

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA LUIZA DAL PONT MACHADO

**Efeito Hepatoprotetor do alpha-terpineol em Ratos Espontaneamente Hipertensos
e Infartados por Isoproterenol**

MACEIÓ - AL
2023

MARIA LUIZA DAL PONT MACHADO

Efeito Hepatoprotetor do alpha-terpineol em Ratos Espontaneamente Hipertensos e Infartados por Isoproterenol

Disertação de Mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

MACEIÓ – AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M149e Machado, Maria Luiza Dal Pont.

Efeito hepatoprotetor do alpha-terpineol em ratos espontaneamente hipertensos e infartados por isoproterenol / Maria Luiza Dal Pont Machado. – 2023.

73 f. : il. color.

Orientadora: Éurica Adélia Nogueira Ribeiro.

Co-orientador: Emanuel Tenório Paulino.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 78-87.

1. Monoterpenos. 2. Hepatoproteção. 3. Isoproterenol. 4. Ratos. I. Título.

CDU: 615.244

Dedico este trabalho a Deus, e à minha família em especial a minha mãe, Sidinéia Dal Pont Machado, e ao meu pai, Edson Tadeu Machado, por todo amor, esforço e dedicação.

AGRADECIMENTOS

O mês é Março e o ano é 2020, aprovação em 2º lugar no mestrado de Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas. Naquele momento, um misto de sensações e inseguranças tomavam conta de mim, o que fazer, como vai ser, tudo era muito novo e no meio dessas sensações e inseguranças estávamos enfrentando uma pandemia de uma doença que nem conhecíamos. 2020 foi um ano atípico, e ainda para completar a situação descobri uma doença autoimune: Diabetes tipo 1, achei que o mundo ia desabar, mas segui firme e nessa trajetória contei com pessoas fundamentais e essenciais para o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Primeiramente queria agradecer a Deus, por nunca ter me desamparado e por sempre ter respondido os meus questionamentos, e por ter colocado pessoas incríveis nessa minha jornada.

Segundamente queria agradecer aos meus pais, Edson e Sidinéia, por sempre me apoiarem, independente da situação mesmo que não soubesse do jeito que vocês esperassem, amo vocês.

Ao meu namorado, Igor Magalhães por toda forma de carinho e cuidado para comigo, mesmos nos meus dias mais insuportáveis, te amo.

A minha orientadora Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, por toda a orientação e cuidado durante esse processo, e por ser tão compreensiva, não tenho palavras para descrever toda a minha gratidão, eu não poderia ter escolhido outra pessoa para me orientar.

Ao meu co-orientador Emanuel Tenório, apenas uma palavra OBRIGADA! Você foi essencial, esse trabalho não teria acontecido se você não estivesse presente comigo, eu não tenho palavras para descrever.

As minhas amigas de graduação e farmacêuticas Kelly Oliveira e Thays Fontes, obrigada por serem minhas risadas nos momentos mais tensos. Vocês são maravilhosas, assim como vocês estiveram, eu vou estar aqui sempre com vocês.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos de laboratório e de mestrado, por que o nosso “barco” enfrentou grandes tempestades, mas estamos conseguindo conquistar o nosso tão sonhado título de mestres.

*“Feliz ou não, a lei da vida é seguir em frente com a cabeça erguida e
superar tudo o que está por vir.”*
(Renato Russo)

RESUMO

Introdução: O alpha-terpineol (TPN) é um monoterpeneo obtido da resina do caule de *Protium heptaphyllum*. Esse composto apresenta atividade farmacológicas, tais como atividades anti-obesidade, anti-inflamatória e em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) e infartados pelo modelo isoproterenol também se observou atividade cardioprotetora. O isoproterenol (ISO) ocasiona distúrbios metabólicos nos hepatócitos, estimulando desse modo o armazenamento de ácidos graxos nas vesículas, induzindo assim esteatose hepática não alcoólica. Desse modo o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos hepatoprotetores do alpha-terpineol em ratos SHR e infartados contra o dano hepático induzido pelo ISO. **Metodologia:** Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA / UFAL nº09 / 2015. Sendo assim, ratos machos foram alocados em 5 grupos e tratados por 15 dias (n = 5): (G1 = salina 0,9% V.O./ d); (G2 = salina infartado 0,9% V.O./d + ISO 85 mg / kg 2x s.c); (G3 = TPN 25 mg / kg V.O./d); (G4 = TPN 50 mg / kg V.O./d) E (G5 = TPN 75 mg / kg V.O./d). No 16º dia, os ratos foram anestesiados (Ketamina 80 mg / kg + Xilazina 4 mg / kg i.p.) e os testes morfométricos foram realizados de acordo com os métodos de Scherle. Os testes morfológicos foram examinados sob luz por estereoscopia, enquanto que os níveis lipídicos foram estimados pelas dosagens de colesterol total e dosagens de triglicérides dos soros sanguíneos. Os resultados foram expressos como média ± EPM e analisados estatisticamente por ANOVA one way seguido do pós teste de Newman-Keuls considerado significativo quando * p <0,05, ** p <0,001 e *** p <0,0001. **Resultados:** A indução com ISO em ratos SHR induziu aumento no peso hepático, além disso induziu também aumento na correlação do peso hepático sobre o peso cóporeo e aumento na correlação peso hepático sobre o peso do fêmur. Em relação aos aspectos morfológicos e histopatológicos, observou-se que o alpha-terpineol inibiu a esteatose hepática não alcoólica por danos da indução com isoproterenol, além disso o tratamento prévio com alpha-terpineol inibiu de modo significativo o aumento dos níveis de colesterol e triglicérides, em todas as doses testadas. Além disso, após a curva de tolerância a glicose notou-se que houve reversão nessa curva, podendo também influenciar no metabolismo de glicose, no entanto novos estudos são necessários. **Conclusão:** Em conjunto, os resultados sugerem que a alpha-terpineol tem um efeito hepatoprotetor, em ratos hipertensos e infartados.

Palavras-chave: Monoterpeneo; Hepatoproteção; Isoproterenol; Ratos.

ABSTRACT

Introduction: The alpha-terpineol (TPN) is a monoterpene obtained from *Protium heptaphyllum*. That has several pharmacological activities such as: anti-inflammatory, anti-obesity and cardioprotection on Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) by isoproterenol model. ISO evoked metabolic disturbance on hepatocytes, stimulate fatty acids storage on vesicles inducing non-alcoholic steatosis. The aims of this study were verify the hepatoprotective effects of alpha-terpineol in SHR against liver damage induced by ISO. **Methods:** Experimental protocols were approved by the CEUA/UFAL n°09/2015. Male rats were allocated into 5 groups and treated for 15 days (n=5): (G1= saline 0.9% P.O/d); (G2= Infarcted saline 0.9% P.O./d + ISO 85mg/kg 2x s.c); (G3= TPN 25 mg/kg P.O./d); (G4=TPN 50 mg/kg P.O./d) and (G5=TPN 75 mg/kg P.O./d). On 16^o day, rats were anesthetized (Ketamine 80 mg/kg + Xylazine 4 mg/kg i.p.) and morphometric tests were performed in accordance with Scherle's methods. Morphology tests were examined under light by stereoscopy, while lipid levels were estimated by total cholesterol and triglyceride dosages of blood serum. The results were expressed as mean \pm SEM, and analyzed statistically by ANOVA one-way followed by Newman-Keuls test considered significant when * p <0.05, ** p<0.001 and *** p< 0.0001. **Results:** Induction with ISO in SHR rats induced an increase in liver weight, in addition it also induced an increase in the correlation between liver weight and body weight and an increase in the correlation between liver weight and femur weight. Regarding the morphological and histopathological aspects, it was observed that alpha-terpineol inhibited non-alcoholic hepatic steatosis due to damage caused by induction with isoproterenol, in addition, previous treatment with alpha-terpineol significantly inhibited the increase in cholesterol and triglyceride levels, at all doses tested. In addition, after the glucose tolerance curve, it was noted that there was a reversal in this curve, which may also influence glucose metabolism, however further studies are needed. **Conclusion:** Taken together, the results indicate that alpha-terpineol has a significant hepatoprotective effect, in hypertensive and infarcted rats.

Key-words: Monoterpene ; Hepatoprotection; Isoproterenol; Rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema detalhado do processo de glicólise, realizado em duas fases: preparatória e de pagamento**20**
- Figura 2** – Representação esquemática do desenvolvimento fisiopatológico das síndromes metabólicas**27**
- Figura 3** – Mecanismo de ação das catecolaminas nos receptores adrenérgicos**36**
- Figura 4** – Microfotografias de fígados de ratos SHR, após o tratamento prévio com o monoterpeno alpha-terpineol.....**56**

LISTA DE TABELAS/ QUADROS

Tabela 1 - Critérios de diagnósticos da síndrome metabólica	24
Tabela 2 – Níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL no soro de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e infartados	60
Tabela 3 – Comparação do perfil glicêmico em ratos submetidos ao teste agudo de tolerância oral à glicose	64
Tabela 4 – Comparação do perfil glicêmico em ratos submetidos ao teste agudo de tolerância intravenosa à glicose	66
Quadro 1 – Aspectos morfológicos de fígados isolados de ratos SHR após o tratamento subagudo com alpha-terpineol.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1**– Média de peso corpóreo dos ratos antes e após o tratamento crônico com alpha-terpineol.....**52**
- Gráfico 2** – Efeito do alpha-terpineol sobre a morfometria dos fígados de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....**54**
- Gráfico 3**– Efeito do alpha-terpineol sobre a concentração plasmática de transaminase glutâmica pirúvica de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....**57**
- Gráfico 4** - Efeito do alpha-terpineol sobre a concentração plasmática de Gama Glutamil Transferase de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....**58**
- Gráfico 5** – Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose.....**62**
- Gráfico 6**– Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose no teste agudo de tolerância oral à glicose 2g/Kg.....**63**
- Gráfico 7**– Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose no teste agudo de tolerância intravenosa à glicose 1g/Kg.....**65**
- Gráfico 8** – Níveis de cálcio total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c.) em rato SHR após o tratamento subagudo com alpha-terpineol.....**67**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Adenilato Ciclase

ADP – Difosfato de Adenosina

AGL – Ácidos Graxos Livres

ATP – Trifosfato de Adenosina

cAMP – Monofosfato de Adenosina Cíclico

DCI – Denominação Comum Internacional

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

EHNA – Esteatohepatite Não Alcoólica

EPI – Epinefrina

E.P.M – Erro Padrão da Média

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HMG- CoA - 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

INPI – BR - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

ISO – Isoproterenol

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

L- DOPA – Diidroxifenilalanina

NE – Noradrenalina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PKA – Proteína Cinase A

RMN H⁺ - Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

TPN – Monoterpeno da resina do caule de *Protium heptaphyllum*

VLDL – Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

UV-Vis- Ultra-Violeta Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%: por cento

± : mais ou menos

°C: Graus Celsius

Ca²⁺: Cálcio

g: gramas

μL: Microlitros

mg / kg: miligramas por quilogramas

mg/dL : miligramas por decilitro

mmol/L: milimol por litro

U/L: unidades por litro

nm: nanômetros

α – Alpha

β - Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIGRÁFICA	19
2.1. Considerações gerais sobre metabolismo energético.....	19
2.2. Considerações gerais sobre síndrome metabólica.....	23
2.3. Revisão de modelos experimentais que mimetizam a síndrome metabólica	27
2.4. Fitofármacos como abordagem na descoberta de novos medicamentos.....	37
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo geral.....	43
3.2. Objetivo específico	43
4. MATERIAL E MÉTODO	44
4.1. Substâncias	44
4.1.1. Anestésicos.....	44
4.1.2 Reagentes analíticos.....	44
4.1.3 Kits bioquímicos	44
4.2. Extração e obtenção do monoterpeneo	44
4.3. Animais	44
4.4. Abordagens farmacológicas	45
4.5. Avaliação bioquímica	45
4.5.1. Dosagem dos níveis lipídicos	46
4.5.1.1. Dosagem de colesterol	46
4.5.1.1.1. Dosagem de HDL	46
4.5.1.1.2 Dosagem de LDL	46
4.5.1.1.3 Dosagem de VLDL	47
4.5.1.2 Dosagem de triglicérides	47
4.5.1.3 Dosagem de TGP.....	47
4.5.1.4 Dosagem dos niveis de Gamma Glutamyl Transferase.....	48
4.5.1.5 Dosagem de glicemia em jejum.....	48
4.6 Avaliação das medidas antropométricas.....	49
4.7. Avaliação morfológica e morfométrica	49
4.8. Avaliação histológica.....	49

4.9 Avaliação do teste de tolerância oral à glicose.....	50
4.10 Avaliação do teste de tolerância intravenosa á glicose.....	50
4.11 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Efeito do alpha-terpineol sobre o peso corpóreo de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....	52
5.2 Efeito do alpha-terpineol sobre a morfometria de fígado de ratos SHR e infartados por isoproterenol	53
5.3 Efeito do alpha-terpineol sobre a morfologia macroscópica dos fígados de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....	54
5.4 Efeito do alpha-terpineol sobre a hisoarquitetura dos fígados de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....	55
5.5 Efeito do alpha-terpineol sobre transaminase glutâmica pirúvica (TGP) de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....	57
5.6 Efeito do alpha-terpineol sobre a gama glutamil transferase (GGT) de ratos SHR e infartados por isoproterenol.....	57
5.7 Efeito do alpha-terpineol sobre o perfil lipídico de ratos SHR e infartados com isoproterenol.....	58
5.8 Efeito do alpha-terpineol sobre o pergil glícido de ratos SHR e infartados com isoproterenol.....	61
5.9 Efeito do alpha-terpineol sobre a tolerância oral à glicose de ratos SHR	62
5.10 Efeito do alpha-terpineol sobre a tolerância intravenosa à glicose de ratos SHR	65
5.11 Efeito do alpha-terpineol sobre o transiente de cálcio dos fígados de ratos SHR e infartados	67
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	77
8 PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

As dislipidemias configuram um importante risco para a doenças cardiometabólicas, como: aterosclerose, diabetes mellitus, obesidade e doenças crônicas renais e hepáticas. Devido a isto, o uso de agentes hipolipêmicos, dentre eles a classe das estatinas, tem sido vastamente utilizado no tratamento e prevenção de indivíduos dislipidêmicos com alto risco cardiovascular (PEASON et al., 2021).

Já está claramente reportado na literatura a correlação entre as dislipidemias e o surgimento da síndrome metabólica e neste sentido as dislipidemias são consideradas uma das três manifestações mais importantes para caracterizar a síndrome metabólica (RUOTOLO et al., 2022). Esta observação, parte da fisiopatologia das síndromes metabólicas que até o momento apontam para a expressão gênica de componentes aos quais contraregulam o metabolismo de lipídeos e carboidratos através de feedbacks positivos e negativos na homeostase metabólica (HIRANO et al., 2018).

O engatilhamento das supressões de genes correlacionados a leptina, sistema nervoso autonômico e seus eixos hormonais, tem sido o alicerce para explicar o surgimento da síndrome metabólica em humanos e animais, ao passo, que também servem de base para justificar as falhas nos desfechos clinicamente relevantes de indivíduos dislipidêmicos, ateroscleróticos, hipertensos, obesos e diabéticos (STĂNESCU et al., 2017). Isto, ocorre devido ao fato que algumas classes de fármacos controlam apenas alvos pontuais e não modulam em longo prazo a expressão gênica e/ou seus gatilhos, o que eleva o insucesso terapêutico (SKALAYEN et al., 2018)

Em contrapartida, são inúmeros os incentivos às indústrias farmacêuticas na busca por compostos que possam ser úteis na prevenção e tratamento da síndrome metabólica, tem aumentado a cada ano em todo o mundo (LILICH et al., 2021). Neste contexto, os produtos naturais têm figurado como parte considerável na descoberta de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças incluindo as cardiometabólicas (NEWMAN & CRAGG, 2022).

Em particular os compostos terpênicos tem movimentado parte considerável dos fundos financeiros na descoberta de novos fármacos pela indústria farmacêutica (WANG et al., 2002). Recentemente, cerca de 33 compostos terpênicos demonstram atividades farmacológicas promissoras sobre o sistema cardiovascular na indústria farmacêutica e pesquisadores (SANTOS et al., 2011).

Dentre eles, α -terpineol tem ganhado notoriedade, devido as suas ações farmacológicas, em particular, estudos recentes, demonstram seus efeitos cardioprotetores (TENÓRIO et al., 2022) e ações promissoras em um modelo de síndrome metabólica, baseado na obesidade sem influências cardiovasculares, por indução com dieta hiperlipídica (DE SOUZA et al., 2022). Entretanto, os efeitos do α -terpineol em um modelo de síndrome metabólica com distúrbios cardiovasculares e suas repercussões sobre o perfil lipídico, glicídico e hepático, permanecem desconhecidos.

Desta forma, o presente trabalho investiga se o α -terpineol é capaz de prevenir distúrbios cardiometabólicos em um modelo de infarto agudo do miocárdio em ratos espontaneamente hipertensos, ao passo, que avalia a caracteriza se o modelo isoproterenol pode ser útil para tornar-se uma abordagem de indução de síndrome metabólica em ratos espontaneamente hipertensos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE METABOLISMO ENERGÉTICO

O estado energético do corpo humano é essencial para a manutenção do equilíbrio dinâmico que mantêm todos os processos necessários e intrínsecos a homeostasia. Essa homeostasia é alcançada quando existe um equilíbrio energético, ou seja, quando o consumo de energia metabolizável combina perfeitamente com a quantidade de energia gasta (LAM Y.Y & RAVUSSIN E, 2016).

Neste contexto, a biomolécula utilizada como fonte de energia pelas células para o adequado funcionamento das organelas citoplasmáticas e desenvolvimento das atividades de cada sistema é o trifosfato de adenosina (ATP). A geração de ATP para as células é controlada por ciclos bioquímicos relacionados ao metabolismo glicídico e lipídico, dentre eles estão envolvidos os processos de glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) e β - oxidação (SILVEIRA et al., 2011).

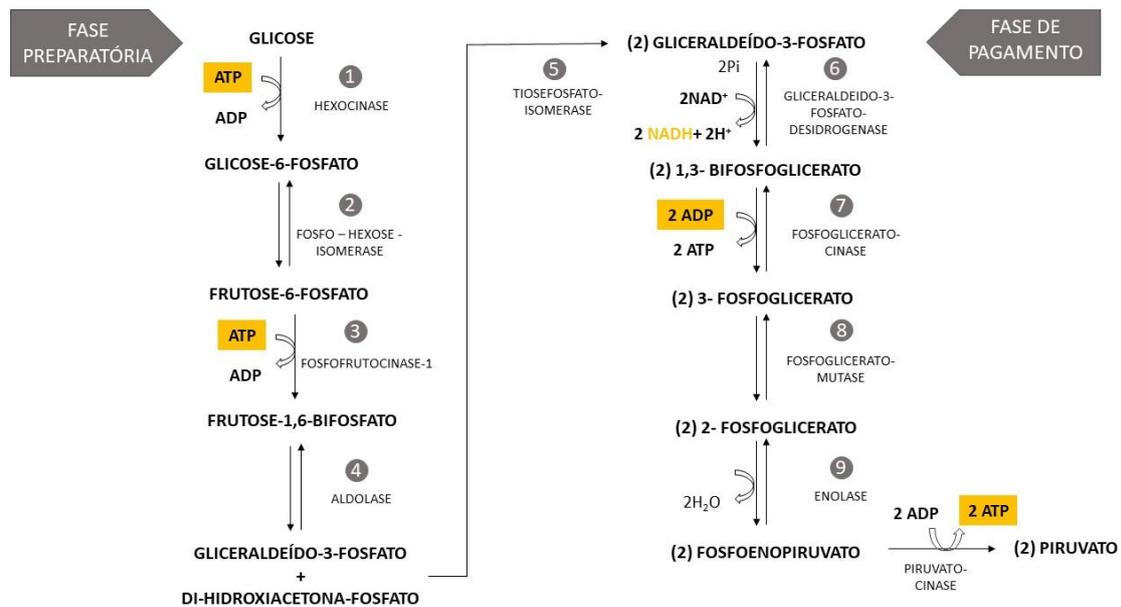
De maneira geral o aporte calórico, constitui a principal fonte de glicose, através da absorção de carboidratos, de modo análogo as fontes lipídicas, comumente classificam-se em ácidos graxos saturados e insaturados incluindo os polinsaturados, quer sejam de cadeia aberta, quer sejam de cadeia cíclica oriundos da ingestão alimentar e consequente absorção intestinal.

O metabolismo da glicose compõe um dos mais importantes ciclos para a obtenção do ATP ativo na corrente sanguínea, que é controlado por hormônios como a insulina e o glucagon. Estes hormônios se autocontrolam através de feedbacks positivo, induzindo a liberação de insulina que produz uma cascata sinalizadora para a ativação da glicólise e glicogenólise, liberada para seus sistemas alvos. Não obstante os feedbacks negativos produzem a liberação de glucagon que induzem a sinalização para a gliconeogênese hepática (GUO et al., 2012).

A glicólise é um processo complexo com múltiplas etapas favoráveis a geração e fornecimento do ATP. Nesse processo, uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas, gerando duas moléculas de piruvato. Durante as reações sequenciais da glicólise, parte da energia livre da glicose é conservada na forma de ATP e NADH (GUO et al., 2012).

Esse processo (glicólise), acontece em uma sequência de 10 etapas, sendo que as 5 primeiras constituem a fase preparatória onde a glicose é fosforilada e tem a sua conversão em gliceraldeído-3-fosfato e o restante ocorre na fase de pagamento onde ocorre a conversão oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato em piruvato e formação acoplada de ATP e NADH, esse processo pode ser observado de forma detalhada na figura 1 pág. 18 (NELSON & COX, 2017).

