corroboram dados encontrados na literatura, demonstrando que a dieta hiperlipídica promove estas mudanças estruturais na aorta deste modelo, onde a inflamação tem papel fundamental (Abdurrachim *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2014; Krueger *et al.*, 2017). O tratamento com ASE melhorou estes parâmetros, o que é coerente com estudos onde, apesar de modelos diferentes, o ASE foi capaz de melhorar o remodelamento vascular no LAM (Da Costa *et al.*, 2012) e maior deposição de colágeno nos rins (Da Costa *et al.*, 2017) e no coração (Zapata-Sudo *et al.*, 2014). Nossos resultados do grupo HF+ROSU também são coerentes com outros estudos onde ROSU, embora em modelo diferente, atenuou o remodelamento da aorta (Lv *et al.*, 2020) e a deposição de colágeno (Hermida *et al.*, 2013). A aorta pode adaptar-se mecanicamente à elevação da pressão arterial, mas quando há inflamação acentuada, pode levar a um remodelamento adverso persistente, caracterizado principalmente por fibrose envolvendo a MEC. Essa fibrose parece ocorrer por meio de um aumento acentuado na taxa de deposição de colágeno sem um acompanhamento compensatório da taxa de degradação do mesmo (Latorre *et al.*, 2019). Controlar a inflamação, portanto, parece ser chave para a redução do remodelamento e deposição de colágeno desregulada.

De forma semelhante à observada no coração, ambos os tratamentos também levaram à maior expressão de Nrf2 na aorta quando comparado ao grupo HF12, porém, não foram diferentes do grupo controle. Isto pode parcialmente explicar os dados obtidos sobre a estrutura da aorta, visto que esta é influenciada pelo EOx. Foi observado que Atorvastatina induz nos vasos de murinos uma elevação de Heme Oxigenase 1 (HO-1), uma enzima antioxidante cujos níveis estão relacionados à via do Nrf2 (Ali *et al.*, 2009). Ainda, Kopacz *et al.* (2020) verificaram que Sinvastatina evitou a diminuição de Nrf2 em aorta abdominal de camundongos C57BL/6 e que isso ajudou a evitar aneurisma na aorta abdominal. É bem descrito que ROSU desempenha ação anti-inflamatória e antioxidante (Davignon, 2004; Lv *et al.*, 2020). Somando estes achados aos nossos resultados, é plausível sugerir que ROSU também evite o EOx na aorta torácica a partir da via do Nrf2.

Observamos agora este efeito na aorta também mediado por ASE. Como as EROs na vasculatura levam ao aumento da proliferação e migração celular, com

inflamação e alterações na MEC, onde todos estes fatores podem levar à hipertrofia e remodelamento vascular (Schulz *et al.*, 2011), a maior ativação de Nrf2 pelo ASE pode parcialmente justificar os resultados na estrutura da aorta deste grupo. Quanto à SIRT-1, diferente do ocorrido no coração, os tratamentos não foram capazes de aumentar a sua expressão na aorta dos animais com dieta hiperlipídica.

Das enzimas antioxidantes na aorta, somente a SOD1 (citossólica) demonstrou diferente expressão entre os grupos. Tanto o grupo HF12 quanto HF+ROSU tiveram a SOD1 menos expressa, enquanto que o tratamento com ASE manteve a expressão dessa enzima nos níveis do grupo controle. É um dado curioso, visto que no coração não houve alteração da expressão dessa enzima, entretanto, é coerente com dados prévios de ASE promovendo este efeito no LAM e no rim de animais hipertensos (Da Costa *et al.*, 2012; Da Costa *et al.*, 2017). Assim como no coração, na aorta o tratamento com ASE somente desempenhou efeito na expressão de enzimas antioxidantes quando esta fora alterada pela dieta hiperlipídica.

Em nosso estudo não foi observada alteração na expressão da MMP-2 na aorta. No entanto é possível que sua atividade tenha sido diferente entre os grupos, assim como expressão e atividade de outras MMP, pois no LAM, ASE demonstrou desempenhar menor ativação de MMP-2 (Da Costa *et al.*, 2012). Todavia, diferente do coração, notamos maior expressão da enzima NOX4 na aorta dos animais HF12. Na aorta, NOX4 é responsável por grande produção de H₂O₂ que, em quantidades fisiológicas, é necessária, mas quando a produção de H₂O₂ é exacerbada, torna-se prejudicial e pode contribuir para o remodelamento (Cremonini *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