Figura 1: Esquema detalhado do processo de glicólise, realizado em 2 fases preparatória e de pagamento.



Fonte: AUTORA, 2022.

Nesse mesmo sentido, a glicogenólise é o processo pelo qual o glicogênio presente no fígado é transformado em glicose destinada ao sangue. Essa produção metabólica de glicose se faz em três etapas, chamadas reações de hidrólise, que permitem às enzimas liberarem a glicose do fígado e dos músculos para alimentar o sangue e regular naturalmente a taxa de glicemia. Sendo assim, esse processo pode ser considerado um mecanismo hiperglicemiante (NELSON & COX, 2017).

Por outro lado, a gliconeogênese também desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase da glicose (feedback negativo). É um processo que transforma compostos aglicanos (não-carboidratos) como lactato, aminoácidos (principalmente a alanina) e glicerol em glicose.

Neste mesmo sentido a β - oxidação dos lipídeos é o principal mecanismo para a obtenção do ATP para os tecidos alvos. A utilização de ácidos graxos para energia ocorre

através da oxidação dos mesmos na matriz mitocondrial. Para que esse processo ocorra, os ácidos graxos são convertidos em acil-CoA graxo, pelas acil-CoA sintases. Após essa reação, os substratos gerados são transportados através de membranas mitocondriais para a matriz mitocondrial. Nesse momento, os acil-CoAs graxos, podem ser direcionados para a oxidação de combustível em momento de necessidade de energia, ou para a formação de glicerofosfolípidios estruturais quando há um excesso de energia (TRAGECY et al., 2018).

Através de uma sequência repetida de quatro reações, catalisadas por acil-CoA desidrogenase, enoil-CoA hidratase, hidroxiacil-CoA desidrogenase e cetoacil-CoA tiolase, a beta-oxidação produz uma quantidade considerável de energia a partir de um único substrato (EATON et al., 1996; TRAGECY et al., 2018). Cada ciclo dessa reação produz uma molécula de FADH₂, uma molécula de NADH, uma molécula de acetil-CoA e um derivado de acil graxo (JENKINS et al., 2015; TRAGECY et al., 2018).

Essas moléculas resultantes de cada ciclo (FADH₂ e NADH) incorporam seus elétrons livres diretamente na cadeia de transporte mitocondrial para a geração de ATP, e as moléculas de acetil-CoA entram no ciclo do ácido tricarboxílico para posterior geração de energia. Processo esse que resulta na geração de uma quantidade significativa de ATP (BALABAN, 1990; TRAGECY et al., 2018; LEHNINGER, 2022).

O equilíbrio adequado do metabolismo energético garante aos sistemas fisiológicos e suas células o fornecimento adequado eletro-iônico, bem como, o funcionamento dos cotransportadores e das organelas celulares especialmente da mitocôndria.

O controle do catabolismo e do anabolismo de substâncias bioativas são necessárias para a manutenção dos sinais vitais inerentes a saúde. Entretanto, as desregulações no estado energético intimamente relacionado ao anabolismo e ao catabolismo é o fator fundamental no processo do desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

As DCNT constituem um dos maiores problemas de saúde pública não só do Brasil, mas também do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que as DCNT foram responsáveis por cerca de 73,6% das mortes ocorridas globalmente em 2019 (WORD HEALTH ORGANIZATON, 2021). No Brasil, as DCNT foram responsáveis por cerca de 41,8% do total de mortes ocorridas prematuramente, ou seja, entre 30 e 69 anos de idade (BRASIL, 2021).

As DCNT constituem o grupo de doenças de maior magnitude do País, e atinge especialmente as populações mais vulneráveis, como as de baixas renda e escolaridade, devido principalmente à maior exposição aos fatores de risco ou ao acesso restrito às informações e aos serviços de saúde (WORD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Além disso, as DCNT são responsáveis pela maior carga de morbimortalidade no mundo.

De acordo com a OMS, um pequeno conjunto de fatores de risco responde pela grande maioria das mortes por DCNT e por fração substancial da carga de doenças devida a essas enfermidades. Entre esses fatores, destacam-se o tabagismo, o consumo alimentar inadequado, a inatividade física e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Além disso, as DCNT's atingem indivíduos de todas as camadas socioeconômicas e, de forma mais intensa, aqueles pertencentes a grupos vulneráveis, como os de baixa escolaridade e renda (MALTA et al., 2019). Segundo Melo et al. (2019), a situação de saúde no Brasil se caracteriza por uma transição demográfica acelerada e por um perfil epidemiológico de tripla carga de doenças, trazendo nesse contexto as doenças crônicas não transmissíveis.

Neste sentido se faz necessário o desenvolvimento de novas metodologias experimentais capazes de mimetizar as doenças de origem cardiometabólica, atualmente os principais modelos de doenças cardiometabólicas encontradas na literatura podem ser encontrados de modo estratificado, estudando cada doença isoladamente ou confluentes, onde as doenças se desenvolvem ao mesmo tempo.

Diante do exposto faz-se necessário a investigação de modelos que possam mimetizar doenças como hipertensão, diabetes, infarto e a própria síndrome metabólica, afim de avaliar produtos naturais ou sintéticos bioativos para o melhor entendimento do seu efeito e possível contribuição para a indústria farmacêutica.

Em especial a síndrome metabólica, que é caracterizada por ao menos 3 doenças preexistentes em conjunto, sendo que os principais métodos experimentais e as principais modulações que produzem a síndrome metabólica em animais e seus estudos pré-clínicos envolvem: 1- induções por dietas hipercalóricas, 2- manipulações genéticas e 3-induções por drogas/cirurgias (WONG et al., 2016).

O uso destes modelos experimentais em DCNT são úteis até os dias atuais para melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos, fisiopatológicos e farmacológicos envolvidos no metabolismo energético destas doenças em especial da síndrome metabólica.

2.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SÍNDROME METABÓLICA

A Síndrome Metabólica (SM) é uma doença resultante de complexas alterações nas vias do metabolismo celular e lipídico por meio de redes intercomunicantes que leva à fatores de risco de morbidade e mortalidade, porém sem etiologia cientificamente clara para o seu desenvolvimento (XU et al., 2019; TKACHENKO et al., 2020).

Apesar de sua etiologia não ser definida, estudos de coorte, mostram que alguns fatores podem predisponibilizar o surgimento da síndrome metabólica, como por exemplo: estilo de vida (baseado em um perfil de sedentarismo, consumo de dietas hiperlipídicas e estresse emocional), fator genético e/ou perfil evolutivo de doenças crônicas não transmissíveis preexistentes sem controle adequado farmacoterapêutico (PEDERSEN et al., 2016; BARROSO & MCCARTHY, 2019; SIGIT et al., 2020).

A síndrome metabólica, também conhecida como síndrome cardiometabólica, síndrome X, síndrome de resistência à insulina, síndrome de Reaven, ou ainda CHAOS (doença arterial coronariana, hipertensão, aterosclerose, obesidade e acidente vascular cerebral), é uma patologia caracterizada por um conjunto de distúrbios metabólicos são eles: Diabetes mellitus tipo I ou II, obesidade com aumento da circunferência abdominal e aumento da massa gorda ponderal, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão, Infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral resultante de estado permanente de trombose (THAMAM & ARORA, 2013; GRUNDY et al., 2021).

O diagnóstico clínico da síndrome metabólica é realizada pelo surgimento concomitante de pelo menos três entre cinco das seguintes condições: obesidade abdominal (circunferência abdominal), hipertensão, glicose elevada, dislipidemias (triglicerídeos elevados, baixos níveis de lipoproteína-colesterol (HDL-C), altos níveis de lipoproteína de alta densidade (LDL-C) e hepatoesteatose gordurosa não alcólica), distúrbios coagulativos vasculares (infarto agudo do miocárdio e/ou acidente vascular cerebral). Dessa forma, a implicação clínica da síndrome metabólica é que ela aumenta o risco do desenvolvimento do diabetes tipo 2 (DMT2) e doenças cardiovasculares (DCV) (LIM & ECKEL, 2014). Os critérios de diagnósticos da síndrome metabólica serão sumarizados na tabela 1 na página 23.

Tabela 1: Critérios de diagnósticos da síndrome metabólica

CRITÉRIOS CLÍNICOS	OMS 1998	NCEP:ATPIII (2001)	AHA/NHLBI (2004)	IDF (2005)
RESISTÊNCIA A INSULINA	Tolerância à glicose prejudicada, glicemia de jejum prejudicada, resistência à insulina, mais quaisquer dois dos seguintes:	-	-	-
DISLIPIDEMIA	Triglicerídeos (TG) > 1,695 mmol/L, lipoproteína de alta densidade (HDL-C): < 0,9 mmol/L (homens) < 1,0 mmol/L (mulheres)	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL, HDL-C: < 40 mg/dL (homens) < 50 mg/dL (mulheres)	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL, HDL-C: < 40 mg/dL (homens) < 50 mg/dL (mulheres)	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL, HDL-C: < 40 mg/dL (homens) < 50 mg/dL (mulheres)
PRESSÃO SANGUÍNEA	>140/90mmHg	≥ 130/85 mg/dL	≥ 130/85 mg/dL	≥ 130/85 mg/dL
GLICOSE PLASMÁTICA	>7,0 mmol/L (jejum)	≥ 110 mg/dL (jejum)*	≥ 100 mg/dL (jejum)	≥ 100 mg/dL (jejum)
OBESIDADE	Relação cintura/quadril: >0,90 (homens) >0,85 (mulheres) e/ou IMC > 30 Kg/m ²	Circunferência da cintura: >102 cm (homens) >88 cm (mulheres)	Circunferência da cintura: ≥ 102 cm (homens) ≥ 88 cm (mulheres)	Circunferência da cintura: Europeus: > 94cm (homens); > 80cm (mulheres). Asiáticos: >90 cm (homens); > 80cm (mulheres)**
OUTROS	Razão de excreção urinária de albumina >20mg/min ou razão albumina/creatina >30mg/g	-	-	-

Fonte: AUTORA, 2022.

A crescente prevalência da SM, associada à progressão substancial da obesidade e diabetes, torna-a um importante problema de saúde pública (THAMAM & ARORA,2013). Na última década, a prevalência da síndrome metabólica tem aumentado globalmente, podendo ser considerada uma epidemia (Saklayen, 2018). No Brasil, essa síndrome constitui a maior causa de morbimortalidade da população, sendo responsável por 76% das mortes em 2017 no país, podendo alcançar mais 40% nas faixas etárias maiores que 60 anos e uma prevalência de cerca de 29,6% na população adulta (OLIVEIRA et al., 2020).

Como citado anteriormente a SM reflete da transição de um estilo de vida tradicional para um estilo de vida da sociedade contemporânea, baseado principalmente no aumento do consumo de *fast foods* e comportamento psicológico com alto estresse (Noghabi,2021). Essas alterações causam efeitos significativos na composição corporal e no metabolismo, muitas vezes resultando no aumento do IMC, obesidade generalizada e abdominal, e aumento da dislipidemia e DMT2, causas importantes do desenvolvimento da SM (THAMAM & ARORA,2013; GRUNDY et al., 2021). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes estima-se que 25% da população adulta mundial tem Síndrome Metabólica (THAMAM & AURORA,2013).

Apesar dos avanços na fisiopatologia e no delineamento de fatores de risco que predisõem à SM, há muitos aspectos-chave que ainda precisam ser estudados. A grande variação de suscetibilidade e idade de início em indivíduos com um perfil de risco muito semelhantes, sugere uma grande interação entre fatores genéticos e ambientais. Embora a resistência à insulina e obesidade permaneçam no centro da fisiopatologia da SM, vários outros fatores também podem estar envolvidos na sua patogênese (figura 2, página 26) (KASSI et al., 2011).

Assim como a resistência a insulina e a obesidade, o estado hipertensivo sustentado e ineficiência dos mecanismos de controle da pressão arterial a curto, médio e longo prazo é suficiente para desregular o eixo hormonal neural que está intimamente relacionado com o sistema renina-angiotensina-aldosterona (WANG,C et al., 2010). O circuito pelo qual o desequilíbrio cardiorenal se correlaciona com a síndrome metabólica tem sido avaliado e repercutido recentemente (PISKORZ, 2020; MANTA et al., 2021). Entretanto, observa-se que o envolvimento do sistema simpático e altas concentrações de catecolaminas endógenas são encontradas nos estudos em humanos e animais, o que explica a existência do infarto agudo do miocárdio e/ou acidente vascular cerebral

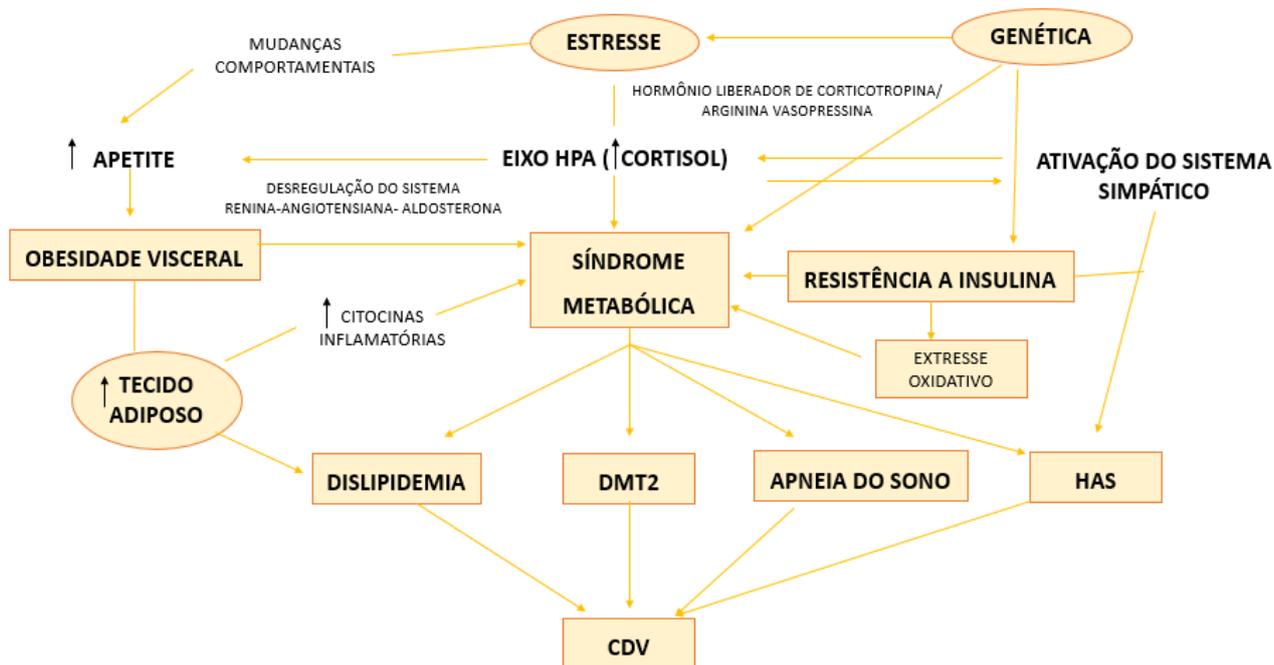
reincidente em indivíduos síndrome metabólica (DALLONGEVILLE et al., 2003; ZIEGLER et al., 2012; THORP & SCHLAICH, 2015).

Não obstante, recentes estudos tem demonstrado um estado persistente de perfil inflamatório em indivíduos síndrome metabólica, no qual percebe-se altas taxas de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas e hormônios pró-inflamatórios circulantes (KAUR, 2014; ZAHA et al., 2020). No mesmo sentido, observa-se em indivíduos síndrome metabólica desregulação nas vias coagulativas, produzindo estase sanguínea o que parece se relacionar ao aumento da resistencia periférica total e crescente estado hipertensivo (STEWART & KLINE, 2020). Embora a participação do sistema cardiovascular, coagulativo e metabólico esteja claramente descrito na literatura, sua relação causa-efeito nos sistemas efetivos ainda não está totalmente elucidado (RUSSO, 2012).

Apesar das relações causa-efeito não sejam definidas na literatura, quanto ao “*starting-feedbacks*”, é fato que a esteatose hepática gordurosa não-alcoólica advém da dislipidemia (MATSUBAYASHI et al., 2022), em que o colesterol de alta densidade é translocado e a rede de LDL-C oxidado circulante é amplificado, originando reestoque de vesículas lipídicas, enquanto os adipócitos ocupam parte significativa dos lobos hepáticos induzindo supressão dos hepatócitos e alteração no metabolismo energético e de xenobióticos (ESLER & BENICE, 2019).

Comumente é encontrado em indivíduos síndrome metabólica taxas elevadas de aminotransferases oxalacética, pirúvica e gama glutamil (PAGANO et al., 2002; WANG et al., 2017). Estes marcadores bioquímicos sinalizam lesões hepáticas em indivíduos síndrome metabólica o que será preponderante para o surgimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica como um desfecho clínico nestes indivíduos (PASCHOS & PALETAS 2009).

Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento fisiopatológico das síndromes metabólicas



Fonte: AUTORA, 2022.

2.3. REVISÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS QUE MIMETIZAM A SÍNDROME METABÓLICA

Diante da necessidade de elucidar os mecanismos organocelulares da síndrome metabólica em face a uma condição multifatorial com prevalência alarmante atualmente, o estabelecimento de modelos animais experimentais apropriados para a translação da síndrome em humanos é crucial para o entendimento fisiopatológico bem como sua utilização como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos a ser utilizado no tratamento da síndrome de forma otimizada (WONG et al.,2016).

Neste sentido, uma variedade de modelos experimentais na busca pela mimetização da síndrome metabólica encontrada em humanos é encontrada na literatura. De um modo geral, as principais modulações que produzem a síndrome metabólica em animais e seus estudos pré-clínicos envolvem: 1- induções por dietas hipercalóricas, 2- manipulações genéticas e 3-induções por drogas/cirurgias (WONG et al.,2016).

Em meados do século XX, uma diversidade de estudos do tipo delineamento de protocolos experimentais com a temática de síndrome metabólica foi crescendo até a

atualidade (METRICS pubmed, 2022). Tomando por base a observação que o aumento do consumo de fast-foods surgiam ao mesmo tempo que a síndrome metabólica emergia como um problema relevante em saúde pública, os primeiros modelos baseavam-se na modulação por ingestas de dietas manipuladas, acrescentando o percentual de carboidratos e/ou lipídeos.

Partindo deste princípio, a administração de dietas ricas em carboidratos e/ou lipídeos em roedores, tornou a mais comum forma de induzir síndrome metabólica em proporções laboratoriais. Popularmente conhecidas como “dietas cafeterias” este processo consiste em linhas gerais em aumentar a proporção de carboidratos como açúcares, sendo estes frutose ou sacarose (WONG et al., 2016).

As dietas ricas em carboidratos como a sacarose se apoia no aumento das concentrações plasmáticas de sacarose até obter disfunções sobre as ações da insulina em seus respectivos tecidos alvo (WANG et al., 2016). A sacarose, um dissacarídeo, formado pela ligação de uma molécula de frutose a uma molécula de glicose, possui alta palatabilidade e portanto aumenta o estímulo ao ciclo de recompensa do sistema límbico central. Ao mesmo tempo, altas concentrações de sacarose provocadas pela ingestão de dietas com alto teor de açúcares, produzem maior translocação de co-transportadores para açúcares, uma vez que as enzimas sucrases são saturadas pelo excesso de sacarose (ELZOUKI et al., 2011).

O aumento dos níveis circulantes de açúcares (monossacarídeos) descompensam a liberação e ações da insulina, que é influenciada pelo metabolismo da glicose. Assim o metabolismo da glicose que é regulado negativamente pela enzima fosfofrutoquinase, altera a via glicolítica e esta por sua vez, o estoque de glicose e suas ações sobre a atividade de células insulino-dependentes, através de feedbacks (WILLIAMS & PICKUP, 2003). Por outro lado o excesso de frutose aumenta a lipogênese no fígado, levando a esteatose hepática. A premissa experimental é fundamentado no aumento de 30-32% de sacarose na água de beber, resulta no aumento do peso corporal, pressão arterial, glicemia transitória, ações da insulina e dislipidemias (AGUILLERA et al., 2004; VANSANJI et al., 2006).

Paradoxalmente, alterações no tipo de roedor escolhido parece exercer forte influência sobre os desfechos experimentais, com a presença e/ou ausência de parâmetros análogos a síndrome metabólica e isto parece se correlacionar com o próprio metabolismo do roedor (Wistar, Hamster, Sprague-Dawley ou SHR) tornando-se uma variável obscura

para a replicação do desenho experimental como o modelo mais apropriado para os estudos translacionais (ORON-HERMAN, et al., 2008).

Outro viés do desenho experimental, vem da incerteza de consumo individual de sacarose em menção ao grupo de base e grupos de intervenção, sendo este um risco admissível na execução do protocolo experimental e obtenção de dados experimentais como variáveis para o estudo. É admissível que o uso de gaiolas metabólicas podem reduzir este viés, porém aumentam o a relação de custo-benefício do desenho experimental.

Além disto, as flutuações encontradas nas diversas concentrações de sacarose em protocolos experimentais (30-77%), tornam o protocolo experimental de difícil reprodução, com precisão e exatidão, aos parâmetros estudados em experimentos com síndrome metabólica (JURGENS et al., 2005).

A substituição da sacarose pela frutose (um açúcar, comumente encontrado em frutas), confere ao menos teoricamente, o rápido influxo deste açúcar no fígado, resultando em acumulação de triglicérides e colesterol, devido ao efeito lipogênico induzido pela regulação da frutose, com subsequente redução da sensibilidade da insulina, intolerância a glicose e resistência da insulina (JURGENS et al., 2005; BASCIANO et al., 2005). Devido ao deslocamento das rotas bioquímicas do metabolismo da glicose e lipídeos, produzidas pelo aumento forçado de frutose nas dietas para produzir a síndrome metabólica, obtém-se em resumo:

- 1) Uma porção da frutose é convertida a lactato pelo piruvato;
- 2) Outra porção produz triose fosfatada que rapidamente é convertida a glicose e/ou glicogênio via gliconeogênese;
- 3) Os carbonos derivados da frutose podem ser convertidos à ácidos graxos;
- 4) Inibição da oxidação de lipídeos hepáticos em favor da frutose , síntese de lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL) e re-esterificação de ácidos graxos.

Como resultante, estes carboidratos refinados são rapidamente absorvidos e metabolizados no fígado para produzir glicose e seus derivados. O uso crônico da dieta enriquecida com frutose é capaz de induzir: aumento no peso ponderal devido ao aumento do acréscimo calórico da dieta (>60%), apidossidade, dislipidemia, hipertensão, intolerância a glicose e decréscimo na sensibilidade da insulina em roedores (JOHNSON et al., 2007). Entretanto, o modelo possui as mesmas desvantagens do método anteriormente citado, como: imprecisão na dose absorvida de frutose individualmente por roedores, flutuações na percentagem de frutose usadas nos protocolos experimentais,

obtendo-se magnitudes diferentes nos parâmetros analisados e divergência nas respostas em função do tipo de roedor a ser utilizado (WONG et al., 2016).

Não obstante, o surgimento de protocolos experimentais usando o acréscimo na porcentagem de ácidos graxos tornaram-se o mote de vários pesquisadores para a reprodução da síndrome metabólica. Os estudos utilizaram dietas com faixas entre 20-60% no acréscimo de ácidos graxos obtendo como fonte, óleos vegetais ou gordura animal, estas dietas induziram uma síndrome metabólica mais próxima à obesidade e suas repercussões em sistemas comunicantes, como por exemplo: hiperglicemia, resistência a insulina e dislipidemias com ausência ou mínima influência sobre o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares, o que torna o método mais específico para um determinado grupo de indivíduos síndrome metabólica, apresentando como desvantagem, a observação de melhorias de modo amplo para todos os subtipos de síndrome metabólica a partir de uma intervenção e esta hipótese se alicerça na lipotoxicidade de dietas ricas em ácidos graxos (BUETTNER et al., 2007; ZIVKOVIC et al., 2007) .

Na tentativa de obter-se parâmetros similares na reprodutibilidade da síndrome metabólica, numerosos estudos propuseram-se a equilibrar as concentrações de açúcares/ácidos graxos no acréscimo calórico induzindo uma dieta hipercalórica em ratos Sprague-Dawley ou camindongos C57BL/J6. Estes estudos usaram em geral uma dieta composta por 39% de açúcares de origem de leite condensado, 20% de gordura oriunda de carnes, 17.5% de frutose, 15.5% de ração para roedores pulverizada, 2.5% de misturas de sais minerais e 5% de água), em resultado obteve-se uma maior reprodutibilidade dos efeitos em roedores e comparáveis aos humanos na escala de proporcionalidade em mamíferos (POUDYAL et al., 2010;HAO et al., 2015). Entretanto, a necessidade do uso de gaiolas metabólicas e o ajuste do percentual da dieta, elevam o custo do desenho experimental.

A observação de que alguns tipos de roedores eram mais predispostos a desenvolver a síndrome metabólica nas mesmas condições experimentais, trouxe a discussão sobre a influência genética de roedores e mamíferos à serem geneticamente propensos à síndrome metabólica e/ou torna-los espontâneos aos eventos por deleção gênica ou deficiência em receptores participantes no metabolismo energético e lipídico (WONG et al., 2016).

Os animais geneticamente modificados possuem a praticidade do desenvolvimento espontâneo da patologia em questão para estudos fisiopatológicos e/ou

farmacológicos. No campo da síndrome metabólica pode-se classificar os animais geneticamente predispostos à síndrome metabólica em animais monogênicos ou animais poligênicos, aos quais dão origem a deleção em um ou mais alvo gênico, respectivamente, manifestando assim, alterações fenotípicas, superexpressão gênica de alvo molecular ou ausência gênica do alvo molecular, dando origem aos animais conhecidos como “knock out” (FUCHS et al., 2018).

Um dos animais mais úteis no estudo da obesidade e da síndrome metabólica são os camundongos ob/ob, estes animais possuem uma mutação gênica que não expressa a leptina, um hormônio que possui dentre outras funções a saciedade pós-prandial, assim estes animais manifestam hiperfagia, o que tornam-os predispostos a obesidade e com isto resistência a insulina, expressão de moléculas inflamatórias, adiposidade e diabetes mellitus tipo 2, entretanto, o modelo apresenta como aspecto negativo a infertilidade, sendo necessária para a manutenção da linhagem a identificação prévia de animais Lep-Ob+/- para a reprodução assistida (FUCHS et al., 2018).

Em similaridade, os camundongos db/db desenvolvem obesidade rapidamente, entretanto a mutação gênica nestes animais, se dão pela ausência de receptores para a leptina, assim, possuem mesma origem para a hiperfagia, porém alcançam hiperglicemia de modo mais severo, chegando a obteção de níveis plasmáticos de glicose em torno de 700 mg/dL de modo sustentado, para além da 12 semana de vida dos animais, o que não ocorre em camundongos ob/ob, pois há reversibilidade por feedbacks de retroalimentação do sistema de saciedade (KATSUDA et al., 2014).

Camundongos KK apresentam moderada obesidade e resistência a insulina, com origem na mutação de poligenes, mas não apresentam o conjunto de alterações para originar a síndrome metabólica. Entretanto, a manipulação deste tipo de camundongo, no qual a deleção passa a ser monogênica e portanto, sobre a expressão da proteína responsável pela construção do receptor de melanocortina 4, dá origem a um novo subtipo de linhagem deste camundongo, o camundongo KK-Ay, a deleção do receptor produz alteração sobre a regulação energética, aumentando a magnitude da obesidade, surgimento de diabetes mellitus tipo 2, intolerância a glicose e resistência à insulina apesar destes fatores serem normalizados após 1 ano de vida (Ramos-Rodriguez et al., 2014). Por outro lado a observação de lesão glomerular e glicosúria também são observados neste modelo (WATADANI et al., 2005).

Ratos Zucker, possuem semelhança no desenvolvimento da obesidade aos camundongos ob/ob, com origem na leptina como sinalizador, entretanto este tipo de

animal possui mutação no gene *fa* que causa defeito na expressão de receptores para a leptina, assim, manifestam hiperfagia independente da presença de leptina. Além da leptina, neste modelo há presença de outros hormônios orexígenos, que amplificam o estímulo ao apetite e ao consumo da dieta alimentar. Ratos adultos Zucker apresentam cerca de 40% de gordura, resistência à insulina, mas não alteram a glicose, sem a manifestação da diabetes mellitus tipo 2, portanto, é um modelo mais adequado para os estudos de obesidade e anorexígenos (ALEIXANDRE et al., 2009).

A manipulação gênica destes animais, deram origem aos ratos Zucker-diabéticos-obesos (ZDF), com o surgimento do diabetes tipo 2 e a obesidade, graças a deleção de outros alvos da leptinae suas interações (WANG et al., 2014). Usado agora para estudos para diabetes mellitus tipo 2, os ratos Gotokakizaki (GK), possuem espontaneamente diabetes melitus sem a associação com a presença da obesidade, estes animais surgiram da seleção de ratos wistar com glicemia elevada e cruzamento entre eles. Assim eles manifestam: hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância a glicose e complicações do diabetes, mas não são considerados eficientes para a manifestação completa dos sinais e sintomas da síndrome metabólica (PORTHA et al., 2001).

Agora, com foco na deleção de múltiplos genes, os animais obesos neozelandeses (NZO), apresentam hiperfagia, obesidade juvenil e diabetes tipo 2, estudos recentes mostram a efetividade destes animais desenvolverem um modelo mais compatível com a síndrome metabólica orindas do complexo sistema obesidade-diabetes como causa-consequencia. Entretanto, não são observados danos cardiovasculares significantes (JOOST, 2010; CHO et al., 2007). Roedores JCR:LA apresentam isquemia cardíaca , resistência à insulina e aterosclerose, severa obesidade, mas não uma manifestação semelhante à diabetes mellitus (CHO et al., 2007)

A completa ausência da hipertensão arterial sistêmica sustentada e espontânea nestes modelos, pesam na decisão do uso destes modelos animais como adequado para estudos translacionais da síndrome metabólica animais/humanos. Por outro lado, a observação de que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) possuem predisposição à resistência a insulina e a obesidade, abre uma nova discussão a respeito do uso de animais SHR para mimetizar a síndrome metabólica (ARTIÑANO & CASTRO, 2009). É observada que a gênese da hipertensão nestes animais, advém de alteração no sistema simpático, aumentando seu tônus e inibição da resposta contraregulatória do sistema parassimpático. Sabe-se que o tônus simpático e a liberação exacerbada de catecolaminas possuem estreita correlação com a síndrome metabólica. Por outro lado a ligação entre a

obesidade e síndrome metabólica advém da sinalização deficiente de leptina e hormônios orexígenos (WONG et al., 2016).

Neste sentido, estudos reportam a existência de subtipos de animais SHR, denominados “corpulentos”. Os ratos SHR que manifestam mais facilmente a obesidade, parte da observação de animais estudados por Koletsky, (1970) em que o cruzamento de ratas espontaneamente hipertensas e ratos Wistar-kyoto ou Sprague-Dawley , geravam ratos obesos e hipertensos espontaneamente (SHROB). Mais tarde foi possível observar que estes animais possuíam de maneira espontânea uma mutação monogênica no gene *fa*, que gera uma parada prematura no domínio extracelular de códons para a leptina, resultando em falha no receptor. Como resposta, há resistência a leptina e incapacidade de resposta ao hormônio central e periférica. Estes animais desenvolvem obesidade, hiperinsulinismo, hipertensão (>18^a mmHg entre a 20-30^a semana de vida, dislipidemia e aterosclerose (KASTIN et al., 1999).

Em complementariedade, a observação da existência do subtipo de ratos SHR N-corpulento, leva este nome devido a sua capacidade de produzir hipertensão espontânea e obesidade sem a presença do diabetes mellitus, estes animais possuem efeitos insulino-dependentes normais, sem a manifestação hiperglicêmica. Apresentam obesidade, hipertensão, hiperinsulinemia, glicosúria, proteinúria e intolerância a glicose, mas não diabetes (MICHAELIS et al.,1986).

Diferentemente, os ratos espontaneamente hipertensos NDmc-corpulentos (SHR-cp), são ratos da mesma linhagem que apresentam homozigotos do gene *cp* (*cp/cp*) que induz alterações metabólicas semelhante aos humanos, como: obesidade, aumento da adiposidade, hipertensão, hipercardia, diabetes mellitus e hiperlipidemia (VELASQUEZ et al., 1989; TRIANA et al., 1991). De modo análogo, ratos SHR predispostos ao AVC (SHRSP) é um modelo de animal que desenvolve severa hipertensão, distúrbios neuropáticos, hipertrofia cardíaca, aterosclerose e resistência à insulina. Estes animais são considerados excelentes modelos de estudos de hipertensão e resistência a insulina sem ganho de peso. Entretanto, recentemente a manipulação deste tipo de animal, através da inserção do segmento de mutação no gene de receptor de leptina oriundo dos animais Zucker, originou animais SHRSP(*fa/fa*) com acréscimo de ganho de peso e obesidade ao conjunto de manifestações que se assemelham a síndrome metabólica em humanos (HIRAOLA-YAMAMOTO et al.,2004).

A estreita correlação entre a síndrome metabólica e a esteatose hepática não alcoólica, tem atraído atenção considerável nos últimos anos, assim, estudos de Qi et

al,2005 criou um novo modelo de rato, não obeso entretanto, hipertenso, hepatoesteatótico e síndrome metabólica pela hiperexpressão de elementos proteicos regulatórios de esteróis em ratos SHR. Esta transcrição ativa múltiplos genes envolvidos na síntese de colesterol, triglicérides, ácidos graxos e fosfolípídeos, indicando que a esteatose hepática não alcólica tem origem na síndrome metabólica incluindo, hiperinsulinemia, hiperglicemia e dislipidemia na ausência da obesidade. Este modelo traz a valorosa oportunidade de investigar a patogênese na síndrome metabólica sem obesidade (HORTON et al., 2002; HORTON et al., 2003; QI et al., 2005).

O uso da genética em favor dos estudos fisiopatológicos e farmacológicos traz considerável recurso para a pesquisa experimental, porém, acresce o custo de pesquisas com animais de laboratório altamente seletivos para a doença em questão, trazendo o aspecto financeiro no acréscimo de projetos já custosos na pesquisa experimental em saúde pública.

Neste sentido, o uso de abordagens experimentais com modulações de fármacos ou aparato de cirurgia aparece como uma alternativa ao uso de modelos geneticamente manipulados. Em adição aos estudos com modelos de síndrome metabólica induzido por fármacos e cirurgia, os experimentos com animais adrenalectomizados e tratados com corticoesteroides são capazes de produzir modulações semelhantes à síndrome metabólica, no entanto, a taxa de mortalidade, o custo com aparato cirúrgico e cuidados pós-operatórios, além da necessidade de múltiplas intervenções são desfavoráveis a este modelo experimental (MATOS et al., 2003).

Apesar disto, as bases neuroendócrinas para o surgimento da síndrome metabólica deu origem ao modelo de síndrome metabólica induzidos por glicocorticoides. O modelo surge da observação que os glicocorticoides produzem uma síndrome conhecida como “Síndrome de Cushing”, caracterizada por ganho de peso e redistribuição da adiposidade visceral, edema, episódios hipertensivos, resistência à insulina e diabetes mellitus com o uso crônico dos glicocorticoides em pacientes, os quais são semelhantes à condição da síndrome metabólica (MATOS et al.,2003). Os glicocorticoides endógenos são liberados em condições de estresse e estimulam a glândula adrenal a liberar hormônios. Quando ligados aos receptores atuam diretamente em tecidos induzindo: a) diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros; b) aumentam a lipólise e liberam ácidos graxos; c) aumentam a proteólise do músculo, causando sarcopenia e aumento de aminoácidos na corrente circulatória, que por sua vez ativam o complexo 1 de rapamicina (mTOR1), induzindo resistência à insulina via fosforilação no substrato do receptor de insulina; d)

promovem gliconeogênese no fígado e hiperglicemia e e) aumentam a retenção de sódio e água elevando a pressão arterial (FRANSSON et al., 2013; FERRIS et al., 2012; YOON, 2016).

O uso dos glicocorticoides para induzir síndrome metabólica ocorre por via parenteral intraperitoneal ou através do implante cirúrgico de minibombas osmóticas como sistema de liberação contínua. A facilidade da indução e os efeitos de seu uso (hiperfagia, ganho de peso, resistência à insulina, parcial tolerância à glicose, hipertensão e dislipidemias com depósito de lipídeos no músculo esquelético e fígado) trazem para este método vantagens aos demais, entretanto, a principal desvantagem do método, parece ser originar das críticas científicas da etiopatogenia na translação animais/humanos (WONG et al., 2016).

Indução de síndrome metabólica por fármacos antipsicóticos aparecem como uma alternativa aos casos onde o uso de antipsicóticos geram síndrome metabólica como uma comorbidade da esquizofrenia e transtornos psíquicos (psicóticos). Em fato, o ganho de peso, aumento da gordura visceral, intolerância à glicose e resistência a insulina ocorre em animais e humanos. O enigma do modelo proposto parte da inexistência de mecanismos elucidados para a geração dos efeitos observados em indivíduos e animais expostos aos antipsicóticos (WU et al., 2014; DAVEY et al., 2013). Em longo prazo os antipsicóticos contribuem para o surgimento de dislipidemias e diabetes mellitus (CHASE et al., 2012). O uso mais comum nos protocolos experimentais dar-se pela administração por via oral ou intraperitoneal de olanzapina, um antipsicótico de segunda geração.

Por outro lado, o retorno as bases moleculares do surgimento da síndrome metabólica, ainda que não seja um consenso, é admissível que tenha origem em um elemento neuroendócrino capaz de aumentar a liberação de modo excessivo de catecolaminas. Adicionalmente, as bases genéticas para a predisposição genética de ratos análogos à síndrome metabólica com ou sem esteatose hepática, possui como elemento-chave, a liberação exacerbada de neurotransmissores adrenérgicos (i.e. SHR, SHR N-Corp, SHR cp/cp, SHRSP e SHRSP fa/fa).

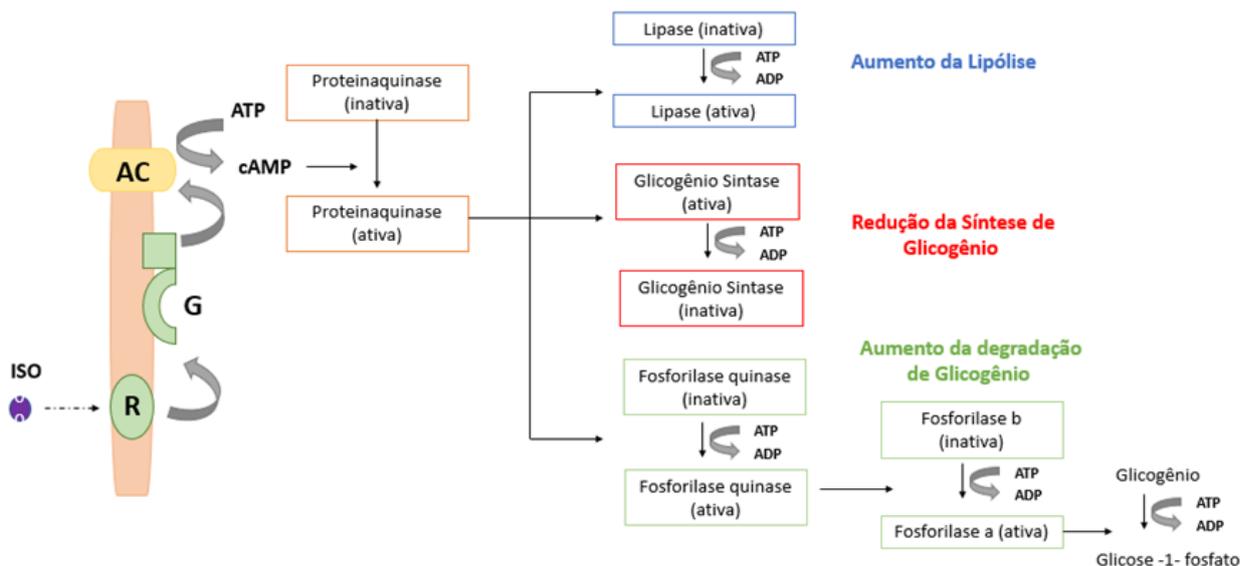
Assim, o papel dos receptores β -adrenérgico tem sido investigado na esteatose hepática na presença ou ausência de síndrome metabólica, usando para isto o isoproterenol, como um fármaco indutor (GHOSH et al., 2012; EZROKHI et al., 2014; NAKADE et al., 2020; Shi et al., 2021; LELOU et al., 2022).

Brevemente, as catecolaminas endógenas (epinefrina, norepinefrina, dopamina) e exógenas (isoproterenol) são neurotransmissores bem conhecidos que estão envolvidos em várias funções centrais como processo de emoções, cognição e memória e também periféricas. Na periferia, são considerados neuro-hormônios e estão envolvidos principalmente na resposta de luta ou fuga, situação que permite ao organismo reagir de forma rápida a uma situação estressante (LELOU et al., 2022).

Esses neurotransmissores são ligantes de receptores acoplados à proteína G. Elas podem ativar os receptores adrenérgicos (ADRs), composto por nove tipos de receptores α 1A , α 1B , α 1D , α 2A , α 2B , α 2C , β 1 , β 2 e β 3, ou receptores de dopamina (DRDs). Esses receptores são acoplados a proteínas G do tipo α que podem ativar ou inibir efetores como fosfolipase C, adenilato ciclase ou canais iônicos (LELOU et al., 2022). É sabido que, as catecolaminas se ligam nos receptores adrenérgicos, e estimulam uma proteína G que ativa adenilato ciclase, que converte ATP em cAMP (AMP cíclico), transformando uma proteína quinase inativa em uma proteína quinase ativa. Essa proteína quinase ativa por sua vez pode causar ação em 3 metabolismos diferentes (Figura 3):

- (I) pode causar o aumento da lipólise;
- (II) reduz a síntese de glicogênio e
- (III) aumentar a degradação do glicogênio

Figura 3- Mecanismo de ação das catecolaminas nos receptores adrenérgicos.



Adaptado de Rang & Dale, 2019.

Estudos de Gosh et al., (2012), mostram que a administração de isoproterenol induziu aumento de gordura nos hepatócitos de camundongos predispostos a síndrome metabólica C57BL/J6, que foi abolido na presença de propranolol (GOSH et al., 2012). Em similaridade, camundongos induzidos a síndrome metabólica por dieta rica em lipídeos em coadministração com isoproterenol ou fenilefrina, produziu esteatose hepática, dislipidemia e aumentou marcadores de lesão hepática quando comparados aos camundongos síndrome metabólica controle (NAKADE et al., 2020).