Inflamação induz expressão de NOX4 na aorta através da via TNF- α / NF- κ B (Manea *et al.*, 2010). Outro grande indutor de NOX4 é o *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) (Rezende *et al.*, 2016). É possível que a maior expressão de NOX4 no grupo HF12 tenha ocorrido em parte por inflamação e também por maiores níveis de TGF- β , ambos relacionados à hipertrofia da aorta (Buday *et al.*, 2010), o que também ocorreu neste grupo. Todavia, como não avaliamos o TGF- β , apesar de plausível, esta hipótese não pôde ser confirmada neste estudo. Vendrov *et al.* (2015) ressaltam que níveis aumentados de EROs mitocondriais foram associados à expressão aumentada de NOX4 mitocondrial em células de músculo liso vascular da aorta, e sua supressão diminuiu os

níveis de EROs produzidos pelas mitocondriais. Sugerem então que a NOX4 seja mediadora de DCV no envelhecimento, em condições hiperlipidêmicas e que a regulação da atividade e expressão de NOX4 e o uso de antioxidantes mitocondriais sejam abordagens potenciais para reduzir as DCV (Vendrov *et al.*, 2015). Em nosso estudo mostramos que somente o tratamento com ASE foi capaz de reduzir a expressão de NOX4 na aorta dos camundongos obesos. Este resultado corrobora dados publicados previamente pelo nosso grupo em LAM de animais hipertensos (Da Costa *et al.*, 2012).

A enzima CAT neutraliza H₂O₂, gerando água e oxigênio. Esta enzima demonstrou maior atividade na aorta em ambos os tratamentos quando comparando ao grupo HF12 e uma tendência a maior atividade que o grupo controle. A enzima GPx, uma das principais enzimas antioxidantes, também teve sua atividade na aorta aumentada pelos dois tratamentos quando comparada ao HF12. Os resultados na atividade das enzimas antioxidantes (CAT e GPx) na aorta apontam para uma maior atividade antioxidante nos tecidos dos grupos tratados. De fato, ASE também demonstrou aumentar atividade da CAT e da GPx no LAM (Da Costa *et al.*, 2012), fígado (Oliveira *et al.*, 2015) e rim (Da Costa *et al.*, 2017), mas diminuição nos pulmões com inflamação induzida por fumaça de cigarro (De Moura *et al.*, 2012). As estatinas também podem ocasionar o aumento da atividade da CAT e da GPx (Davignon *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

Na aorta, também observamos menor dano oxidativo promovido pelo tratamento com ASE, através do 8-isoprostano, marcador de peroxidação lipídica. O dano oxidativo foi menor em HF+ASE do que nos grupos HF12 e HF8, demonstrando efeito terapêutico. O efeito antioxidante do ASE já foi observado em outros tecidos (Da Costa *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015) e, agora foi observado na aorta torácica através das expressões de Nrf2 e SOD1, e atividade das enzimas CAT e GPx, sendo provável fator contribuidor para este resultado de menor peroxidação lipídica na aorta. Por outro lado, o tratamento com ROSU não ocasionou a diminuição da peroxidação lipídica na aorta e, embora tenhamos observado neste estudo a melhora de alguns parâmetros de defesa antioxidante com este tratamento, não foram suficientes para evitar a maior peroxidação lipídica na aorta.

As diferenças de maior expressão de NOX4, maior peroxidação lipídica e menor expressão de SOD1 nas aortas do grupo HF12, são coerentes, visto que maior expressão

de NOX4 produz mais H₂O₂ e este pode aumentar o dano oxidativo (Manea *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020). Além disso, maior expressão de SOD1 e maior atividade de CAT observadas no grupo HF+ASE, atenuam os danos oxidativos que podem ocorrer a partir de O₂[•] e H₂O₂ (Cremonini *et al.*, 2019). Isto pode em parte também explicar o porquê do grupo HF+ROSU também ter apresentado maior peroxidação lipídica por 8-isoprostano, pois, embora tenha demonstrado tendência a menor expressão de NOX4 que HF12, estatisticamente teve maior expressão de NOX4 e menor expressão de SOD1 do que HF+ASE, o que aponta para um maior efeito antioxidante do ASE na aorta ao comparar com ROSU.

Muitas são as variáveis que influenciam no equilíbrio redox, como a quantidade e o tempo de exposição às espécies reativas (exposições agudas ou crônicas), quantidade de cofatores para as enzimas antioxidantes, tecido e contexto em questão, tipo de inflamação (crônica ou aguda), entre outros fatores. Existe, portanto, uma aparente distinção em como os tratamentos desempenham efeitos antioxidantes nos dois diferentes tecidos aqui avaliados, mas de forma geral, ambos os tratamentos agem no equilíbrio redox de forma a interferir benéficamente no remodelamento cardiovascular.