É reportado que isoproterenol (85 mg/kg s.c.) produz infarto agudo do miocárdio, mediado pelos receptores β -adrenérgico localizados no coração induzindo efeito cronotrópico, inotrópico, lusitropico e dromotrópico positivo (TENÓRIO, 2020) além de exaustiva produção de substâncias oxidantes (REMIÃO et al.,2010). Assim este modelo tem sido exaustivamente usado na compreensão da fisiopatologia do infarto, bem como na avaliação de substâncias cardioprotetoras. Em adição, isoproterenol tem demonstrado o potencial em provocar desbalanço sobre o metabolismo energético e lipídico (LIU et al., 2013, LAN et al., 2022) mostrando-se um possível modelo experimental na avaliação de substâncias bioativas na síndrome metabólica relacionada a doença cardíaca.

2.4. FITOFÁRMACOS COMO ABORDAGEM NA DESCOBERTA DE NOVOS MEDICAMENTOS

A busca por novas fontes de medicamentos remonta as datas mais antigas, ainda que na ausência de tecnologias para refinamento de princípios ativos, as civilizações antigas recorriam aos produtos de origem natural como fonte de medicamento na forma de elixires, xaropes e porções com base no que hoje é conhecido como etnofarmacologia (ELIZABETSKY et al.,2007)

Partindo desse pressuposto, é válido notar que os produtos de origem natural, tem notória participação na inserção de novos fármacos no mercado farmacêutico, desde os tempos mais antigos até os dias atuais. Dados de Newman & Cragg, (2020), mostram que os produtos naturais quer sejam na forma de extratos e/ou compostos naturais isolados equivalem à 41,9% de todas os novos fármacos aprovados para comercialização e 58% de compostos sintéticos, ainda que, destes compostos sintéticos 11% possuem o grupo farmacofórico de origem natural e 11,5 % dos sintéticos são inspirados nos produtos naturais, com efeito farmacológico apropriado (NEWMAN & CRAGG, 2020).

No Brasil, aproximadamente 82% da população do nosso país recorrem aos produtos naturais à base de plantas para tratamento de seus agravos de saúde, uma saída para um tratamento farmacológico com bases científicas e em sua maioria de baixo custo efetivo é o uso de fitoterápicos (ABIFITO,2004). Em 2001, o ministério de saúde do Brasil, lançou o programa nacional de plantas medicinal e fitoterápico, fornecendo uma relação de medicamentos fitoterápicos úteis na atenção básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos aprovada pelo decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, surgiu com o objetivo de garantir a população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos de modo a promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva bem como da indústria nacional, além de ampliar as opções terapêuticas de modo seguro e eficaz integrado aos serviços de saúde, preservando o conhecimento tradicional, elevar a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovações integradas à plantas medicinais e fitoterápicos nas várias fases da cadeia produtiva (PNPMF/ 2006).

Conforme a resolução nº26 de 13 de maio de 2014, publicada pela agencia nacional de vigilância sanitária, os fitofármacos são considerados substâncias purificadas e isoladas de origem vegetal com estrutura química definida e atividade farmacológica existente, quer seja, sua propriedade medicinal, profilática, paliativa ou curativa (RDC 26/2014).

De acordo com os estudos de Calixto, (2019), os produtos naturais são responsáveis por 35 % de 1.1 trilhão de dólares anualmente no mercado financeiro a nível global. O Brasil tem contribuído de modo significativo na pesquisa farmacológica de produtos naturais devido a sua biodiversidade, entretanto a translação ao mercado farmacêutico ainda é reduzido, tendo sua contribuição apenas com 3 medicamentos fitoterápicos: Acheflan ® (Aché Laboratórios)- obtida do óleo essencial de *Codia verbenaceae* com atividade analgésica e antiinflamatória, Syntocalmy® (Aché Laboratórios)- obtido das folhas de *Passiflora incarnata* com propriedades ansiolítica e hipnótica e Melagrião® (Laboratório catarinense farmacêutico)- desenvolvido a partir do extrato das folhas de *Mikania glomerata* útil no alívio da tosse e asma. Apesar de pequena a contribuição brasileira no mercado P&D farmacêutica em 2016 cada um destes produtos foram responsáveis por movimentar 30.3, 28.6 e 23.6 milhões de reais respectivamente, demonstrando assim uma promissora área no mercado financeiro, além

da contribuição direta para a população com bases etnofarmacológicas (CALIXTO,2016).

Alguns entraves podem ser apontados por Calixto, (2016) dentre eles: dificuldades a interface e articulação entre pesquisadores e a indústria farmacêutica com uma visão baseada no desenvolvimento de pesquisas com viés de inovação tecnológica e biodiversidade com aplicação facilitada para companhias farmacêuticas, além do baixo incentivo governamental na área de ciência, tecnologia e desenvolvimento industrial para as universidades e institutos de pesquisa no país (CALIXTO, 2016). Cabe aqui ainda a observação de Tenório, 2019 a inexistência de uma rede consistente e solida de indústrias estaduais que possam se conectar com o desenvolvimento dos estudos realizados nas universidades como uma continuidade entre estatais, funcionando como uma alavanca e força motriz para a consolidação da indústria farmacêutica brasileira, laborando como uma cooperação mútua na relação universidade-produto-população (TENÓRIO, 2019).

Por outro lado, a veiculação de fitofármacos no mercado mundial, traz consigo a viabilidade do desenvolvimento de produtos farmacêuticos baseada em produtos naturais. Os digitálicos oriundos da *Digitalis purpúrea* conhecida como “dedaleira” útil no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e os anticancerígenos: vincristina e vimblastina obtidos das flores de *Catarantheus roseus* conhecida como alcaloides da vinca são úteis no tratamento do câncer de mama até os dias atuais (BARREIRO & MANSUR, 2008).

Neste contexto, algumas moléculas vem sendo alvo de diversos estudos com potencial de tornar-se um protótipo de fitofármaco ou nutracêutico. Cabe aqui ressaltar, que em alguns países estes termos não são diferentes ao referir-se a uma molécula oriunda de produto natural com finalidade terapêutica, o que confunde a população e prescritores em torno das diferenças entre um alimento funcional, logo nutracêutico, e fitofármaco, já definido anteriormente

Na área cardiovascular os flavonoides e compostos terpênicos vem ganhando destaque por suas propriedades farmacológicas promissoras. O resveratrol, um flavonoide obtido de vinhos e derivados da *Vitis vinífera*, é atualmente a molécula mais promissora a se tornar verdadeiramente proporções de um fitofármaco, com atividade cardiovascular que pode ser útil no tratamento da hipertensão arterial, dislipidemias, infarto agudo do miocárdio e distúrbios cardiometabólicos (BASHARAT et al.,2020).

Não obstante, a observação da saúde cardiovascular das comunidades do mediterrâneo, trouxe a perspectiva de avaliar compostos ativos em derivados de uvas,

creditando a estes suas propriedades de longevidade do sistema cardiovascular. Miricetina, outro flavonóide, também encontrado em uvas e seus derivados, demonstram as mesmas propriedades cardiovasculares do resveratrol, além de mostrar atividade na redução da síndrome metabólica de ratos em modelo de dieta rica em açúcares e gordura (RAVIRAJSIH & RANJITSINH, 2014).

Kaemferol, um flavonóide, já comercializado na atualidade, possui atividades farmacológicas contra diabetes mellitus, dislipidemias, aterosclerose e previne doenças cardiovasculares em humanos, atuando na regulação da via ASK1/MAPkinase reduzindo o estresse oxidativo das doenças cardiometabólicas (HONG et al., 2017).

Narigenina, outro flavonóide desta vez isolado de espécies de laranjas, também já se encontra disponível para comercialização, possui uma ampla variedade de ações farmacológicas, entretanto, sua atividade antiadipogênica associada aos efeitos cardioprotetores, tem sido o mote de sua comercialização, estimulando o consumo de atletas e indivíduos com risco cardiovascular elevado (SALEHI, B et al., 2019).

Em similaridade, os compostos terpênicos movimentaram 12 US\$ bilhões nas indústrias farmacêuticas e de higiene em 2002, devido as suas ações promissoras farmacológicas (WANG et al, 2005). Não obstante, o interesse dos compostos terpênicos e suas aplicações sobre o sistema cardiovascular e metabólico têm crescido na última década (SANTOS et al, 2011; ALVES-SILVA et al, 2016).

Mentol foi um dos primeiros compostos terpênicos que atraiu a atenção da comunidade científica há anos atrás (MIKALI et al., 2013). Hoje, útil como composto ativo em produtos de higiene como pastas dentais, dentifrícios, shampoos de alta eficiência (PRASAD et al., 2019), mentol teve seu crédito associado as suas propriedades antimicrobianas (SINGH et al., 2015) e vasodilatadoras (CRAIGHEAD et al., 2017).

O fato é que desde seu isolamento da *Mentha x piperita*, este monoterpene abriu um grande terreno a serem explorados, os compostos terpênicos enquanto produtos terapêuticos. Sabe-se que suas propriedades sensoriais estão associadas à ação em canais pertencentes ao receptor de transiente de melastina 8, da família A (TRPM8) em órgãos sensoriais, por isso sua efetividade em causar a sensação de refrescância em produtos de higiene pessoal, pastilhas e produtos culinários (FARCO et al., 2013), sem desconsiderar as atividades antimicrobianas já citada. Em adição, o mesmo alvo farmacológico é encontrado nos tecidos cardiovasculares e os benefícios cardiovasculares advém dos efeitos em modular o transiente de cálcio via TRPM8 (JOHNSON et al., 2009; BAYLIE et al., 2010).

Outro monoterpeneo, em constante proeminência a se tornar um fitofármaco é o carvacrol, isolado do óleo de orégano (*Origanum vulgare*), suas atividades farmacológicas promissoras vão desde atividade analgésica até atividades antidiabéticas, antimutagênicas e hepatoprotetoras (BASER, 2018).

Recentemente, o uso do carvacrol na redução da hipertensão espontânea em ratos em conjunto com treino aeróbico, revelaram sua importância no controle efetivo da hipertensão arterial e tem sido sugerido seu uso como coadjuvante na terapia cardiovascular de pacientes hipertensos (COSTA et al., 2021). Além disto, o potencial do carvacrol em prevenir a obesidade em ratos induzidos por dietas, mostram que o carvacrol é capaz de modular a expressão de genes que estão envolvidos na adipogênese e na inflamação produzida na síndrome metabólica (CHO et al., 2012). Os efeitos de carvacrol sobre a adipogênese foi avaliada mais recentemente, e é reportado que este monoterpeneo induz autofagia devido a sua modulação em transcritores gênicos como ChREBP (SPALETTA et al., 2018).

Timol é outro monoterpeneo que têm atraído a atenção da comunidade científica em sua prospecção a ser um potencial fármaco terapêutico em desenvolvimento farmacêutico. Estas propriedades incluem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antihiperlipidêmica (MEERAN et al., 2017). Recentemente, estudos de Santos et al, (2016) mostraram que o timol é capaz de produzir efeito cardioprotetor em ratos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão (SANTOS et al., 2016).

Os efeitos de formas entantioméricas de α -terpineol demonstrou a capacidade antiobesidade em modelo de dieta hipercalórica, estes resultados parecem se correlacionar com ações anti-inflamatória em ratos Sprague-Dawley (DE SOUZA et al., 2020). Os efeitos cardioprotetores de α -terpineol, também foram recentemente reportados em modelo de isquemia reperfusão induzida por isoproterenol (TENÓRIO et al., 2021).

Não obstante, as resinas de *Protium hepthaphylum* produziu efeitos cardiometabólicos, reduzindo a hiperlipidemia, desordens metabólicas e regulou a glicose produzindo redução da síndrome metabólica em modelo de obesidade hiperlipídica, suas ações parecem envolver a inibição de mediadores pró-inflamatórios, e α -terpineol tem sido apontado como a molécula majoritária do óleo obtido destas resinas (CARVALHO et al., 2015).

Entretanto os efeitos diretos do α -terpineol isolado sobre as alterações metabólicas lipídicas, glicídicas e hepáticas permanecem desconhecidas até o momento, bem como, a correlação destes com a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares.

Baseado nestas premissas, este trabalho hipotetiza se α -terpineol é capaz de melhorar parâmetros cardiometabólicos em ratos hipertensos e induzidos ao infarto com isoproterenol e ainda se propõe a avaliar se o isoproterenol seria um possível modelo de induzir síndrome metabólica em ratos espontaneamente hipertensos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito α - terpineol isolado nos distúrbios cardiometabólicos induzidos por isoproterenol em ratos SHR e infartados.

3.2. Objetivo Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do α - terpineol sobre o peso corporeo de ratos SHR previamente tratados e infartados;
- ✓ Verificar os efeitos do α - terpineol sobre os parâmetros lipídicos (triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL) de ratos SHR previamente tratados e infartados;
- ✓ Investigar os efeitos do α - terpineol sobre os parâmetros glicêmicos de ratos SHR previamente tratados e infartados;
- ✓ Aferir o efeito do α - terpineol sobre a resistência a glicose em ratos SHR;
- ✓ Verificar os efeitos do α - terpineol sobre os marcadores de lesão hepática (TGP e γ -GT) de ratos SHR previamente tratados e infartados;
- ✓ Avaliar os efeitos do α - terpineol sobre a morfometria de fígados de ratos SHR previamente tratados e infartados;
- ✓ Investigar os efeitos do α - terpineol sobre a microarquitura de fígados de ratos SHR previamente tratados e infartados.
- ✓ Conferir os efeitos do isoproterenol como um novo modelo para induzir síndrome metabólica em ratos espontaneamente hipertensos .

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Substâncias

4.1.1 Anestésicos

Tiopental sódico (Cristália, BR), Cetamina (Syntec, BR), Xilazina (Syntec, BR).

4.1.2 Reagentes Analíticos

Nifedipina, isoproterenol, cremophor, PBS, glicose, glibenclamida (Sigma Aldrich, USA), formaldeído, ácido acético glacial, ácido pícrico, xileno, Sais inorgânicos (Dinamica, Br) parafina granulada 56-58°, parafina granulada 58-62° (Synth, BR), hematoxilina de harris, eosina (Biopac, BR), ácido tricloroacético (Quimesp, BR).

4.1.3 Kits Bioquímicos

Colesterol total liquiform, triglicérides liquiform, TGP liquiform, Gamma GT liquiform, Calcio liquiform, Glicose liquiform (Labtest, BR), Glicosímetro e tiras teste (Accu check[®], USA).

4.2 Extração e obtenção do monoterpeneo

O alpha-terpineol foi cedido pelo professor Lucindo Quitans Junior, da Universidade Federal de Sergipe, uma instituição parceira da nossa universidade para o estudo desenvolvido.

4.3 Animais

Foram utilizados em todos os protocolos farmacológicos descritos neste trabalho, 45 ratos adultos jovens, machos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR), sadios, pesando entre 150 e 250 gramas que foram procedentes do Biotério Central da UFAL, Maceió, AL. Os animais foram previamente acondicionados em gaiolas plásticas coletivas, contendo cinco animais por gaiola, mantidos em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos, temperatura ambiente de aproximadamente 25°C e umidade mantida por ar condicionado, conforme preconizado pelo Conselho Canadense de Experimentação Animal (Olfert, 1993). Os ratos eram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab, BR) e água filtrada “*ad libitum*”. A troca da

maravilha foi realizada três vezes por semana. Antes do início do experimento, os animais foram submetidos por um período de adaptação no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Farmacêuticas (LFC-ICF) por sete dias. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFAL, sob número de protocolo 09/2015.

4.4 Abordagens farmacológicas

Para avaliar o efeito do alpha-terpineol sobre o metabolismo glicídico e lipídico em ensaio crônico, nós utilizamos o método de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol, de acordo com a técnica descrita por Rajadurai & Prince, 2006. Os animais da linhagem SHR eram aleatoriamente alocados em 5 grupos experimentais, contendo 5 ratos por grupo:

G1 – Grupo salina (grupo que recebia solução salina 0,9% V.O por 15 dias)

G2 – Grupo infartado por isoproterenol (grupo que recebia solução salina 0,9% V.O. por 15 dias + isoproterenol 85mg/kg s.c. 14° e 15° dias)

G3- TPN 25 mg/kg +ISO (grupo que recebia alpha-terpineol na dose de 25mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c. 14° e 15° dia)

G4- TPN 50 mg/kg +ISO (grupo que recebia alpha-terpineol na dose de 50mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c. 14° e 15° dia)

G5- TPN 75 mg/kg +ISO (grupo que recebia alpha-terpineol na dose de 75mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c. 14° e 15° dia).

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados e em seguida foram realizadas as avaliações bioquímicas, morfométricas e histopatológicas.

4.5 Avaliação Bioquímica

Após a eutanásia por exsanguinação sob anestesia (Cetamina 80mg/kg + Xilazina 4mg/kg i.p). Os animais foram submetidos a uma toracotomia e uma punção cardíaca foi realizada. O sangue colhido foi centrifugado 5.000 rpm por 15 minutos e o soro foi obtido como amostra para dosagens bioquímicas (colesterol total, triglicérides, HDL e).

4.5.1 Dosagem dos níveis lipídicos

Os níveis lipídicos foram estimados pelas dosagens de colesterol total e dosagens de triglicerídeos dos soros sanguíneos.

4.5.1.1 Dosagem de colesterol

1000 µL do reagente 1 (Tampão fosfato 50 mmol, fenol 24 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4-aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase 250 U/L, colesterol oxidase 250 U/L e peroxidase 1000 U/L) foi misturada à 10 µL da amostra, inserida em espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu), as absorbâncias foram lidas à 505 nm em modo colorimétrico. Em seguida, o colesterol total foi calculado:

$$\text{Colesterol total (mg/dL)} = (\text{Absorbância da amostra/Absorbância do padrão}) \times 200$$

4.5.1.1.1 Dosagem de HDL

190 µL de reagente 1 (ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L) foram misturados com 10 µL de amostra (soro) e as absorbâncias foram lidas a 500 nm em um espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu). Depois o HDL foi calculado:

$$\text{HDL} = (\text{Absorb. da amostra} / \text{Absorb. do Padrão}) \times 20 \text{ (concentração do calibrador)}$$

4.5.1.1.2 Dosagem de LDL

145 µL de reagente 1 (tampão fosfato, 4-aminoantipirina, colesterol esterase, colesterol oxidase, peroxidase, ascorbato oxidase e surfactante) foram misturados com 10µL de amostra (soro) e as absorbâncias foram lidas a 546 nm em espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) por 5 min, após essa leitura foram adicionados 45µL de reagente 2 (tampão fosfato, surfactante e DSBmT) e as absorbâncias foram lidas novamente a 546 nm em espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) por 5 min, totalizando 10min de leitura . Depois, o LDL foi calculado:

$$\text{LDL} = (\text{Absorb 2} - \text{Absorb 1 (amostra)}) / (\text{Absorb 2} - \text{Absorb 1 (padrão)}) \times 113 \text{ (concentração do calibrador)}$$

4.5.1.1.3 Dosagem de VLDL

O VLDL foi estimado através da fórmula de Friedewald, assim expressa:

$$\text{VLDL} = \text{triglicérides}/5$$

4.5.1.2 Dosagem de triglicérides

Para determinação dos níveis séricos de triglicerídeos, foi utilizado o método descrito por Trinder e cols, 1969. Assim, 1000 µL do reagente 1 (Tampão fosfato 50 mmol/L, magnésio ionizado 4 mmol/L, 4-clorofenol 2,7 mmol/L, 4-aminoantipirina µmol/L, ATP 1,8 mmol/L, lipoproteína lipase 1.400 U/L, glicerol quinase 1.000 U/L, glicerol fosfato oxidase 1.500 U/L, peroxidase 900 U/L e azida sódica 0,095%) foi misturada à 10 µL da amostra que foi inserida em um espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) em modo colorimétrico, as absorbâncias foram lidas à 505 nm. Em seguida, os níveis de triglicérides foram calculados:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = (\text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância do padrão}) \times 200.$$

4.5.1.3 Dosagem de TGP

Para a determinação da Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), foi utilizado o método cinético UV, de acordo com os procedimentos descritos por Westgard et al, 1981. Assim, uma mistura prévia do reagente 1 (Tampão tris 132,5 mmol/L; L-alanina 687,5 mmol/L, LDH ≥ 2300 U/L e azida sódica 0,095%) foi adicionado ao reagente 3 (Tampão tris 20 mmol/L, piridoxal fosfato 11,1 mmol/L e azida sódica 0,095%) na proporção 1:80, em seguida as cubetas foram calibradas e ajustadas à 0 com água destilada. Em sequência 10 µL de cada amostra foi aquecida em banho maria à 37° C por 5 minutos. Logo após, rapidamente incubada com 20 µL do reagente 2 (tampão tris 20 mmol/L; NADH 1320 µmol/L; cetoglutarato 82,5 mmol/L e azida sódica 0,095%), por fim adicionados 800 µL da mistura de reagentes, então aguardou-se 1 minuto para a estabilização. Foram então procedidas as leituras das absorbâncias na faixa de 340 nm em aparato de espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) antes e após 2 minutos da reação. O mesmo foi realizado com controle interno do teste como agente calibrador. Os níveis de TGP foram calculados de acordo com a fórmula:

$TGP = (Absorb\ 2 - Absorb\ 1\ (amostra) / Absorb\ 2 - Absorb\ 1\ (padr\tilde{a}o)) \times []$ do agente calibrador

4.5.1.5 Dosagem dos nívéis de Gamma Glutamil Transferase

Para a determinação da atividade da Gamma glutamil transferase foi utilizado o método cinético em ultravioleta de acordo com o método de Szasz, 1969 modificado. Assim o reagente 1 (Glicilglicina 197 mmol/L e azida sódica $\leq 0.095\%$) foi adicionado ao reagente 2 (L- γ -glutamyl-3carboxy-4-nitroanilida 21 mmol/L e azida sódica $\leq 0.095\%$) na proporção 1:4. Em seguida 5 μ L da amostra foi adicionada as cubetas previamente zeradas e ajustadas com água destilada, logo após 1000 μ L da mistura de reagente foi adicionada e as leituras das absorbancias foi realizada em aparato de espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) na faixa de 405 nm antes e após 2 minutos da reação. O mesmo foi realizado com controle interno do teste como agente calibrador. Os nívéis de GGT foram calculados de acordo com a fórmula:

$GGT = (Absorb\ 2 - Absorb\ 1\ (amostra) / Absorb\ 2 - Absorb\ 1\ (padr\tilde{a}o)) \times []$ do agente calibrador

4.5.1.6- Dosagem de glicemia em jejum

Para a determinação da glicemia em jejum foi utilizado o método colorimétrico de acordo com o método de Trinder e cols. Para isto 3 tubos de ensaio independentes foram usadas, na primeira havia apenas o reagente 1 na concentração de 1000 μ L (tampão fosfato 30 mmol/L; pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glicose oxidase ≥ 12500 U/L; peroxidase ≥ 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; azida sódica 7.5 mmol/L e surfactantes q.s.p.) este foi tomado como reagente branco da reação No segundo tubo de ensaio havia 10 μ L da amostra e adicionado 1000 μ L do reagente 1 (tampão fosfato 30 mmol/L; pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glicose oxidase ≥ 12500 U/L; peroxidase ≥ 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; azida sódica 7.5 mmol/L e surfactantes q.s.p.) e esta foi usada como teste, enquanto no terceiro tubo de ensaio foi utilizada 10 μ L do reagente 2 (padrão interno) e então adicionado 1000 μ L do reagente 1 (tampão fosfato 30 mmol/L; pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glicose oxidase ≥ 12500 U/L; peroxidase ≥ 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; azida sódica 7.5 mmol/L e surfactantes q.s.p.). Cada tubo de ensaio foi incubado em banho maria à 37°C agitando vigorosamente os tubos ao final as absorbancias foram lidas na faixa de 505 nm em aparato de espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240

Shimadzu), os ajustes ao branco foram procedidos e a intensidade da coloração de cada amostra foi lida no UV. O cálculo da glicose foi obtida pela fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância da amostra} \times 100$$

4.6 Avaliação das medidas antropométricas:

Antes e após o tratamento crônico todos os ratos foram pesados em balança semi-analítica (Schimadzu), para estimar as variações na média do peso entre os grupos antes e após as intervenções farmacológicas.

4.7 Avaliação morfológica e morfométrica

Após a retirada do fígado, estes foram limpos de tecidos aderentes. Os fígados foram pesados de acordo com o método de Scherle. Após a pesagem, os fígados foram fotografados *in natura* e então cuidadosamente dissecados. O peso do fígado foi equilibrado com o peso corporal, bem como, com o peso do fêmur dos ratos. Foram avaliados: localização anatômica da ocorrência dos acúmulos dos vacúolos de gordura, assim como, alterações sobre os parâmetros morfométricos: peso corpóreo, peso do fígado, peso do fígado/peso corpóreo, peso do fígado/peso do fêmur.

4.7 Avaliação histológica

Os fígados foram lavados com solução fisiológica 0,9% e limpos de tecidos conectivos, em seguida 1/3 do lobo direito foi usado como uma padronização das amostras entre os grupos. O lobo então foi delicadamente dissecado e fixado em formalina 10% em overnight de 12 horas. Após esse processo lavagens com graus crescentes de álcool foram realizados para desidratar a peça histológica, em seguida xilol foi usado para diafanizar a peça e por fim banhos de parafina sob aquecimento foram procedidas para obtenção do bloco histológico. Cada bloco foi cortado de maneira semi-seriada e fixados em lâminas histológicas com ovoalbumina e coradas com hematoxilina-eosina, por fim foram devidamente seladas com microlaminas de vidro e a leitura foi realizada em microscopia óptica. Os danos hepáticos foram avaliados de acordo com o grau e a extensão das lesões, avaliando para isto os parâmetros quali-quantitativos: contagem de adipócitos totais, edema, hiperplasia/atrofia dos hepatócitos, hemorragia, zonas necróticas e fibrose.

4.8 Avaliação do teste de tolerância oral à glicose:

Para a avaliação da resistência à glicose ratos espontaneamente hipertensos em jejum de 12 horas foram aleatoriamente agrupados em 7 grupos experimentais:

G1 – Grupo sal (grupo que recebeu solução salina 0,9% V.O)

G2 – Grupo glu 2 g/kg (grupo que recebeu 2 g/Kg de solução de glicose + solução salina 0,9% V.O.)

G3- TPN 25 mg/kg + 2 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 25mg/kg V.O. + 2 g/Kg de solução de glicose V.O.)

G4- TPN 50 mg/kg + 2 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 50 mg/kg V.O. + 2 g/Kg de solução de glicose V.O.)

G5- TPN 75 mg/kg + 2 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 75mg/kg V.O. + 2 g/Kg de solução de glicose V.O.)

G6- TPN 50 mg/kg sem glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 50 mg/kg V.O.)

G7- Glibenclamida 10 mg/kg + 2 g/kg glu (grupo que recebeu glibenclamida na dose de 10 mg/kg V.O. + 2 g/Kg de solução de glicose V.O.)

Após a administração por gavagem os níveis glicídicos foram testados por glicemia capilar (Accu check, USA) nos tempos: 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Uma curva dose-resposta foi construída em função do tempo avaliando a função da insulina em resposta ao estímulo da administração oral de glicose.

4.9. Avaliação do teste de tolerância intravenoso à glicose:

Para a avaliação da resistência à glicose ratos espontaneamente hipertensos em jejum de 12 horas foram aleatoriamente agrupados em 7 grupos experimentais:

G1 – Grupo sal (grupo que recebeu solução salina 0,9% V.O)

G2 – Grupo glu 1 g/kg (grupo que recebeu 1 g/Kg de solução de glicose i.v + solução salina 0,9% V.O.)

G3- TPN 25 mg/kg + 1 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 25mg/kg V.O. + 1 g/Kg de solução de glicose i.v.)

G4- TPN 50 mg/kg + 1 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 50 mg/kg V.O. + 1 g/Kg de solução de glicose i.v.)

G5- TPN 75 mg/kg + 1 g/kg glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 75mg/kg V.O. + 1 g/Kg de solução de glicose i.v.)

G6- TPN 50 mg/kg sem glu (grupo que recebeu alpha-terpineol na dose de 50 mg/kg V.O.)

G7- Glibenclamida 10 mg/kg + 1 g/kg glu (grupo que recebeu glibenclamida na dose de 10 mg/kg V.O. + 1g/Kg de solução de glicose i.v)

Após a administração intravenoosa os níveis glicídicos foram testados por glicemia capilar (Accu check, USA) nos tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Uma curva dose-resposta foi construída em função do tempo avaliando a função da insulina em resposta ao estímulo da administração intravenoso de glicose.

4.10 Análise estatística

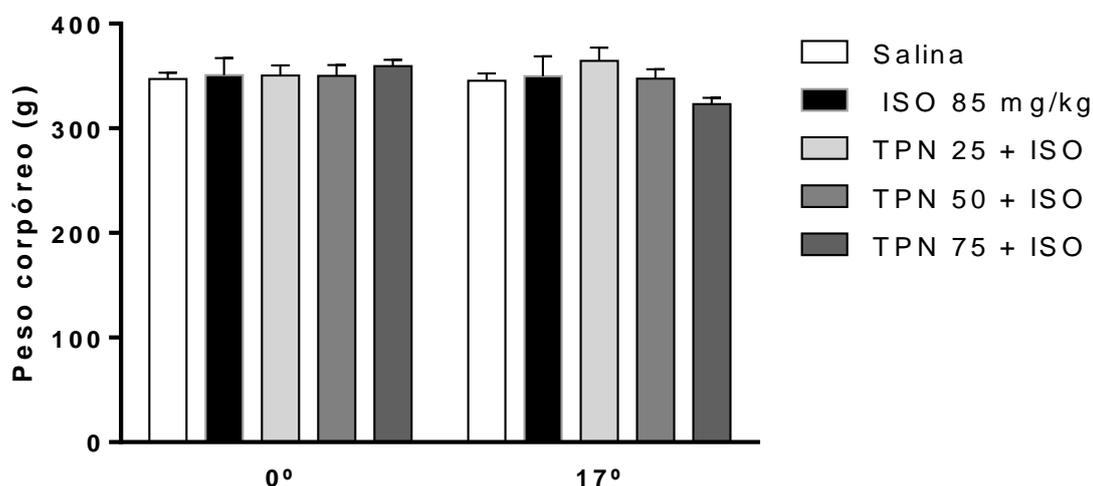
Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). O teste “t” de Student não pareado foi usado para a comparação entre duas variáveis. Enquanto, a análise de variância one-way ANOVA foi usada para comparações de mais de duas variáveis, seguida do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Adotou-se o valor de $p \leq 0,05$ nos resultados das variáveis. Isso representa uma chance em vinte do evento ter ocorrido ao acaso como resultado de um erro amostral. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do alpha-terpineol sobre o peso corpóreo de ratos SHR e infartados por isoproterenol

Antes do início de todo o protocolo experimental, todos os grupos de ratos foram pesados, observa-se que no dia 0º não houve diferença significativa entre a média do peso dos ratos nos diferentes grupos experimentais: Salina = $347,2 \pm 5,8$; ISO = $350,8 \pm 16,3$; TPN 25 + ISO = $350,4 \pm 9,7$; TPN 50 + ISO = $350,4 \pm 10,3$ e TPN 75 + ISO = $359,4 \pm 6,0$ g respectivamente (Gráfico 1, página 51). Ao 17º dia observou-se que a indução experimental com isoproterenol não produziu alteração significativa sobre o peso médio corpóreo em relação ao grupo controle salina (ISO = $350,8 \pm 16,3$ vs. Salina = $347,2 \pm 5,8$) Gráfico 1 página 51. Em similaridade, o tratamento prévio com alpha-terpineol e indução com isoproterenol também não alterou de modo significativo o peso médio entre o grupo dos ratos, bem como, comparado ao dia 0º: Salina $345,6 \pm 6,9$; ISO = $349,8 \pm 18,9$; TPN 25 + ISO = $364,4 \pm 12,6$; TPN 50 + ISO = $347,6 \pm 9,0$ e TPN 75 + ISO = $323,0 \pm 6,9$ g respectivamente (Gráfico 1, pág 51).

Gráfico 1- Média de peso corpóreo dos ratos antes e após o tratamento crônico com alpha-terpineol. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. n=5

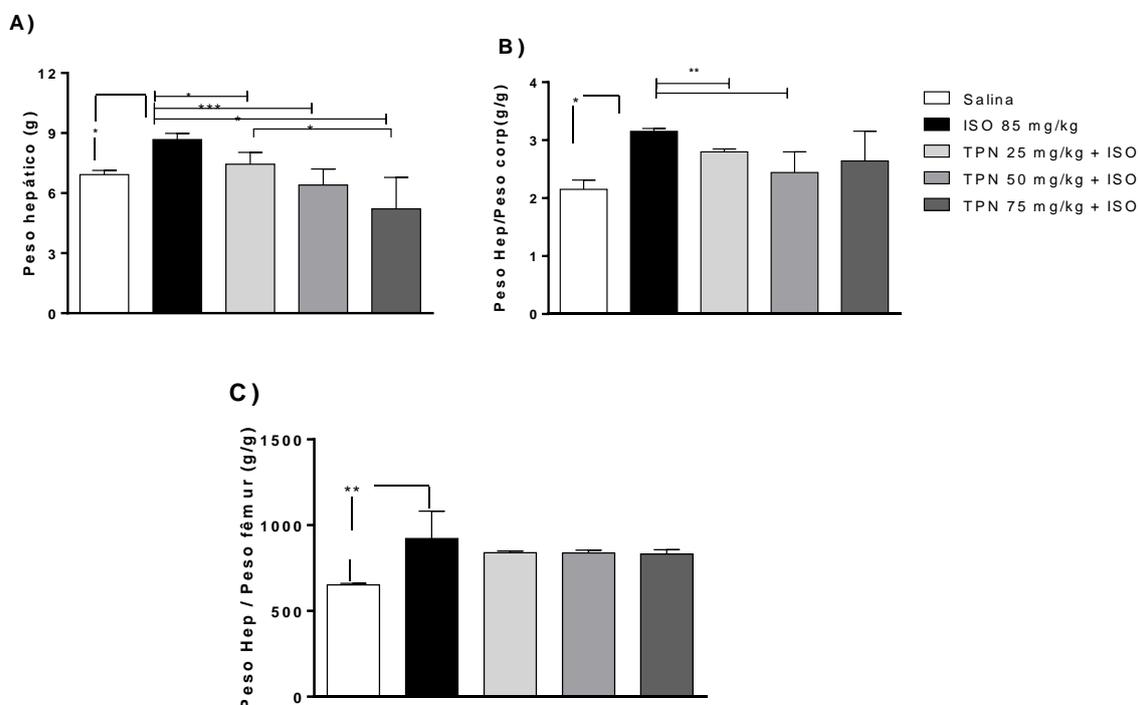


Fonte: AUTORA, 2022

5.2 Efeito do alpha-terpineol sobre a morfometria de fígado de ratos SHR e infartados por isoproterenol.

A indução do tratamento com isoproterenol foi capaz de aumentar significativamente o peso médio do fígado dos ratos em comparação ao grupo controle salina (ISO= $8,67 \pm 0,31^*$ vs. salina= $6,92 \pm 0,22$ g) Gráfico 2A, página 53. O peso médio úmido dos fígados de ratos foi significativamente diferentes após o tratamento prévio com alpha-terpineol em comparação os respectivos grupos controle salina e isoproterenol: Salina = $6,92 \pm 0,22$; ISO= $8,67 \pm 0,31^*$; TPN 25+ ISO= $7,44 \pm 0,60^{**}$; TPN 50+ ISO= $6,40 \pm 0,36^{***}$ e TPN 75 + ISO= $6,68 \pm 0,64^{***}$ g, respectivamente (Gráfico 2A, página 53). Ao realizar a normalização do peso dos fígados úmidos sobre o peso corpóreo, observou-se que a indução do infarto com isoproterenol foi capaz de aumentar a relação proporcional do peso dos fígados sobre o peso corpóreo (ISO= $3,15 \pm 0,05^*$ vs. Salina= $2,15 \pm 0,16$ g/g) Gráfico 2B, página 53. O tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento da relação proporcional peso dos fígados úmidos sobre o peso corpóreo mesmo após a indução com isoproterenol: Salina= $2,15 \pm 0,16$; ISO= $3,15 \pm 0,05^*$; TPN 25+ ISO= $2,80 \pm 0,05^{***}$; TPN 50 + ISO= $2,44 \pm 0,16^{**}$ e TPN 75 + ISO= $2,64 \pm 0,23^*$ g/g, respectivamente (Gráfico 2B, página 53). Ao relacionar o peso dos fígados úmidos com o peso do fêmur, observou-se que o isoproterenol foi capaz de induzir aumento na relação proporcional do peso do fígado úmido com o peso do fêmur (ISO= $922,0 \pm 71,5^{**}$ vs. Salina= $651,72 \pm 9,24$ g/g Gráfico 2C, página 53. O tratamento prévio com alpha-terpineol não foi capaz de inibir o aumento proporcional do peso úmido do fígado em razão do peso do fêmur: Salina= $651,72 \pm 9,24$; ISO= $922 \pm 71,5^{**}$; TPN 25 + ISO = $839,40 \pm 9,51$; TPN 50 + ISO = $837,91 \pm 7,48$ e TPN 75 + ISO= $832,40 \pm 10,70$ g/g respectivamente. Gráfico 2C, página 53.

Gráfico 2- Efeito do alpha-terpineol sobre a morfometria dos fígados de ratos SHR e infartados por isoproterenol. A) peso úmido dos fígados; B) Razão do peso hepático sobre o peso corpóreo e C) Razão do peso hepático sobre o peso do fêmur. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando $*p>0.05$; $**p>0.01$ e $***p>0.001$ (Salina vs. ISO) e (TPN vs ISO e/ou Salina) $n=5$.

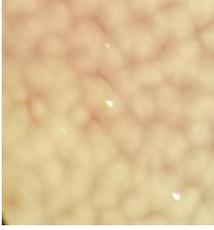


Fonte: AUTORA, 2022

5.3 Efeito do alpha-terpineol sobre a morfologia macroscópica dos fígados de ratos SHR e infartados com isoproterenol

Isoproterenol foi capaz de induzir o aumento do estoque de gordura hepática corados em regiões amarelas em relação ao grupo controle salina corados em vermelho. Quadro 1, página 54. Porém o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento no estoque intracelular de gordura nos fígados que parece ser de modo dose dependente, pois quanto maior a dose administrada nos grupos de ratos, maior as regiões coradas em vermelho e menor as regiões coradas em amarelo Quadro 1, página 54. Morfologicamente o tratamento com alpha-terpineol foi capaz de preservar a viabilidade de hepatócitos e funcionalidade celular com inibição do estoque gorduroso que leva a um desvio de função hepática de órgão de biotransformação para órgão de reserva gordurosa Quadro 1, página 54.

Quadro 1- Aspectos morfológicos de fígados isolados de ratos SHR após o tratamento subagudo com alpha-terpineol. N=5

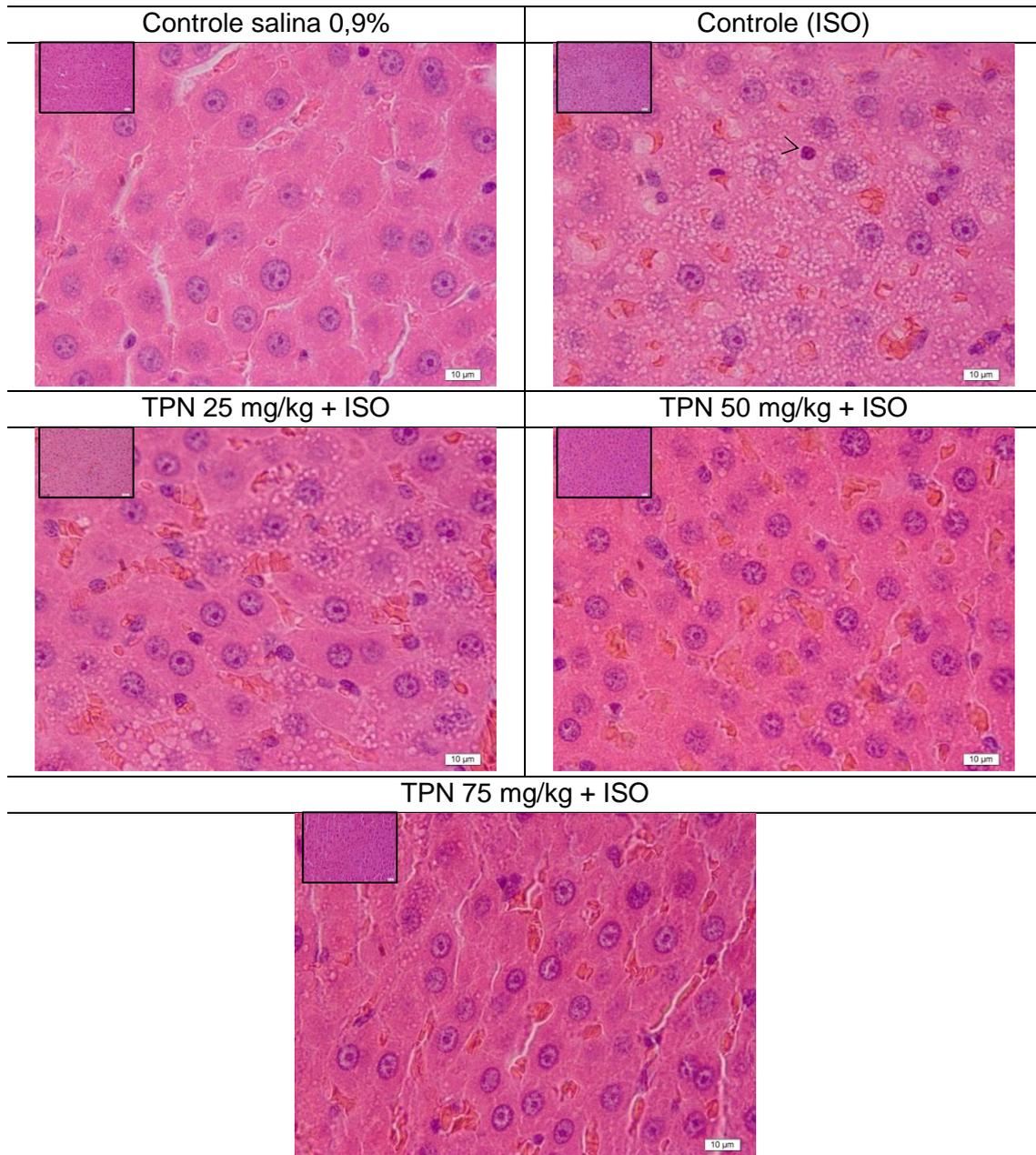
	Controle salina 0,9%	ISO 85 mg/kg	TPN 25 mg/kg	TPN 50 mg/kg	TPN 75 mg/kg
					
ISO	-	+	+	+	+

Fonte: AUTORA, 2022

5.4 Efeito do alpha-terpineol sobre a histoarquitetura dos fígados de ratos SHR e infartados com isoproterenol

A indução de infarto agudo do miocárdio com isoproterenol, foi capaz de produzir aumento da adiposidade no fígado dos ratos em comparação ao controle salina, isoproterenol aumentou de modo significativo o número de vesículas gordurosas (adipócitos). A análise microscópica, revela que o isoproterenol produziu atrofia dos hepatócitos, exudato sanguíneo, invasão de polimorfos nucleares e aumento da vesiculação gordurosa, como reserva energética, induzindo hepatoesteatose gordurosa não alcoólica (DGNA) em comparação ao seu respectivo grupo controle salina figura 4 página 55. O tratamento prévio crônico com alpha-terpineol foi capaz de inibir a vesiculação gordurosa, inibindo assim o aumento da adiposidade hepática, inibiu a atrofia dos hepatócitos e hemorragia hepática e manteve a matriz extracelular íntegra no fígado de ratos de maneira dose dependente figura.4, página 55. Ao realizar a contagem dos adipócitos, observa-se que o tratamento com alpha-terpineol foi capaz de reduzir de modo significativo o número de adipócitos nos fígados de ratos SHR mesmo após a indução com isoproterenol.