ASE demonstrou ação anti-inflamatória por reduzir TNF- α (De Moura *et al.*, 2012; De Bem *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020) e agora sugerimos este efeito também por modular a expressão de SIRT-1, proteína que desacetila NF-kB (Dias *et al.*, 2015; D'Onofrio *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

Os camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram aumento de peso corporal, hiperglicemia e alterações no perfil lipídico. Também desenvolveram alterações morfológicas no coração e na aorta torácica, além de apresentarem dano oxidativo na aorta e um comprometimento no mecanismo de defesa antioxidante em ambos os tecidos. Ambos os tratamentos agiram benéficamente na evolução do peso corporal e no perfil lipídico, todavia, somente ASE desempenhou efeito benéfico na glicemia. O tratamento com ASE promoveu melhoras nas estruturas do coração e da aorta, bem como ação antioxidante nestes órgãos. O tratamento com ROSU também promoveu melhoras nas estruturas do coração e da aorta, além de ação antioxidante nestes órgãos, embora esta tenha sido menos expressiva que a ação antioxidante promovida pelo ASE. Esta diferença entre os dois tratamentos em relação à ação antioxidante pôde ser evidenciada pela ação do ASE na expressão e atividade da enzima GPx no coração, bem como nas expressões de SOD1 e NOX4 na aorta, além de menor peroxidação lipídica. O provável mecanismo que parcialmente explica estes efeitos é a maior ativação da via do Nrf2 em ambos os tecidos, bem como a maior expressão de SIRT1 no coração. Este estudo abre uma possibilidade para o uso do tratamento com ASE na obesidade e complicações cardiovasculares associadas.

7. REFERÊNCIAS

- Abdurrachim D, Ciapaite J, Wessels B, et al. Cardiac diastolic dysfunction in high-fat diet fed mice is associated with lipotoxicity without impairment of cardiac energetics in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1525-1537.
- Adams SP, Sekhon SS, Wright JM. Lipid-lowering efficacy of rosuvastatin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(11):CD010254. Published 2014 Nov 21.
- Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*. 2001;103(2):276-283.
- Aimo, A., Gaggin, H. K., Barison, A., Emdin, M., & Januzzi, J. L. (2019). *Imaging, Biomarker, and Clinical Predictors of Cardiac Remodeling in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction*. *JACC: Heart Failure*.
- Ajit D, Simonyi A, Li R, Chen Z, Hannink M, Fritsche KL, et al. Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in DI TNC1 astrocytes. *Neurochem Int*. 2016 Jul;97:49-56.
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007;100(10):1512-1521.
- Ali F, Zakkar M, Karu K, et al. Induction of the cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 by statins is enhanced in vascular endothelium exposed to laminar shear stress and impaired by disturbed flow. *J Biol Chem*. 2009;284(28):18882-18892.
- American Diabetes Association (ADA). Disponível em: <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>
- American Medical Association (AMA). 2013; Resolution: 420 (A-13).
- Amouyel P, Deverly A. Risque cardiovasculaire global: définition, stratégies d'évaluation et de prise en charge. Table Ronde no 1 de Giens. XV [Global cardiovascular risk: definition, evaluation and management strategies. Round table no. 1. XV]. *Therapie*. 2000;55(4):533-539.

- Anaruma CP, Pereira RM, Cristina da Cruz Rodrigues K, et al. Rock protein as cardiac hypertrophy modulator in obesity and physical exercise. *Life Sci.* 2020;254:116955.
- Anderson TJ, Grégoire J, Pearson GJ, et al. 2016. Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. *Can J Cardiol.* 2016;32(11):1263-1282.
- Anthony SR, Guarnieri AR, Gozdiff A, Helsley RN, Phillip Owens A, Tranter M. Mechanisms linking adipose tissue inflammation to cardiac hypertrophy and fibrosis. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(22):2329-2344.
- Aragoncillo P, Maeso R, Vázquez-Pérez S, et al. The protective role of atorvastatin on function, structure and ultrastructure in the aorta of dyslipidemic rabbits. *Virchows Arch.* 2000;437(5):545-554.
- Aurigemma GP, de Simone G, Fitzgibbons TP. Cardiac remodeling in obesity. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2013;6(1):142-152.
- Azevedo CHM, Wajngarten M, Prete ACL, et al. Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease. *Clinics, São Paulo.* 2011; 66, 9, 1543-1548.
- Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SAR, Zornoff LAM. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev.* 2013;21(3):135-40.
- Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, Banerjee SK. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFkB-p65 and histone 3. *J Nutr Biochem.* 2015;26(11):1298-1307.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye K, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research.* 2004; 95:764–772.
- Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(4):376-379.
- Bays HE. Adiposopathy: Is “Sick Fat” a Cardiovascular Disease? *Journal of the American College of Cardiology.* 2011; 57 (25), 2461-2473.

- Benvenuti LA, Onishi RY, Gutierrez PS, Higuchi ML. Different patterns of atherosclerotic remodeling in the thoracic and abdominal aorta. *Clinics*. 2005; 60(5),.355-360.
- Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):238-248.
- Bitto A, Wang AM, Bennett CF, Kaeberlein M. Biochemical Genetic Pathways that Modulate Aging in Multiple Species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(11):a025114.
- Boardman NT, Hafstad AD, Lund J, Rossvoll L, Aasum E. Exercise of obese mice induces cardioprotection and oxygen sparing in hearts exposed to high-fat load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;313(5):H1054-H1062.
- Bonda DJ, Lee HG, Camins A, et al. The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol*. 2011;10(3):275-279.
- Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes*. 2005; 54 (6) 1615-1625.
- Buday A, Orsy P, Godó M, et al. Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(2):H386-H395.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485-501.
- Buettner, R, Schölmerich, J, Bollheimer, LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*. 2007; 15: 798-808.
- Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(4):e60931.

Carbone S, Canada JM, Billingsley HE, Siddiqui MS, Elagizi A, Lavie CJ. Obesity paradox in cardiovascular disease: where do we stand? *Vascular Health and Risk Management*. 2019; 15 89–100.

Chapple SJ, Siow RC, Mann GE. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(8):1315-1320.

Cheng Y, Zhu Y, Zhang J, Duan X, Zhang Y. Large Accumulation of Collagen and Increased Activation of Mast Cells in Hearts of Mice with Hyperlipidemia. *Arq Bras Cardiol*. 2017; 109(5):404-409.

Chylikovaa J, Dvorackovab J, Tauber Z, Kamaradc V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2018; 162(2):79-82.

Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH. Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation*. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 44230.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000; Volume 35, Issue 3: 569-582.

Cordeiro V, de Bem, da Costa, et al. Euterpe oleracea Mart. extract prevents vascular remodeling and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2015; 8. 6-16.

Cosentino F, Masato E, Paolis P, Loo B, Bachschmid M, et al. High Glucose Causes Upregulation of Cyclooxygenase-2 and Alters Prostanoid Profile in Human Endothelial Cells Role of Protein Kinase C and Reactive Oxygen Species. *Circulation*. 2003; 107:1017-1023.

Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13, 10697-10721.

Costa MV, Fernandes-Santos C, Faria Tda S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr*. 2011;51(1):89-96.

Council of the Obesity Society. Obesity as a Disease: The Obesity Society Council Resolution. *Obesity*. 2008; 16: 1151-1151.

Cremonini E, Daveri E, Mastaloudis A, et al. Anthocyanins protect the gastrointestinal tract from high fat diet-induced alterations in redox signaling, barrier integrity and dysbiosis. *Redox Biol*. 2019;26:101269.

Cuadrado, A. Structural and functional characterization of NRF2 degradation By glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015.04.029.

D'Onofrio N, Servillo L, Balestrieri ML. SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018;28(8):711-32.

Da Costa CA, Oliveira PR, Bem GF, Carvalho LC, Ognibene DT, et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012; v. 385, n. 12, p. 1199-1209.

Da Costa CA, Ognibene DT, Cordeiro VSC, et al. Effect of Euterpe oleracea Mart. Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. *J Med Food*. 2017 Oct;20(10):1002-1010.

Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III39-III43.

Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis*. 2004 Aug;15(5):251-8.

De Bem GF, Costa CA, Santos IB, Cordeiro VS, de Carvalho LCRM, et al. Antidiabetic effect of Euterpe oleracea Mart. (açai) extract and exercise training on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats: A positive interaction. *PLOS ONE*. 2018; v. 13, n. 6, p. e0199207.

De las Heras N, Valero-Muñoz M, Ballesteros S, et al. Factors involved in rosuvastatin induction of insulin sensitization in rats fed a high fat diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(11):1107-1114.

De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? *J Transl Med*. 2019;17(1):169.

De Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):262-269.

Dias MM, Martino HS, Noratto G, et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (Euterpe oleracea Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. *Food Funct*. 2015;6(10):3249-3256.

Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular Mechanisms of Angiotensin II–Mediated Mitochondrial Dysfunction. Linking Mitochondrial Oxidative Damage and Vascular Endothelial Dysfunction. *Circulation Research*. 2008; 102:488–496.

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

El-Najjar N, Kulkarni RP, Nader N, Hodeify R, Machaca K. Effects of Hyperglycemia on Vascular Smooth Muscle Ca²⁺ Signaling. *BioMed Research International*. 2017; Article ID 3691349, 16 pages.

Erbs S, Beck EB, Linke A, Adams V, Gielen S. High-dose rosuvastatin in chronic heart failure promotes vasculogenesis, corrects endothelial function, and improves cardiac remodeling — Results from a randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *International Journal of Cardiology*. 2011; Volume 146, Issue 1, 56 – 63.

Feliciano-Alfonso JE. Rosuvastatin: Role in Cardiovascular High-risk Patient. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2013; v. 61, n. 1, p. 41-51.