Figura 4- Microfotografias de fígados de ratos SHR, após o tratamento prévio com o monoterpeneo (alpha-terpineol). Fígados corados em H& E, aumento de 40x e 100x.

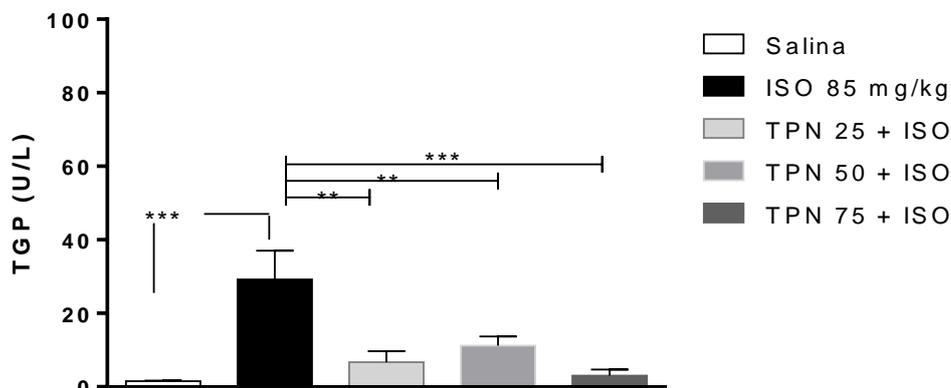


Fonte: AUTORA, 2022

5.5 Efeito do alpha-terpineol sobre a transaminase glutâmica pirúvica (TGP) de ratos SHR e infartados com isoproterenol

Isoproterenol foi capaz de aumentar de modo significativo as concentrações plasmáticas de transaminase glutâmica pirúvica em comparação ao seu respectivo grupo controle salina (ISO= $29,2 \pm 7,8^{***}$ vs. Salina= $1,5 \pm 0,2$ U/L) Gráfico 3, página 56. Entretanto o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento das concentrações plasmáticas de transaminase glutâmica pirúvica, mesmo após a indução com isoproterenol em comparação aos seus respectivos grupos controle isoproterenol e salina (Salina= $1,5 \pm 0,2$; ISO= $29,2 \pm 7,8^{***}$; TPN 25+ ISO= $6,7 \pm 3,0^{**}$; TPN 50 + ISO= $11,2 \pm 2,5^{**}$ e TPN 75 + ISO= $3,0 \pm 1,7^{***}$ U/L, respectivamente) Gráfico 3, página 56.

Gráfico 3- Efeito do alpha-terpineol sobre a concentração plasmática de transaminase glutâmica pirúvica de ratos SHR e infartados por isoproterenol. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$ e *** $p > 0,001$ (Salina vs. ISO) e (TPN vs ISO e/ou Salina) $n=5$.



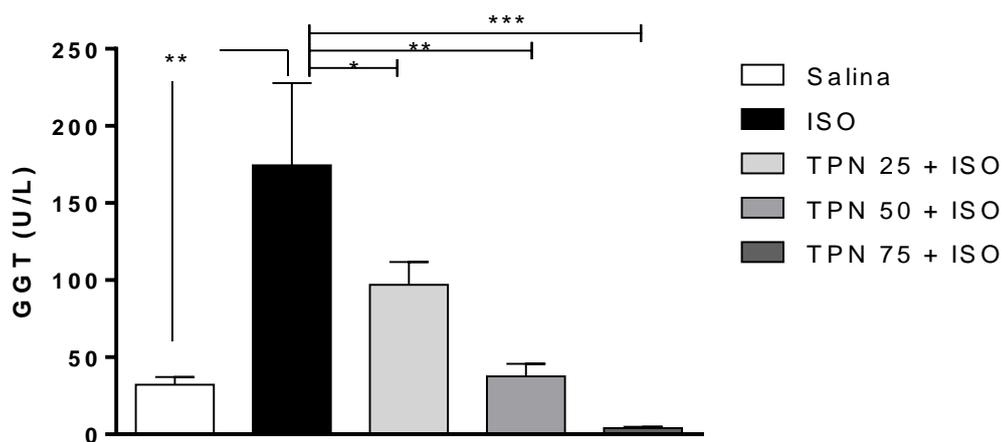
Fonte: AUTORA, 2022

5.6 Efeito do alpha-terpineol sobre a Gama Glutamil Transferase (GGT) de ratos SHR e infartados com isoproterenol.

A administração de isoproterenol foi capaz de aumentar os níveis de Gama Glutamil Transferase (GGT) em ratos SHR em comparação ao seu respectivo controle salina (ISO= $174,5 \pm 53,3^{**}$ vs. Salina= $32,2 \pm 4,9$ mg/dL) Gráfico 4, página 57. Entretanto, o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir de modo significativo as taxas de Gama Glutamil Transferase (GGT) em ratos SHR mesmo após a adição subcutânea de isoproterenol em relação ao seu

respectivo controle isoproterenol (Salina= $32,2 \pm 4,9$; ISO= $174,5 \pm 53,3^{***}$; TPN 25 + ISO= $96,9 \pm 14,8^*$; TPN 50 + ISO= $37,5 \pm 8,2^{**}$ e TPN 75 + ISO= $4,1 \pm 0,8^{***}$ mg/dL, respectivamente). Gráfico 4, página 57.

Gráfico 4- Efeito do alpha-terpineol sobre a concentração plasmática de Gama Glutamil Transferase de ratos SHR e infartados por isoproterenol. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando $*p > 0,05$; $**p > 0,01$ e $***p > 0,001$ (Salina vs. ISO) e (TPN vs ISO e/ou Salina) $n=5$.



Fonte: AUTORA, 2022

5.7 Efeito do alpha-terpineol sobre o perfil lipídico de ratos SHR e infartados com isoproterenol

A administração do isoproterenol foi capaz de aumentar os níveis de colesterol total dos ratos SHR em comparação ao seu respectivo grupo controle salina (ISO= $68,1 \pm 1,2^{****}$ vs. Salina= $21,5 \pm 1,0$ mg/dL) Tabela 2, página 59. Em contraste, o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento do colesterol total de ratos SHR mesmo após a indução com isoproterenol em (Salina= $21,5 \pm 1,0$; ISO= $68,1 \pm 1,2^{****}$; TPN 25 + ISO= $20,7 \pm 1,3^{****}$; TPN 50 + ISO= $22,6 \pm 1,5^{****}$ e TPN 75 + ISO= $22,3 \pm 4,6^{****}$ mg/dL respectivamente) Tabela 2, página 59. Ao analisar as frações de colesterol observou-se que o isoproterenol não alterou de modo significativo os níveis de LDLc em nenhum dos grupos (Salina = $366,58 \pm 281,74$; ISO= $108,97 \pm 1,87$; TPN 25 + ISO= $271,79 \pm 35,95$; TPN 50 + ISO= $129,99 \pm 14,91$ e TPN 75 + ISO= $113,95 \pm 1,38$ mg/dL respectivamente) Tabela 2 página 59. Entretanto, observa-se que o isoproterenol foi capaz de reduzir os níveis de HDLc em comparação ao respectivo controle salina (ISO= $41,90 \pm 1,29^{***}$ vs. Salina= $66,39 \pm 5,49$ mg/dL) Tabela 2, página 59, enquanto o tratamento prévio com

alpha-terpineol foi capaz de induzir aumento na fração HDLc mesmo após a indução com isoproterenol em comparação aos respectivos controles (Salina=66,39 ± 5,49; ISO= 41,90 ± 1,29^{***}; TPN 25 + ISO= 64,17± 5,31^{**}; TPN 50 + ISO= 49,99 ± 1,80^{*} e TPN 75 + ISO= 45,89± 1,04^{**} mg/dL respectivamente) Tabela 2, página 59. Os níveis de VLDL foi significativamente aumentado após a indução com isoproterenol em relação ao seu respectivo grupo controle salina (ISO= 70,7 ± 4,7^{****} vs. Salina= 4,7± 0,3 mg/dL) Tabela 2, página 59, porém o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento dos níveis de VLDL mesmo após a indução com isoproterenol (Salina= 4,7± 0,3; ISO= 70,7 ± 4,7^{****}; TPN 25 + ISO= 5,8± 0,6^{****}; TPN 50 + ISO= 5,5± 0,3^{****} e TPN 75 + ISO = 3,2± 0,3^{****} mg/dL, respectivamente) Tabela 2, página 59. Ao verificar as taxas de triglicerídeos, observa-se que o isoproterenol foi capaz de aumentar os níveis de triglicerídeos em comparação ao respectivo controle salina (ISO= 353,4±23,3^{****} vs. Salina= 23,4±1,6 mg/dL) Tabela 2, página 59, em contraste o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir os níveis de triglicerídeos mesmo após a indução com isoproterenol (Salina= 23,4±1,6; ISO= 353,4±23,3^{****}; TPN 25 + ISO= 28,9±2,8^{****}; TPN 50 + ISO= 27,5±1,7^{****} e TPN 75 + ISO= 16,2±1,5^{****} mg/dL) Tabela 2, página 59.

Tabela 2 – Níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL no soro de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e infartados tratados com alpha-terpineol. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Considerando significativo quando *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,0001 (ISO vs. Salina), (ISO vs. TPN 25,50 e 75 mg/kg). N=5

	Parâmetro (mg/dL)				
	Triglicérides	Colesterol Total	Colesterol LDL	Colesterol HDL	Colesterol VLDL
Salina	23,4±1,6	21,5±1,0	366,58±28,74	66,39 ± 5,49	4,7± 0,3
ISO 85 mg/kg	353,4±23,3****	68,1±1,2****	108,97±1,87	41,90 ± 1,29***	70,7 ± 4,7****
TPN 25 mg/kg + ISO	28,9±2,8****	20,7±1,3****	271,79±35,95	64,17± 5,31**	5,8± 0,6****
TPN 50 mg/kg + ISO	27,5±1,7****	22,6±1,5****	129,99 ± 14,91	49,99 ± 1,80*	5,5± 0,3****
TPN 75mg/kg + ISO	16,2±1,5****	22,3±4,6****	113,95±1,38	45,89± 1,04*	3,2± 0,3****

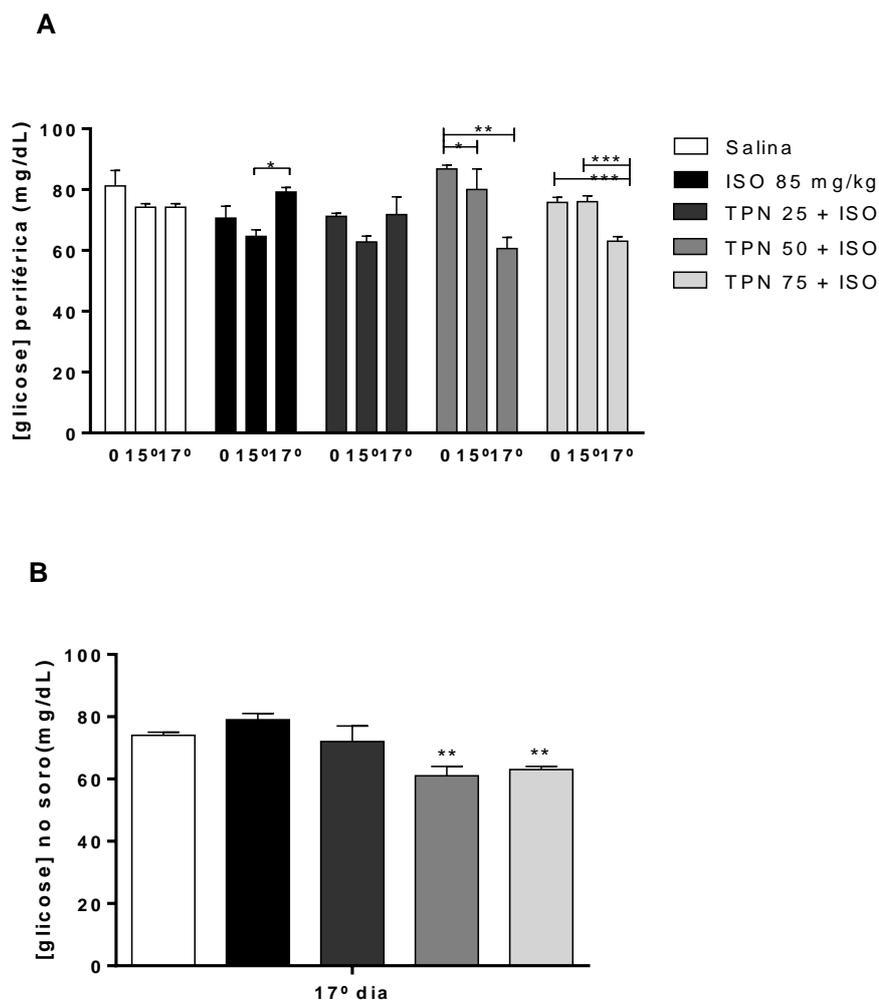
Fonte: AUTORA, 2022

5.7 Efeito do alpha-terpineol sobre o perfil glicídico de ratos SHR e infartados com isoproterenol

A administração de isoproterenol 85 mg/kg foi capaz de aumentar a concentração de glicose periférica dos ratos SHR no 17º dia em comparação aos respectivos 15º e dia 0º (ISO= 79,0± 2,0* vs. 65,0±2,0 e 71,0±4,0 mg/dL) gráfico. 5, página 61. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no grupo controle salina ao longo do tratamento crônico (Salina= 81,0±5,0 vs. 74,0±1,0 e 74,1 ± 1,0 mg/dL) gráfico 5A, página 61. Entretanto o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento das concentrações de glicose após as administrações consecutivas de isoproterenol em comparação ao 15º e 0º dia nas doses de 50 e 75 mg/kg. (TPN 25 + ISO= 72,0± 5,0 vs. 63,0±2,0 e 71,0±1,0 mg/dL) gráfico 5A, página 61. (TPN 50 + ISO= 61,0± 3,0** vs.80,0± 7,0 mg/ dL) e (TPN 50 + ISO= 80,0± 7,0* vs.87,0±1,0 mg/ dL) gráfico 5A, página 61. (TPN 75 + ISO= 63,0± 1,0*** vs.76,0± 2,0 mg/ dL) e (TPN 75 + ISO= 63,0± 1,0** vs.76,0± 2,0 mg/ dL) gráfico 5A, página 61.

Ao comparar a concentração de glicose no soro dos ratos após a eutanásia dos ratos observou-se que a indução com isoproterenol não foi capaz de induzir alterações significantes nas concentrações de glicose em comparação com seu respectivo grupo controle salina (ISO= 79,0±2,0 vs. salina= 74,0± 1,0 mg/dL) gráfico 5B, página 61. Em contraste o tratamento com alpha-terpineol foi capaz de reduzir de modo significativo as concentrações de glicose a partir da dose de 50 mg/kg em comparação ao seus respectivos grupos controles (Salina= 74,0±1,0; ISO= 79,0±2,0; TPN 25 + ISO= 72,0±5,0; TPN 50 + ISO= 61,0± 3,0** e TPN 75+ ISO= 63,0±1,0** mg/dL, respectivamente) gráfico 5B, página 61.

Gráfico 5- Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose (A) Antes e após a indução de infarto com isoproterenol 85 mg/kg 2x s.c em todos os grupos de ratos SHR e submetidos ao tratamento crônico pelo glicosímetro. (B) Ao 17º dia após punção cardíaca e eutanásia pelo método colorimétrico UV. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$ e *** $p > 0.001$ (Salina vs. ISO) e (TPN vs ISO e/ou Salina) $n=5$.



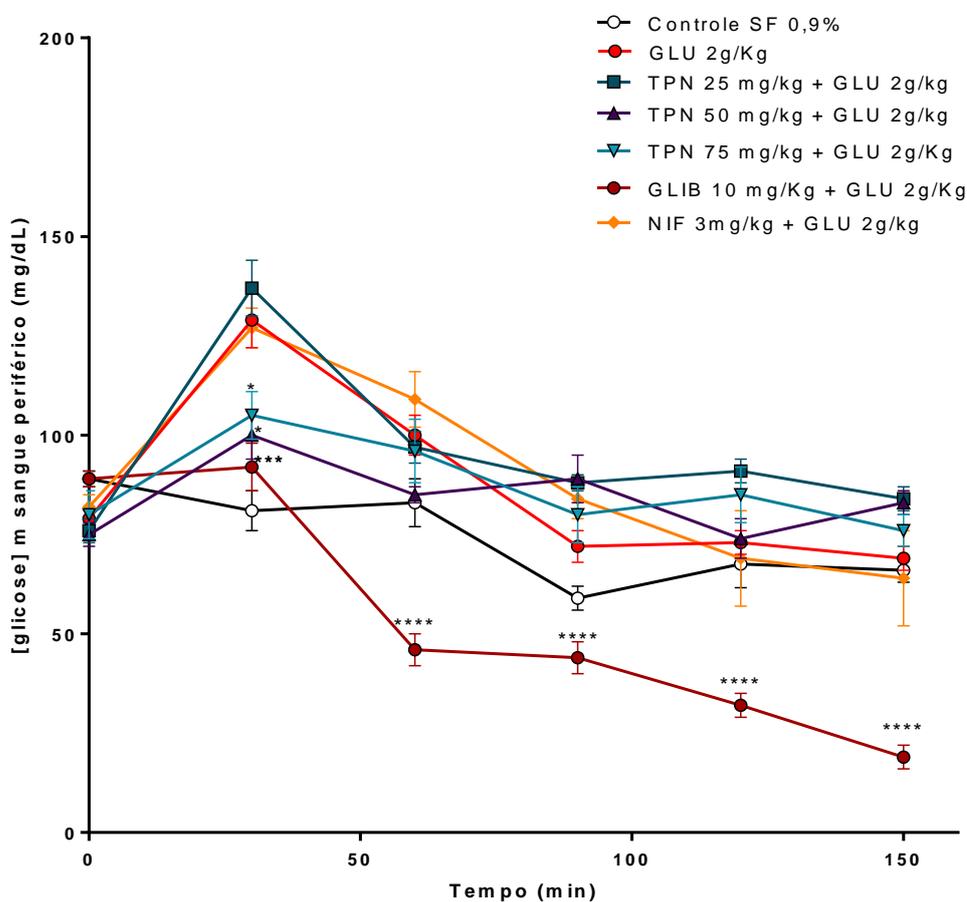
Fonte: AUTORA, 2022

5.8 Efeito do alpha-terpineol sobre a tolerância oral à glicose de ratos SHR

A administração oral de alpha-terpineol no teste de tolerância oral a glicose revelou que o alpha-terpineol nas doses de 50 e 75 mg/kg inibiu de modo significativo o aumento da glicose no tempo de 30 minutos em comparação aos respectivos controle gráfico 6, página 62 e Tabela 3 página 63. O tratamento com alpha-terpineol após a administração oral a glicose não alterou de modo significativo as concentrações de glicose nos tempos 60, 120 e 150 minutos em comparação

aos respectivos grupos controles gráfico 6, página 62 e Tabela 3 página 63. A administração aguda de glibenclamida, foi capaz de inibir o aumento da glicose periférica em todos os tempos no teste de tolerância oral à glicose gráfico 6, página 62 e Tabela 3 página 63. Enquanto o uso da nifedipina 3 mg/kg não alterou de modo significativo o aumento da glicose periférica em nenhum dos tempos no teste de tolerância oral a glicose gráfico 6, página 62, e Tabela 3 página 63.

Gráfico 6 - Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose no teste agudo de tolerância oral à glicose 2 g/kg. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando $*p > 0.05$; $**p > 0.01$, $***p > 0.001$ e $****p > 0.0001$ (Salina vs. GLU) e (TPN vs GLU e/ou Salina) $n=5$.



Fonte: AUTORA, 2022

TABELA-3 Comparação do perfil glicêmico em ratos submetidos ao teste agudo de tolerância oral à glicose. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, análise estatística ANOVA one-way”, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,00001$ (TPN vs glicose) e/ou (NIF vs glicose) e/ou (GLIB vs glicose). G1= grupo controle(0,5 mL salina v.o.)/ G2= grupo glicose(2g/Kg v.o.) /G3= grupo tratado(glicose 2g/Kg + TPN 25mg/Kg v.o.)/G4= grupo tratado(glicose 2g/Kg + TPN 50 mg/kg v.o.)/G5= grupo tratado(glicose 2g/Kg + TPN 75mg/Kg v.o.)/G6= grupo tratado(glicose 2g/Kg + NIF 3mg/kg v.o.)/G7= grupo controle positivo (glicose 2g/Kg + glibenclamida 10 mg/Kg v.o.)