Filho PRPF. Padrões de Hipertrofia e Geometria do Ventrículo Esquerdo pela Ecocardiografia Transtorácica. *Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc*. 2012; 25(2):103-115.

Fiorentino TV, Priolella A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2013; 19, 5695-5703.

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

Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E. Hormetic and Mitochondria-Related Mechanisms of Antioxidant Action of Phytochemicals. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(9):373.

Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clinical Science*. 2012; 123, 259–270.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, Rabès JP, Boileau C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity*. 2007; v. 15, n. 8, 1996-2005.

Ge F, Hu C, Hyodo E, et al. Cardiomyocyte triglyceride accumulation and reduced ventricular function in mice with obesity reflect increased long chain Fatty Acid uptake and de novo Fatty Acid synthesis. *J Obes*. 2012;2012:205648.

Geiger M, Stein S. Adipose tissue macrophage polarization in cardiovascular disease. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2018; 25(3), 325–327.

Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; Article ID 9759735, pg. 27.

González-Paramás AM, Brighenti V, Bertoni L, et al. Assessment of the In Vivo Antioxidant Activity of an Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Using the *Caenorhabditis elegans* Model. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(6):509.

Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª Edição. Editora McGrallHill, 2005. p. 411-419.

- Gorodeski EZ, Gorodeski GI. Epidemiology and Risk Factors of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. *Treatment of the Postmenopausal Woman*. 2007; 405–452.
- Grundy SM, Stone NJ. 2018 American Heart Association/American College of Cardiology Multisociety Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Primary Prevention. *JAMA Cardiol*. 2019;4(5):488-489.
- Guzik TJ, Touyz RM. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension*. 2017; 70:660-667.
- Hanley JGA, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance in Relation to the Incidence of Cardiovascular Disease. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002; 25 (7), 1177-1184.
- Hariharan N, Ikeda Y, Hong C, Alcendor RR, Usui S, et al. Autophagy Plays an Essential Role in Mediating Regression of Hypertrophy during Unloading of the Heart. *PloS one*. 2013; 8. e51632. 10.1371/journal.pone.0051632.
- Hermida N, Markl A, Hamelet J, Van Assche T, Vanderper A, et al. HMGCoA reductase inhibition reverses myocardial fibrosis and diastolic dysfunction through AMP-activated protein kinase activation in a mouse model of metabolic syndrome. *Cardiovascular Research*. 2013; Volume 99, Issue 1, Pages 44–54.
- Hid EJ, Fischerman L, Piotrkowski B, Litterio MC, Fraga CG, Galleano M. (-)-Epicatechin protects thoracic aortic perivascular adipose tissue from whitening in high-fat fed mice. *Food Funct*. 2020;11(7):5944-5954.
- Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmaco Economics*. 2015; 33:673–689.
- Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):231-237.
- Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med*. 2010; Vol 14, N 1-2, pp. 70-78.
- Hybertson BM, Gao B. Role of the Nrf2 signaling system in health and disease. *Clin Genet*. 2014; 86:447–452.

Ishii Y, Langberg J, Rosborough K, Mikawa T. Endothelial cell lineages of the heart. *Cell Tissue Res.* 2009; 335(1): 67–73.

Jastreboff AM, Kotz CM, Kahan S, Kelly AS, Heymsfield SB. Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. *Obesity.* 2019; 27: 7-9.

Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy. An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circulation Research.* 2018; 122:624–638.

Joseph D, Kimar C, Symington B, Milne R, Essop MF. The detrimental effects of acute hyperglycemia on myocardial glucose uptake. 2014; *Life Sci* 105: 31–42.

Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother.* 2017;90:386-392.

Kawai Y, Garduño L, Theodore M, Yang J, Arinze IJ. Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7629-7640.

Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003; 23:1881–1888.

Kopacz A, Werner E, Grochot-Przęczek A, et al. Simvastatin Attenuates Abdominal Aortic Aneurysm Formation Favoured by Lack of Nrf2 Transcriptional Activity. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:6340190. Published 2020 Jun 16.

Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* 2019;68(11):915-932.

Kostapanos MS, Milionis HJ, Agouridis AD, Rizos CV, Elisaf MS. Rosuvastatin treatment is associated with an increase in insulin resistance in hyperlipidaemic patients with impaired fasting glucose. *Int J Clin Pract.* 2009;63(9):1308-1313.

Kostapanos MS, Milionis HJ, Elisaf MS. Rosuvastatin-associated adverse effects and drug-drug interactions in the clinical setting of dyslipidemia. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2010;10(1):11-28.

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006;127(6):1109-1122.
- Latorre M, Bersi MR, Humphrey JD. Computational Modeling Predicts Immuno-Mechanical Mechanisms of Maladaptive Aortic Remodeling in Hypertension. *Int J Eng Sci*. 2019;141:35-46.
- Leança CC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintão ECR. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010;54/9: 777-784.
- Lee JM, Wiesmann F, Shirodaria C, et al. Early changes in arterial structure and function following statin initiation: quantification by magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):951-958.
- Lee TM, Chou TF, Tsai CH. Association of pravastatin and left ventricular mass in hypercholesterolemic patients: role of 8-iso-prostaglandin f 2α formation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40(6):868-874.
- Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010;26(8):423-429.
- Li J, Sun YM, Wang LF, et al. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol*. 2010 Apr;33(4):222-7.
- Liao JK. Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure. *J Investig Med*. 2004;52(4):248-253.
- Lin MC, Hsing CH, Li FA, et al. Rosuvastatin Modulates the Post-Translational Acetylome in Endothelial Cells. *Acta Cardiol Sin*. 2014;30(1):67-73.
- Liu H, Yang J, Wang K, Niu T, Huang D. Moderate- and Low-Dose of Atorvastatin Alleviate Cognition Impairment Induced by High-Fat Diet via Sirt1 Activation. *Neurochem Res*. 2019;44(5):1065-1078.
- Luo H, Chiang H, Louw M, Susanto A, Chen D. Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends Endocrinol Metab*. 2017; 28(6): 449–460.

Lütjohann D, Stellaard F, Mulder MT, Sijbrands EJG, Weingärtner O. The emerging concept of “individualized cholesterol-lowering therapy”: A change in paradigm. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019;199, 111-116.

Lv Q, Wang Y, Li Y, et al. Rosuvastatin Reverses Hypertension-Induced Changes in the Aorta Structure and Endothelium-Dependent Relaxation in Rats Through Suppression of Apoptosis and Inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2020;75(6):584-595.

Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320

Maluf LC, Barros JA, Machado Filho CDS. Mastocitose. *An Bras Dermatol*. 2009;84(3):213-25.

Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(4):901-907.

Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310: H153–H173.

McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS; American College of Physicians and the American Physiological Society. Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med*. 2006;144(7):517-524.

McTaggart F et al. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *American Journal of Cardiology*. 2001; v 87, i 5, 28 – 32.

Mechanick J, Garber A, Handelsman Y, Garvey W. American Association of Clinical Endocrinologists’ Position Statement on Obesity and Obesity Medicine. *Endocrine Practice*. 2012; 18(5), 642–648.

Mechanick J, Hurley D, Garvey W. Adiposity-Based Chronic Disease as a New Diagnostic Term: The American Association Of Clinical Endocrinologists And American College Of Endocrinology Position Statement. *Endocrine Practice* 2017; 23(3), 372–378.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger Receptors in Atherosclerosis Beyond Lipid Uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006; 26:1702–1711.

Morimoto T, Katanasaka Y, Sunagawa Y, Hirano S, Miyazaki Y, et al. Effects of Statins on Left Ventricular Diastolic Function in Patients with Dyslipidemia and Diastolic Dysfunction (Stat-LVDF Study). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015; Volume 38, Issue 9, Pages 1404-1409.

Mouri MI, Badireddy M. Hyperglycemia. StatPearls Publishing. 2019.

Müller MJ, Geisler C. Defining obesity as a disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017; 71, 1256–1258.

Naples M, Federico LM, Xu E, Nelken J, Adeli K. Effect of rosuvastatin on insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance: Evidence for statin-induced hepatic insulin sensitization. *Atherosclerosis*. 2007; V 198, Issue 1, 94 – 103.

Nappi F, Barrea L, Somma C, Savanelli MC, Muscogiuri G, Orio F, Savastano S. Endocrine Aspects of Environmental “Obesogen” Pollutants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016; 13, 765.

National Cancer Institute (NCI), 2020. Disponível em: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/pages/concept_details.jsf?dictionary=NCI_Thesaurus&version=20.07d&code=C66523&ns=NCI_Thesaurus&type=properties&key=null&binary=1&n=0&vsc=null

Neto-Ferreira R, Rocha NV, Torres ST, Mandarim CA, Carvalho JJ. Beneficial effects of rosuvastatin on aortic adverse remodeling in nitric oxide-deficient rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(5):473-478.

Neto-Ferreira R, Rocha VN, Souza-Mello V, Mandarim CA, Carvalho JJ. Pleiotropic effects of rosuvastatin on the glucose metabolism and the subcutaneous and visceral adipose tissue behavior in C57Bl/6 mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2013; 5:32.

Newgard CB, An J, Bain JR et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009; 9:311–326.

Nicholls SJ, Ballantyne CM, Barter PJ, et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2078-2087.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404, pages787–790.

Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *British Journal of Pharmacology*. 2017; 174 3496–3513.