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS (mg/dL)							
TEMPO (min)	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
T0	89,0 \pm 2,0	79,0 \pm 2,0	76,0 \pm 3,0	75,0 \pm 3,0	80,0 \pm 6,0	82,0 \pm 3,0	89,0 \pm 2,0
T30	81,0 \pm 5,0	129,0 \pm 7,0****	137,0 \pm 7,0	100,0 \pm 6,0*	105,0 \pm 6,0*	127,0 \pm 5,0	92,0 \pm 6,0***
T60	83,0 \pm 6,0	100,0 \pm 5,0	97,0 \pm 4,0	85,0 \pm 2,0	96,0 \pm 8,0	109,0 \pm 7,0	46,0 \pm 4,0****
T90	59,0 \pm 3,0	72,0 \pm 4,0	88,0 \pm 2,0	89,0 \pm 6,0	80,0 \pm 7,0	84,0 \pm 5,0	44,0 \pm 4,0****
T120	67,6 \pm 6,0	73,0 \pm 3,0	91,0 \pm 3,0	74,0 \pm 5,0	85,0 \pm 7,0	69,0 \pm 12,0	32,0 \pm 3,0****
T150	66,0 \pm 3,0	69,0 \pm 3,0	84,0 \pm 3,0	83,0 \pm 3,0	76,0 \pm 4,0	64,0 \pm 12,0	19,0 \pm 3,0****

Fonte: AUTORA, 2022

5.9 Efeito do alpha-terpineol sobre a tolerância intravenosa à glicose de ratos SHR

A administração do alpha-terpineol 75 mg/kg somente alterou de modo significativo as concentrações de glicose periférica no teste de tolerância intravenosa à glicose nos tempos de 30 e 45 minutos em comparação ao grupo controle glicose 1g/kg gráfico 7, página 64, Tabela 4 página 65. A administração do alpha-terpineol na dose de 50 mg/kg não alterou de modo significativo as concentrações de glicose periférica em nenhum dos tempos do teste agudo intravenoso à glicose gráfico 6, página 64, Tabela 4 página 65. Enquanto a administração de glicose intravenosa foi capaz de aumentar os níveis de glicose periférica 5 minutos após sua administração em comparação ao seu respectivo grupo controle salina gráfico 7, página 64, Tabela 4 página 65.

Gráfico 7- Efeito do alpha-terpineol sobre as concentrações periféricas de glicose no teste agudo de tolerância intravenosa à glicose 1 g/kg. Análise estatística ANOVA one-way seguido de post-teste Newman-keuls. Considerado significativo quando * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$, *** $p > 0.001$ e **** $p > 0.0001$ (Salina vs. GLU) e (TPN vs GLU e/ou Salina) $n=5$.

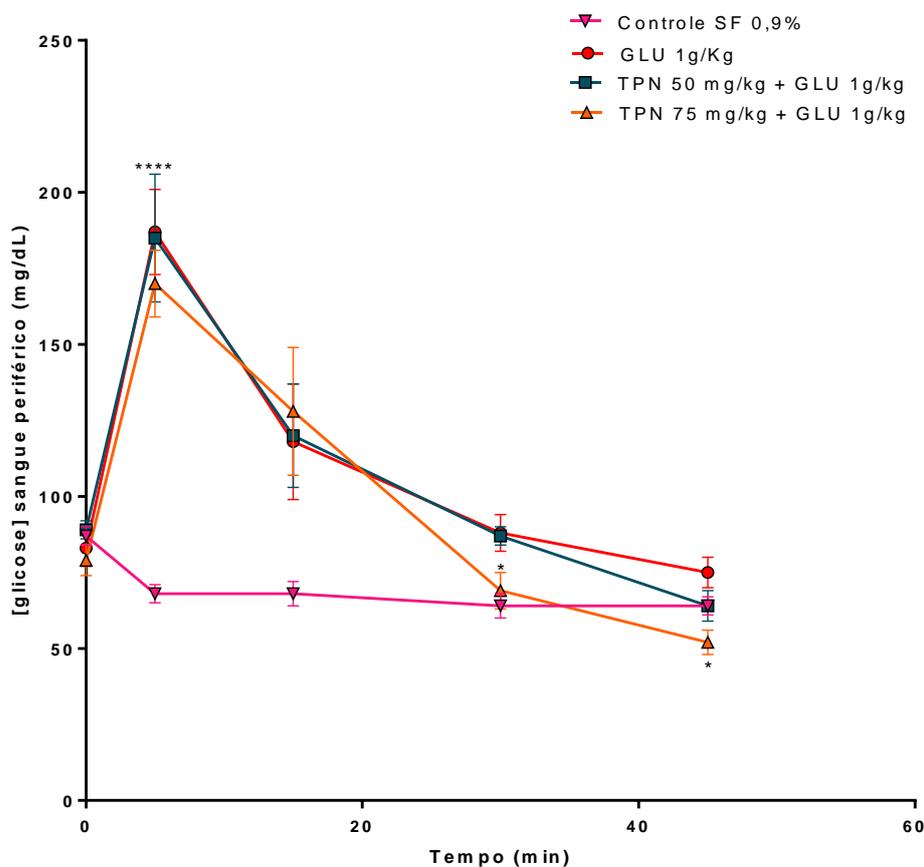


Tabela 4 - Comparação do perfil glicêmico em ratos submetidos ao teste agudo de tolerância intravenosa à glicose Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, análise estatística ANOVA one-way”, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ **** $p < 0,001$ e ***** $p < 0,0001$ (TPN vs glicose) e/ou (glicose vs controle salina) .G1= grupo controle(0,5 mL salina v.o)/ G2= grupo glicose(1g/Kg v.o.) / G4= grupo tratado (glicose 1g/Kg + TPN 50 mg/kg v.o.)/ G5= grupo tratado (glicose 1g/Kg + TPN 75mg/Kg v.o.).

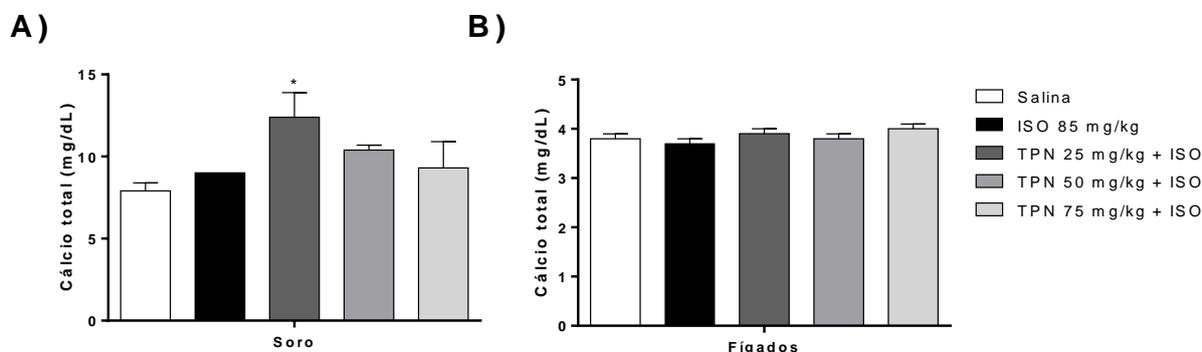
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS (mg/dL)				
TEMPO (min)	G1	G2	G3	G4
T0	87,0 \pm 3,0	83,0 \pm 6,0	89,0 \pm 3,0	79,0 \pm 5,0
T5	68,0 \pm 3,0	187,0 \pm 14,0****	185,0 \pm 21,0	170,0 \pm 11,0
T15	68,0 \pm 4,0	118,0 \pm 19,0	120,0 \pm 17,0	128,0 \pm 21,0
T30	64,0 \pm 4,0	88,0 \pm 6,0**	87,0 \pm 3,0	69,0 \pm 6,0*
T45	64,0 \pm 3,0	75,0 \pm 5,0**	64,0 \pm 5,0	52,0 \pm 4,0*

Fonte: AUTORA, 2022

5.10 Efeito do alpha-terpineol sobre o transiente de cálcio dos fígados de ratos SHR e infartados

A administração de alpha-terpineol foi capaz de aumentar de modo significativo as concentrações de cálcio no soro dos ratos SHR no tratamento subagudo, apenas na dose de 25 mg/kg em comparação aos seus respectivos controles (Salina= $7,9 \pm 0,5$; ISO= $9,0 \pm 0,1$; TPN 25 + ISO= $12,4 \pm 1,5^*$; TPN 50 + ISO= $10,4 \pm 0,3$ e TPN 75 + ISO= $9,3 \pm 1,6$ mg/dL, respectivamente). gráfico 8A, página 62. Entretanto a administração de TPN não foi capaz de alterar de modo significativo as concentrações de cálcio nos fígados de ratos SHR no tratamento subagudo (Salina= $3,8 \pm 0,1$; ISO= $3,7 \pm 0,1$; TPN 25 + ISO= $3,9 \pm 0,1$; TPN 50 + ISO= $3,8 \pm 0,1$ e TPN 75 + ISO= $4,0 \pm 0,1$ mg/dL, respectivamente). gráfico 8, página 66.

Gráfico 8- Níveis de cálcio total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em rato SHR após o tratamento subagudo (A) Soro (B) Fígados. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativos quando * $p > 0.05$ ** $p > 0.01$ e (ISO vs salina) ou (TPN vs. ISSO e/ou salina). $n=5$



Fonte: AUTORA, 2022

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho objetiva-se em avaliar os efeitos deletérios do alpha-terpineol (TPN), sobre as alterações no metabolismo lipídico e glicídico produzidos por isoproterenol em ratos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR), assim como, verificar se o isoproterenol pode se tornar um modelo viável de indução de síndrome metabólica especificamente em ratos SHR.

As doenças cardiometabólicas tem sido alvo de numerosos estudos ao redor do mundo devido à alta prevalência de indivíduos acometidos por doenças que possuem aspectos convergentes provocando falhas na comunicação entre o metabolismo cardiovascular e o metabolismo energético endócrino (NIH,2022). Recentemente, estes aspectos foram denominados de síndrome metabólica em consensos que versam sobre a presença de ao menos três aspectos de importância clínica que mesclam doenças cardiovasculares e seus agravos, doenças lipídicas, doenças glicídicas e/ou obesidade com alto risco de mortalidade (SAIF-ALI et al., 2020).

Neste contexto, alpha-terpineol, um monoterpene alcoólico encontrado em óleos essenciais de espécies herbáceas, tem demonstrado efeitos farmacológicos nas áreas cardiovasculares como: propriedades vasorelaxantes (SABINO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010), cardioprotetora em linhagens de ratos wistar e espontaneamente hipertensos no modelo isoproterenol (TENÓRIO, 2019) além de propriedades metabólicas como: antiobesidade em ratos Sprague-Dawley em um modelo de dieta hipercalórica (DE SOUZA et al., 2020). Porém seus efeitos deletérios sobre o metabolismo lipídico e glicídico de ratos com doenças cardiovasculares permanecem desconhecidos.

Não obstante, o fígado tem sido um órgão alvo de muitos estudos pré-clínicos e clínicos da síndrome metabólica, pois dada a importante função do metabolismo de xenobióticos e centro do metabolismo de macronutrientes como carboidratos e gorduras suas funções devem permanecer em homeostase para que o metabolismo seja efetivo na regulação energética apropriada por meio de feedbacks, o que não ocorre na síndrome metabólica, no qual o desenvolvimento da esteatose hepática gordurosa é presente em aproximadamente 90% dos casos de síndrome metabólica e que ainda pacientes com esteatose hepática gordurosa se encaixa em 33% dos casos de critérios associados a algum dos tipos de síndrome metabólica (ALMEDA-VALDÉS et al., 2009; YKI-JÄRVINEN, 2014; GODOY-MATOS et al., 2020)

Neste sentido, as vias adrenérgicas estão intrinsecamente correlacionado ao metabolismo energético, estudos recentes demonstram que a coadministração de fenilefrina 10mg/kg/d e isoproterenol 30 mg/kg/d durante 5 semanas é capaz de induzir esteatose hepática, elevar os níveis de triglicérides e colesterol em roedores demonstrando que os receptores adrenérgicos estão envolvidos na síndrome metabólica (NAKADE et al., 2020).

Isoproterenol é reconhecidamente um modelo de indução de infarto em ratos por produzir danos cardíacos e morte celular por isquemia-reperfusão em parte causado por via direta, aumentando os efeitos cronotrópicos, inotrópicos, dromotrópicos e lusitrópicos positivos que leva a anóxia e de modo indireto pela depleção dos sistemas antioxidantes ao passo que induz alto estresse oxidativo e dano mitocondrial ativando vias de apoptose celular e por sua vez necrose descontrolada (WONG et al., 2017). Em associação, isoproterenol é capaz de induzir efeitos deletérios sobre o metabolismo energético (lipídico e glicídico) como: glicogenólise hepática e liberação de glucagon no pâncreas via ativação de receptores β_2 , que culmina no aumento das reservas glicídicas na forma de adipócitos, e ao mesmo tempo produz alterações transitórias de glicose periférica é mediada pelas ações em receptores β_3 aumentando a lipólise de adipócitos e produz ainda resistência parcial à insulina pela inibição da liberação insulinérgica pancreática e aumento da leptina em tecidos adiposos (SZYMANSKI & SING, 2022; RANG & DALE, 2011).

A indução de ratos SHR com isoproterenol 85 mg/kg 2x. s.c foi capaz de induzir aumento no peso hepático (Gráfico 2A, página 53), aumento na correlação do peso hepático sobre o peso corpóreo (Gráfico 2B, página 53) e aumento na correlação do peso hepático sobre o peso do fêmur (Gráfico 2C, página 53). Estes resultados corroboram com os estudos supracitados acima demonstrando que a superestimulação dos receptor β -adrenérgico estão envolvidos no desenvolvimento da síndrome metabólica em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa, uma vez que a alta densidade de receptores e a forma de resposta a estímulos adrenérgicos neste modelo animal possui um limiar de ação mais sensível que nos demais animais, favorecendo o aparecimento da esteatose hepática (GUYNET, P, 2006; GHOSH et al., 2013; SHI et al., 2021)

Em contraste, o pré-tratamento dos ratos SHR com alpha-terpineol foi capaz de inibir o aumento do peso hepático (Gráfico 2A, página 53), assim como, inibiu o aumento da correlação do peso hepático sobre o peso corpóreo (Gráfico 2B, página 53), e do peso hepático sobre o peso do fêmur (Gráfico 2C, página 53) mesmo após a indução com

isoproterenol, demonstrando que o alpha-terpineol produz propriedades anti-esteatose hepática.

Também já é reportado na literatura que as vias adrenérgicas possuem papel fundamental na manutenção do peso ponderal, visto que seus mecanismos de feedbacks ativam fatores transcricionais como o fator transcricional regulador de esterol (SBERF1) que regulam o ganho e a perda de gordura através da estimulação de elementos alvo, como: sintase de ácidos graxos, proteínas transferidoras de triglicerídeo microsomal, fator proliferador de receptor peroxissomo α e acil-coenzima A. Assim, o uso de agonistas adrenérgicos como a fenilefrina e/ou isoproterenol demonstram a correlação existente entre os receptores α e β adrenérgicos na manutenção do peso ponderal da síndrome metabólica, neste sentido os receptores α adrenérgicos parecem ser um alvo mais importante no ganho do peso ponderal e assim estimulando a obesidade nestes roedores que os receptores β -adrenérgicos (NAKADE et al.,2020).

É importante mencionar que já é reportado na literatura que o isoproterenol possui seu arcabouço molecular baseado nas catecolaminas endógenas possuindo o grupo catecol imprescindível para a atividade em receptores adrenérgicos, com duas substituições hidroxila ligado ao anel aromático o que confere maior potência farmacológica em receptores da família adrenérgica, um substituinte hidroxila no início da ligação alifática o que proporciona redução da ação no sistema nervoso central, produzindo aumento da hidrofilia e redução da capacidade da molécula atravessar a barreira hemato-encefálica e por fim dois grupamentos metila ligados ao grupamento amina, o que garante a sua seletividade para receptores β adrenérgicos e baixa capacidade de ligação em receptores α -adrenérgicos (HOFFMAN et al., 2001).

Corroborando com o estudo citado acima, a administração de isoproterenol 85 mg/kg 2x s.c não provocou nenhuma alteração sobre o peso corpóreo em nenhum dos grupos (Gráfico 1, página 51), demonstrando que a seletividade do isoproterenol em receptores β -adrenérgicos foram úteis no controle do peso ponderal em ratos SHR, assim como o tratamento prévio com alpha-terpineol também não foi capaz de produzir nenhuma alteração sobre o peso ponderal de ratos mesmo após a indução com isoproterenol (Gráfico 1, página 51), demonstrando que alpha-terpineol parece não estar envolvido com propriedades de ganho de peso e/ou anorexígenos.

Notavelmente, a sinalização adrenérgica é conhecida por produzir efeitos catabólicos sobre a modulação energética geral (RANG & DALE, 2011), não obstante, diversos compostos com efeitos anorexígenos possuem correlação estrutural com

moléculas análogas aos compostos simpaticomiméticos (BARREIRO, 2009). Assim, em nossos estudos o uso do isoproterenol em doses maciças e em exposição curta, não se esperava alterações sobre o peso ponderal de ratos em similaridade aos relatos expostos na literatura.

Também já é reportado que na patogenia da hepatoesteatose os ácidos graxos livres derivados da dieta alimentar lipólise em adipócitos ou lipogênese são oxidados pela reação de β -oxidação enzimática e esterificação transformando-os em triglicerol microvesicular, aumentando a vesiculação de estoques intra-hepáticos de adipócitos, acima dos 5% do conteúdo total hepático, o que é considerados índices normais (NASSIR et al., 2015). Não obstante o estilo de vida com alto estresse corrobora para a patogenia da esteatose hepática uma vez que as vias adrenérgicas são superativadas e provocam o desbalanço sobre o metabolismo energético já citado. Sabe-se que mecanisticamente, a administração de catecolaminas induzem a lipólise em adipócitos de tecidos gordurosos (i.e. gordura visceral e subcutânea) pela ativação de macrófagos CCR2+ de modo dependente de dose, levando ao re-influxo de ácidos graxos a vesiculação no fígado e por tanto lipotoxicidade, o que induz fenômenos de inflamação e morte celular dos hepatócitos pela deleção dos genes Bid e Fas, ao passo que ativam a via Bax, e caspase 8, produzindo apoptose hepática que pode progredir severamente para hepatoesteatose, hepatite e cirrose (KIM et al.,2019).

Ademais, já é sabido que a via clássica produzida pelas catecolaminas incluindo o isoproterenol em produzir ativação de receptores β_3 em adipócitos leva a ativação da Proteína Kinase A (PKA) e subsequente fosforilação do hormônio sensível à lipase, aumentando os ácido graxos livres, o que naturalmente ativam o recrutamento de macrófagos a reestocar os ácidos graxos em vesículas hepáticas entrando no re-influxo de estoque de ácidos graxos, promovendo dislipidemia e hepatoesteatose relacionada à síndrome metabólica (KIM et al.,2019).

Em nosso estudo demonstramos que o isoproterenol 85 mg/kg 2 x s.c. foi capaz de produzir esteatose hepática (figura.4, página 55), e ao avaliar a histoarquitetura do tecido hepático, observou-se a produção de esteatose do tipo microgoticular (figura.4, página 55). Além disto a contagem de adipócitos revelou um aumento significativo do número de adipócitos intra-hepáticos. Entretanto, o tratamento prévio dos ratos SHR com alpha-terpineol foi capaz de inibir a esteatose hepática de modo dose dependente (figura.4, página 55), ao analisar a microscopia hepática, observou-se redução significativa tanto em termos qualitativos (figura.4, página 55), quanto em termos

quantitativos da esteatose microgoticular. Estes resultados demonstram que o alpha-terpineol foi capaz de produzir propriedades anti-esteatóticas e portanto hepatoprotetoras no modelo isoproterenol em ratos SHR.

Isoproterenol em baixas doses induzem baixa ativação destas vias, entretanto doses maciças de repetidas de isoproterenol produzem ações exacerbadas sobre os macrófagos circulantes, que geram uma resposta inflamatória mediada pela interleucina 1 β (IL-1 β), recrutamento de células de kupfer e células CD11C+, CD206+ e CCR2+, formando cluster de infiltrados polimórficos intra-hepáticos, o estímulo a estas células e esteatose hepática produz depleção de enzimas hepáticas como Aspartato Amino Transferase (AST) e Gamma Glutamil Transferase (GGT) (KIM et al., 2019). A percentagem de adipócitos em relação ao numero de hepatócitos pode ser classificado em saudável quando inferior à 5%, leve quando entre 5-33%, moderado quando entre 34-66% e severo quando acima de 66%. Estes índices são cruciais para a evolução patológica da esteatose hepática em pacientes com síndrome metabólica, quando a esteatose encontra-se leve elevam-se os níveis enzimáticos de danos hepáticos sem causar inflamação significativa, entretanto, quando moderada à severa elevam-se os níveis enzimáticos com marcante efeito inflamatório e necrose hepática, o que gera cirrose hepática (NASSIR et al., 2015).

Neste sentido, avaliando-se os níveis de Aspartato Amino Transferase (AST) e Gamma Glutamil Transferase (GGT) em nosso estudo, demonstraram que o isoproterenol foi capaz de elevar os níveis dos marcadores de lesão hepática (Gráfico 3 e 4, página 56 e 57). Já é reportado na literatura que o isoproterenol é convertido aminocromos reativos, em seu processo de biotransformação que contribuem para a lesão hepática pela depleção de enzimas de metabolismo de xenobióticos (REMIÃO et al., 2001). Em adição, o isoproterenol interferiu no metabolismo energético provocando aumento na toxicidade no desbalanço lipídico que também é responsável pela elevação das transaminases indicando a presença de lesão hepática similar ao provocado pela esteatose hepática (NASSIR et al., 2015). Em contraste o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de reduzir de modo significativo os marcadores de lesão hepática Aspartato Amino Transferase (AST) e Gamma Glutamil Transferase (GGT), demonstrando sua capacidade de promover propriedades hepatoprotetoras no modelo isoproterenol em ratos SHR.