Oliveira PR, Da Costa CA, De Bem GF, Cordeiro VS, Santos IB, 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*. 2015; v. 10, n. 12, p. e0143721.

Oliveira PR, Da Costa CA, De Bem GF, De Carvalho LC, De Souza MA, 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*. 2010; v. 56, n. 6, p. 619-626.

OpenStax College. Biology. 2013. OpenStax College.

Organização Mundial da Saúde (OMS). 2018; fact sheet: obesity and overweight. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Ostro E, et al. Gene Silencing of the Mitochondrial Adaptor p66Shc Suppresses Vascular Hyperglycemic Memory in Diabetes. *Circ Res*. 2012; 111:278-289.

Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, et al. Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin Resistance in Individual Organs and Cardiac Dysfunction in C57BL/6 Mice. *Diabetes*. 2005; 54: 3530 –3540.

Payne RA. Cardiovascular risk. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(3):396-410.

Pedro-Botet J, Ascaso JF, Barrios V, et al. COSMIC project: consensus on the objectives of the metabolic syndrome in clinic. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018; 11:683–697.

Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo. *Circulation*. 2003;107(19):2480-2486.

Pereira-Silva DC, Machado-Silva RP, Castro-Pinheiro C, Fernandes-Santos C. Does gender influence cardiovascular remodeling in C57BL/6J mice fed a high-fat, high-sucrose and high-salt diet?. *Int J Exp Pathol*. 2019;100(3):153-160.

Poulose SM, Bielinski DF, Carey A, Schauss AG, Shukitt-Hale B. Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets. *Nutr Neurosci*. 2017;20(5):305-315.

Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Angel G. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. *Metabolomics*. 2019; 15:93.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-1951.

Reiner Z, Catapano AL, Backer GD, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*. 2011; 32, 14: 1769–1818.

Ren J, Yang L, Zhu L, et al. Akt2 ablation prolongs life span and improves myocardial contractile function with adaptive cardiac remodeling: role of Sirt1-mediated autophagy regulation. *Aging Cell*. 2017;16(5):976-987.

Requena T, Martinez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food Funct*. 2018, DOI: 10.1039/C7FO01820G.

Rezende F, Löwe O, Helfinger V, et al. Unchanged NADPH Oxidase Activity in Nox1-Nox2-Nox4 Triple Knockout Mice: What Do NADPH-Stimulated Chemiluminescence Assays Really Detect?. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(7):392-399.

Riaz S, Zeidan A, Mraiche F. Myocardial proteases and cardiac remodeling. *J Cell Physiol*. 2017; 232: 3244– 3250.

Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*. 2007 Feb;46(2):97-104.

Rodrigues RB, Lichtenthäler R, Zimmermann BF, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2006;54(12):4162-4167.

Roumenina LT, Rayes J, Frimat M, Fremeaux-Bacchi V. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunological Reviews* 2016; 274: 307–329.

Ruiz MC, Moreno JM, Ruiz N, et al. Effect of statin treatment on oxidative stress and renal function in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2006 Oct;38(8):2431-3.

Sanches E, Timmermans M, Topal B, et al. Cardiac remodeling in obesity and after bariatric and metabolic surgery; is there a role for gastro-intestinal hormones?. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2019;17(11):771-790.

Sánchez G, Araneda F, Peña JP, et al. High-Fat-Diet-Induced Obesity Produces Spontaneous Ventricular Arrhythmias and Increases the Activity of Ryanodine Receptors in Mice. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):533.

Sandoval-Acuña C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch Biochem Biophys*. 2014;559:75-90.

Santana AB, de Souza Oliveira TC, Bianconi BL, et al. Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. *Biomed Res Int*. 2014; 914102.

Santos IB, de Bem GF, da Costa CA, et al. Açai seed extract prevents the renin-angiotensin system activation, oxidative stress and inflammation in white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *Nutr Res*. 2020;79:35-49.

Satoh A, Stein L, Imai S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;206: 125–162.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8604-8610.

Schohraya S, Borys JM, Levy E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017; 26:9, 445-461.

Schram K, De Girolamo S, Madani S, Munoz D, Thong F, Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2010;15(4):551-563.

Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res*. 2011;34(6):665-673.

Schulz E, Wenzel P, Münnzel T, Daiber A. Mitochondrial Redox Signaling: Interaction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with Other Sources of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014; 20, 308-324.

Seo HS, Choi MH. Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2015; 153: 72-79.

Silva-Bertani DCTD, Vileigas DF, Mota GAF, et al. Decreased Collagen Type I is Associated with Increased Metalloproteinase-2 Activity and Protein Expression of Leptin in the Myocardium of Obese Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2020;115(1):61-70.

Simmons RK, Alberti KG, Gale EA, et al. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia*. 2010;53(4):600-605.

Sin TK, Yung BY, Siu PM. Modulation of SIRT1-Foxo1 signaling axis by resveratrol: implications in skeletal muscle aging and insulin resistance. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(2):541-552.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. 1965; 16, 144-158.

Soares RA, de Oliveira BC, de Bem GF, et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract improves aerobic exercise performance in rats. *Food Res Int*. 2020;136:109549.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2: Algoritmo SBD 2019. Disponível em: https://www.diabetes.org.br/publico/images/pdf/sbd_dm2_2019_2.pdf

Sung J, Ho C, Wang Y. Preventive mechanism of bioactive dietary foods on obesity-related inflammation and diseases. *Food Funct.* 2018; 9, 6081–6095.

Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiological Reviews.* 1999 79:1, 215-262.

Takemoto M, Node K, Nakagami H, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2001;108(10):1429-1437.

Tate M, Deo M, Cao AH, Hood SG, Huynh K, et al. Insulin replacement limits progression of diabetic cardiomyopathy in the low-dose streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes & Vascular Disease Research.* 2017; Vol. 14(5) 423–433.

Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(17):1727-1745. doi:10.1089/ars.2017.7342

Tun S, Spainhower CJ, Cottrill CL, et al. Therapeutic Efficacy of Antioxidants in Ameliorating Obesity Phenotype and Associated Comorbidities. *Front Pharmacol.* 2020;11:1234. Published 2020 Aug 13.

Vallgård S, Nielsen MEJ, Hansen AKK, Cathaoir KÓ, Holm L, Christensen BJ, Jensen JD, Sørensen TIA, Sandøe P. Should Europe follow the US and declare obesity a disease? A discussion of the so-called utilitarian argument. 2017; 71, 1263–1267.

Van den Bergh A, Vanderper A, Vangheluwe P, et al. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):371-379.

Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., & De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444(7121), 875–880.

Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, et al. Diet-induced Obese Mice Develop Peripheral, but Not Central, Resistance to Leptin. *J. Clin. Invest.* 1997; 99(3),385–390.

Van Varik BJ, Rennenberg RJMW, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Frontiers in Genetics.* 2012; 3: 290.

Varga I, Kyselovič J, Galfiova P, Danisovic L. The Non-cardiomyocyte Cells of the Heart. Their Possible Roles in Exercise-Induced Cardiac Regeneration and Remodeling. Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer. 2017; vol 999.

Vendrov AE, Vendrov KC, Smith A, et al. NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(18):1389-1409.

Wang H, Liu C, Tsai T, Chen Y, Chang H, et al. Effect of obesity reduction on preservation of heart function and attenuation of left ventricular remodeling, oxidative stress and inflammation in obese mice. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10:145.

Wang HF, Yu QQ, Zheng RF, Xu M. Inhibition of vascular adventitial remodeling by netrin-1 in diabetic rats. *J Endocrinol*. 2020;244(3):445-458.

Wang P, Luo L, Shen Q, Shi G, Mohammed A, et al. Rosuvastatin improves myocardial Hypertrophy after hemodynamic Pressure overload via regulating the Crosstalk of Nrf2/ARE and TGF- β / Smads Pathways in Rat Heart. *European Journal of Pharmacology*. 2017; 820; Pages 173-182.

Weingärtner O, Lütjohann D, Plösch T, Elsasser A. Individualized lipid-lowering therapy to further reduce residual cardiovascular risk. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016.

Wilson AJ, Gill EK, Abudalo RA, Edgar KS, Watson CJ, Grieve DJ. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart* 2018; 104:293–299.

Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem*. 2015 Jul 15;179:137-51.

Yan F, Wang Y, Wu X, et al. Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death Dis*. 2014;5(1):e1010. Published 2014 Jan 23.

- Yang YM, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(5):H1829–H1836.
- Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982;243(6):H941-H947.
- Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Fu W, Li P, Olefsky JM. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. 2017; Cell 171, 372–384.
- Zacà V, Mishra S, Gupta RC, Rastogi S, Sabbah HN. Pleiotropic effects of long-term monotherapy with rosuvastatin in dogs with moderate heart failure. *Cardiology*. 2012;123(3):160–167.
- Zacà V, Rastogi S, Imai M, Wang M, Sharov VG. Chronic Monotherapy With Rosuvastatin Prevents Progressive Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Dogs With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; V 50, I 6, Pages 551-557.
- Zapata-Sudo G, da Silva JS, Pereira SL, Souza PJ, de Moura RS, Sudo RT. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:227. Published 2014 Jul 8.
- Zeng C, Zhong P, Zhao Y, et al. Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF- κ B both in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:1-12.
- Zhang DD, Lo SC, Cross JV, et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:10941–10953.
- Zhang M, An C, Gao Y, et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2013;100:30-47.
- Zhou Y, Grayburn P, Karim A, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(4), 1784–1789.