Também já está reportado na literatura que indivíduos com síndrome metabólica possuem disfunções hepáticas com elevação de AST e ALP em função da elevação dos triglicérides, colesterol total e suas frações (LDLc, HDLc e VLDL) em resposta a

dislipidemia e hepatoesteatose desenvolvida na síndrome metabólica (YADAV et al., 2016). Em similaridade, há relatos na literatura da elevação dos níveis de Gamma Glutamil Transferase em indivíduos com genes de pacientes com predisposição à síndrome metabólica, esta elevação se dá em função da disfunção metabólica que reflete o aumento do estresse oxidativo e inflamação crônica hepática pelo acúmulo indevido de gordura deslocando o raio proporcional de adipócitos e hepatócitos (LEE et al., 2019).

Adicionalmente, ao avaliar os níveis de ácidos graxos no soro dos ratos SHR induzidos com isoproterenol, observou-se um perfil dislipidêmico com elevação dos triglicérides e do colesterol em especial VLDL e LDLc (Tabela 2, página 59). Já é bem reportado na literatura, que o isoproterenol eleva as taxas de lipídeos circulantes, devido as suas propriedades de desviar o metabolismo energético (lipídico e glicídico), provocando dislipidemia severa em estudos pré-clínicos e clínicos (LIU et al., 2011; SZYMANSKI & SINGH, 2022).

Entretanto o tratamento com alpha-terpineol foi capaz de reduzir a dislipidemia induzida por isoproterenol em todas as doses testadas, demonstrando que o alpha-terpineol produziu efeitos hipotriacilcolesterolêmicos em ratos SHR mesmo após a indução com isoproterenol (Tabela 2, página 58).

Adicionalmente, isoproterenol foi capaz de induzir aumento nos níveis glicídicos em ratos SHR em comparação aos ratos controle salina e ao próprio grupo isoproterenol comparando-se aos níveis glicídicos anteriores a exposição ao isoproterenol (Gráfico 5A, página 61 e Gráfico 5B, página 61). Observa-se que os níveis glicídicos não ultrapassaram níveis normais quando comparados com taxas glicêmicas de ratos em modelos de *diabetes mellitus*. Isto se deve aos mecanismos de ajustes rápidos no transiente glicêmico desbalanceado pelo isoproterenol em doses maciças porém agudas, por meio de vias de comunicação regulados por feedbacks homeostáticos (RANG & DALE, 2007). Entretanto, observa-se que o tratamento prévio com alpha-terpineol foi capaz de inibir as oscilações dos níveis glicídicos em ratos SHR mesmo após a indução com isoproterenol (Gráfico 5A, página 61 e Gráfico 5B, página 61). Os resultados aqui expressos indicam que o alpha-terpineol foi capaz de modular a ação sobre o metabolismo glicídico, mesmo após a exposição subsequente de altas doses de isoproterenol, mantendo a capacidade de produzir proteções sobre as oscilações no transiente glicídico.

Os diversos mecanismos de ação de fármacos hipotriacilcolesterolêmicos envolvem, a inibição da HMG coa-Redutase, inibição sobre a expressão de apolipoproteínas e/ou regulação do influxo/efluxo de colesterol VLDL, entretanto os efeitos sobre a

síndrome metabólica em uso clínico isoladamente, não é capaz de produzir efeitos significantes sobre a reversão da síndrome metabólica sendo necessária uma abordagem multifatorial e com múltiplos alvos de interesse farmacológico, não obstante, a polifarmácia é uma prática comum para o alcance de melhorias da síndrome metabólica (LILICH et al.,2021).

Em busca de pistas mecanicistas dos efeitos antiesteatóticos aqui apresentados e no controle da síndrome metabólica em ratos SHR e induzidos com isoproterenol, avaliamos os possíveis alvos em potencial ao qual o alpha-terpineol possa modular. Uma das principais vias de interesse sobre a regulação do metabolismo energético no fígado envolve a sinalização do cálcio como mediador direto das funções hepáticas. O cálcio intracelular livre nos hepatócitos são segundos mensageiros versáteis, pois modulam uma variedade de funções, como: secreção da bile, controle do metabolismo da glicose, e vesiculação de lipídeos, proliferação celular e ativação de mecanismos de apoptose celular (AMAYA & NATHANSON, 2014).

O principal controle dos estoques intracelulares é regulado em grande parte pelos canais iônicos para cálcio, o equilíbrio eletroiônico do cálcio intracelular se dá pelos canais para cálcio operado por voltagem (VOCC's), canais para cálcio operado por receptores (ROCC's) e canais iônicos diretos (NCX, TRPX e ORAI1), além dos estoques intracelulares de cálcio do retículo sarcoplasmático (HUMEAU & SENOVILLA,2018). Interessantemente, alguns bloqueadores de canais para cálcio usados em pacientes acometidos por distúrbios cardiovasculares, revelaram melhorias na dislipidemia e na síndrome metabólica que incluem a esteatose hepática (Czaja, 2016).

Nesse contexto os níveis de cálcio do soro e dos fígados de ratos foram mensurados. Os resultados mostraram que os níveis de cálcio dos fígados de ratos não foram significativamente alterados na presença ou ausência de isoproterenol (Gráfico 8, página 66), assim como, o tratamento prévio com alpha-terpineol não alteraram de maneira significativa os níveis de cálcio intracelular dos fígados de ratos SHR mesmo após a indução com isoproterenol (Gráfico 8, página 66). Estes resultados demonstram que o alpha-terpineol não foi capaz de alterar o transiente de cálcio intracelular, sugerindo que os efeitos anti-esteatóticos aqui demonstrados não possuem participação da sinalização envolvida com cálcio nos hepatócitos.

Recentemente, estudos de Won et al, (2021), revelaram que inibidores de cotransportadores sódio-glicose (SGTL's) melhoram as anormalidades hepáticas de indivíduos coreanos com síndrome metabólica (WON et al., 2021). É reportado na

literatura que a expressão de cotransportadores de sódio-glicose tipo II são encontrados na mucosa intestinal, em especial nos enterócitos e participam diretamente no metabolismo da glicose, como glicólise, glicogenólise e gliconeogênese (NI et al., 2020). É válido mencionar que assim como nos enterócitos, a presença de cotransportadores de sódio-glicose SGLT's e receptores para glicose (GLUT's) são encontrados em tecidos hepáticos e possuem como função principal a regulação do influxo de glicose nos hepatócitos e conseqüentemente no metabolismo glicídico no fígado (KARIM et al., 2012).

Adicionalmente, os inibidores de co-transportadores de sódio-glicose tipo II como: empagliflozina, canagliflozina, dapagliflozina e ertugliflozina, tem produzido efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular e sobre a diabetes mellitus tipo II, sendo este, um alvo que vem sendo considerado um novo alvo terapêutico clinicamente relevante para o delineamento e construção molecular para novos fármacos úteis no tratamento dos distúrbios cardiovasculares, diabetes mellitus, além de ser apontados como futuros medicamentos em potencial como primeira linha para o tratamento da síndrome metabólica e prevenção de distúrbios cardiovasculares graves (NI et al., 2020).

Em face disto, avaliamos se alpha-terpineol é capaz de produzir efeitos significantes sobre o teste de tolerância oral e intravenoso a glicose, avaliando assim de maneira indireta a participação de co-transportadores de sódio-glicose (SGLT's) e receptores de glicose (GLUT's) como elementos moleculares participantes dos fatores intestinais da absorção de glicose. A curva de tolerância oral a glicose 2g/kg demonstrou que o alpha-terpineol é capaz de inibir o aumento da glicose oral administrada nos 30 minutos iniciais em comparação ao grupo controle glicose nas doses de 50 e 75 mg/kg, assim sugere-se que o alpha-terpineol seja capaz de modular ações sobre a absorção de glicose por vias moleculares que envolvem co-transportadores de sódio-glicose (SGLT's) e receptores de Glicose (GLUT's) intestinais.

Ao avaliar a curva intravenosa de glicose 1g/kg, observou-se que o alpha-terpineol nas doses de 50 e 75 mg/kg por via oral não inibiram de modo significativo o aumento da glicose sanguínea nos primeiros tempos do ensaio experimental, entretanto, observa-se que a dose oral de 75 mg/kg inibiu de modo significativo os níveis de glicose nos tempos de 30 e 45 minutos em comparação ao grupo controle glicose, demonstrando assim que o alpha-terpineol também é capaz de induzir respostas hipoglicemiantes quando a glicose é administrada por via intravenosa. Estes resultados nos mostram que alpha-terpineol é capaz de modular as oscilações de glicose tanto pelos fatores intestinais, quanto por

elementos envolvidos no metabolismo glicídico sanguíneo. Assim, sugere-se que o alpha-terpineol possa exercer influências em alvos de transporte e estoques de glicose de maneira direta e indireta, talvez por meio dos co-transportadores de glicose (SGTL's) e/ou (GLUT's) influenciando o metabolismo glicídico.

Em conjunto, os resultados demonstrados neste trabalho sugerem que o alpha-terpineol é capaz de promover melhorias no metabolismo energético (glicídico e lipídico) e que a redução da hepatoesteatose da síndrome metabólica induzida por isoproterenol em ratos espontaneamente hipertensos se dê parte pela inibição da absorção de glicose intestinal e hepático inibindo o desbalanço energético glicídico e lipídico, uma vez que sua a inibição do acúmulo de glicose nos tecidos de reserva e seus metabolismos induzidos pelo aumento do influxo de glicose, reduzindo assim a vesiculação de adipócitos como uma resposta ao aumento da recirculação de glicose e lipídeos provocada pelos mecanismos do isoproterenol como um agente de indução patológica sobre os desvios do metabolismo glicídico e lipídico.

Entretanto, novos estudos são necessários para a elucidação de todas as vias moleculares envolvidas nesta propriedades hipotriacilcolesterolêmica, antihepatoesteatótica, antidislipidêmica induzida por alpha-terpineol. Sugere-se a partir dos dados aqui apresentados que o efeito do alpha-terpineol em um modelo de diabetes mellitus possa ser avaliado observando os efeitos sobre o metabolismo glicídico isoladamente, assim como em outros modelos de dislipidemia e/ou síndrome metabólica envolvendo diabetes e obesidade em roedores.

Os resultados deste trabalho podem contribuir de modo considerável na translação de ensaios pré-clínicos para ensaios clínicos em indivíduos acometidos por doenças cardiovasculares, dislipidêmicos e com síndrome metabólica, além de serem úteis no planejamento de novos fármacos, como um novo protótipo de fitofármaco que possa ser veiculado no mercado farmacêutico promovendo melhorias nos sistemas cardiovasculares e metabólico.

Por fim, o estudo ressalta o uso etnofarmacológico de produtos naturais usados em comunidades indígenas da Amazônia brasileira para a produção de novos fármacos clinicamente relevantes na área de doenças crônicas não transmissíveis como os distúrbios cardiometabólicos.

7. CONCLUSÃO

Em face de todo o exposto neste trabalho, conclui-se que alpha-terpineol é capaz de produzir respostas hipotriacilcolesterolêmicas, anti-dislipidemicas e anti-hepatoesteatótica em ratos espontaneamente hipertensos e induzidos a síndrome metabólica com isoproterenol. Os resultados desta dissertação demonstram que alpha-terpineol é capaz de melhorar os aspectos no metabolismo energético na síndrome metabólica sem alterar o peso ponderal dos ratos. Por fim, evidencia-se a possível inibição dos co-transportadores de glicose (SGTL's) e receptores de glicose (GLUT's) como mecanismos participantes no efeito cardiometabólico avaliado neste trabalho. Os resultados aqui expressos podem facilitar a translação em estudos farmacológicos e torna o alpha-terpineol um protótipo de novo fitofármaco com propriedades nas áreas cardiovasculares e metabólicas.

8. PERSPECTIVAS

- Contagem dos adipócitos nos fígados;
- Coloração diferencial em lâminas de histologia;
- Novo ciclo experimental para remover gordura branca e marrom para estudo do metabolismo;
- Novo ciclo experimental com produto nanoencapsulado com ciclodextrina.

REFERÊNCIAS

ALMEDA-VALÉS, P et al. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of hepatology*. V.8. p-s18-s24.2009.

ALVES-SILVA, J. M. et al. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. *Curr Med Chem*. V.23, p.4559-4600.2016

ARTIÑANO, A. A & CASTRO, M.M. Experimental rat models to study metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*. Vol 102.2009.

BARROSO, I & Mc Carthy, M.I. The Genetic Basis of Metabolic Disease. *Cell press*. P.146-161.2019.

BASER, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*. V 14 p 3106-3119.2008.

BASHARAT, S. et al. Role of resveratrol in cardiovascular diseases and associated diseases. *Journal of public Health policy and Planning*. Vol. 4.2020.

BAYLIE R.L. et al. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *J Physiol Pharmacol* v.61, p.543-550.2010.

CALIXTO, J.B. The Role of natural products in modern drug discovery. *Biological sciences*. *Anais da academia brasileira de ciencias*, v91.2019.

CANOON, C.P. Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clinical Cornerstone*, v. 8, p 11-28. 2007

CARVALHO, K.M.M.B. et al. The resin from protium hepthaphylum prevents High-Fat Diet-induced Obesity in mice: Scientific evidence and potential mechanisms. Evidenced-based complementary and alternative medicine. 2015.

CHO, S. et al. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. J Nutrition Biochem.2012.

COSTA, H.A. et al. Effect of treatment with carvacrol and aerobic training on cardiovascular functions in Spontaneously Hypertensive Rats. 2021.

CRAIGHEAD D. H et al. Mechanisms and time course of menthol-induced cutaneous vasodilation. Microvascular research. 2017.

CZAJA, M. A new mechanism of lipotoxicity: calcium channel blockers as a treatment for NASH. Hepatology. V.62. p 312-314.2015.

DALLONGEVILLE, J. et al. The Gly16→Arg16 and Gln27→Glu27 Polymorphisms of β 2-Adrenergic Receptor Are Associated with Metabolic Syndrome in Men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Vol 88, p. 4862–4866.2003.

DE SOUZA, G.M et al. The effect of α -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. Heliyon. V.6.2020.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. v. 2, p. 87-99.

ESLER, W.P & Bence, K.K. Metabolic Targets in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. Volume 8, Issue 2, 2019, Pages 247-267.

EZROKHI, M, et al. Neuroendocrine and metabolic componentes of dopaminergic agonist amelioration metabolic syndrome in SHR rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* Vol 6.2014

FARCO, J.A. et al. Menthol-pharmacology of an important naturally medicinal “cool”. *Mini Rev Med Chem*.2013.

FUCHS T, et al. Animal models in metabolic syndrome. *Rev Col Bras Cir*. Vol 45. E1975.2018

GODOY-MATOS, A.F et al. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. V.12.2020.

GOSH, P.M. et al. Role of β -adrenergic receptors in regulation of hepatic fat acumulation during aging. *Journal of Endocrinology*. 2012.

GUO x. et al., Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutical Sinica B*. 358-367, 2012.

HIRANO, T. Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Thromb*.2018

HONG, F. et al. Kaempferol attenuates cardiac hypertrophy via regulation of ASK/MAPk signaling pathway and Oxidative Stress. *Planta médica*.2017.

HUANG, X et al. The PI3K/AKT pathway in obesity a and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*. V.14, p 1483-1496.2018.

HUMEAU & SENOVILLA. Calcium signaling and cell cycle: progression or death. Cell calcium. V70 p3-15.2018.

JOHNSON C.D et al. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. Am J Physiol Heart Circ Physiol v.296 p.1868-1877.2009.

KARIM, S et al. Hepatic expression. and cellular distribution of the glucose transporters Family. World Journal of Gastroenterology. V 18,p 6771-6781.2012.

Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. BMC Medicine. 2011;9:48-61.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. vol 2014. 2014.

KIM et al. Adipocyte death preferentially induces liver injury and inflammation via the activation of CCR2+ macrophages and lipolysis. Hepatology. Vol.69, p 1965-1982.2019.

LAM Y.Y & RAVUSSIN E. Analysis of energy metabolism in humans: A review of methodologies. Molecular Metabolism 5, 1057-1071, 2016.

LEE, M et al. Association between serum Gamma-Glutamyltransferase and prevalence of Metabolic Syndrome using data from the Korean Genome and epidemiology study. Endocrinology and Metabolism. V.34, pag 390-397.2019.

LI, D et al. GLUT 4 storage vesicles: Specialized organelles for regulated trafficking. Yale J. boil Med.V.92, p 453-470.2019.

LILICH, F.F. et al. Multi-target approaches in metabolic syndrome. *Frontiers in pharmacology*.2021.

MANTA, E. et al. Resistant hypertension and metabolic syndrome –a two-way relationship. *Journal of Hypertension* v.39.p e331.2021.

MATOS, A.F.G et al. Neuroendocrinology of the metabolic syndrome. *Bras. Endocrinol. Metab.* Vol 47. 2003

MATSUBAYASHI, Y et al. Impact of metabolic syndrome and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease on cardiovascular risk by the presence or absence of type 2 diabetes and according to sex. *Cardiovascular Diabetology*. Vol.90.2022.

MEERAN, M.F. et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutical potential and pharmaceutical development. *Frontiers in pharmacology*. V.8.2017.

MIKALI, P et al. Pharmacological and therapeutics effects of mentha Longifolia L and its main constituent, menthol. *Ancient Science of Life* vol.33, p 129-136.2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Mediciniais e Medicamentos Fitoterápicos**, Fonseca, C. D., 1. ed. 2001

NAGHABI, A. D. Psychological Factors of Metabolic Syndrome. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*. Vol,2. P.641-643.2021.

NAKADE, Y. et al. Effect of adenergetic agonists on High- Fat diet-Induced hepatic steatosis in mice. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 21.2020.

NASSIR, F et al. Pathogenesis and prevention of hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, v 11. P 167-175.2015.

NI, L. et al. SGLT2 the glucose lowering effect. *Cardiovascular diabetology*. V.19.2020.

PAGANO, G. et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35, 367–372, doi: 10.1053/jhep.2002.30690 (2002).

PASCHOS, P & Paletas, K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. P.9-19. Vol 13.2009.

PEARSON, G.J et al. Canadian Cardiovascular Society guidelines for management of dyslipidemia for prevention of cardiovascular diseases in adults. *Canadian Journal of Cardiovascular*. V 37.2021.

PEDERSEN, J.M et al. Psychosocial risk factors for the metabolic syndrome: A prospective cohort study. *International Journal of Cardiology*. P.41-46.vol.215.2016.

PISKZORZ, D. Hypertension and metabolic disorders, a glance from different phenotypes. *American Journal of Preventive Cardiology*. V.2.2020.

PRASAD, N et al. Effects of menthol-flavored substances at te cellular level on oral mucosal sites. *Dental Research Journal*. P 7-11.2019.

RAVIRAJSIKH, N, J & RANJITSINH, V.D. Polyphenols in human health. *Encyclopedia of food Science and nutrition* 2^a edition.2014.

RUOTOLO, G et al. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2022.

RUSSO, I. The Prothrombotic Tendency in Metabolic Syndrome: Focus on the Potential Mechanisms Involved in Impaired Haemostasis and Fibrinolytic Balance. Scientifica.2012.

SAIF-ALI, R. et al. Relationship of metabolic syndrome defined by IDF or revised NCEP ATP III with glycemc control among Malaysians with Type 2 Diabetes. Diabetology & Metabolic Syndrome. Vol 12, p. 67.2020.

SAKLAYEN, M. G. The global epidemic of the metabolic syndrome. Curr Hypertension Rep. V 20.2018.

SALEHI, B et al. The therapeutic potential of narigenin: A Review of clinical trials. Pharmaceuticals.2019.

SANTOS, M.R.V et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. Brazilian Journal of Pharmacognosy v.21, p.764-771.2011.

SHI, Y et al. β 2 adrenergic receptor agonist induced hepatic steatosiss in mice: modeling nonalcoholic fatty liver diseases in hyperadrenergic states. Am J endocrinologiy metabo. V.321, p-E90-E104.2021.

SIGIT, F.S. et al. The prevalence of metabolic syndrome and its association with body fat distribution in middle-aged individuals from Indonesia and the Netherlands: a cross-sectional analysis of two population-based studies. Diabetology & Metabolic Syndrome. p.1-12. Vol2. 2020.

SILVEIRA L.R et al., Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante o exercício físico. Arq Bras Endocrinol Metabol, 55/5. 2011.

SINGH, R et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. V 8, p 322-328.2015.

SPALLETTA, S. et al. Carvacrol reduces adipogenic differentiation by modulation autophagy and ChREBP expression. *Plos One*. v.13.2018

STĂNESCU, A.M.A et al. Comparasion between humans and animal diagnosed with metabolic syndrome and obesity associated metabolic problems. *Romanian Journal of Medical Practice*. V 12. P 250-255.2017.

STEWART , L.K & Kline, J.A. Metabolic syndrome increases risk of venous thromboembolism recurrence after acute deep vein thrombosis. *Blood Adv* (2020) 4 (1): 127–135.

SZYMANSKI & SING. *Isoproterenol-StarPerals*. Bookshelf. 1^a Ed. 2022.

THOP. A.A & Schlaich, M.P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Diabetes Research*. 2015.

TKACHENKO, O. et al. Metabolic Syndrome and Lipid Metabolism Disorders: Molecular and Biochemical Aspects. *Acta facultatis medicae naissensis*. P.5-22. Vol.37.2020

WANG, S. et al. Association between liver function and metabolic syndrome in Chinese men and women. *Scientific reports*. Vol44844.2017.

WANG, C. et al. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Open Hypertens J*. p.1-13. Vol.3.2010.

WANG, G et al. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. In: Natural products: drug discovery and therapeutic medicine. Human press. Totowa, NJ. p.197-227.2005.

What is Metabolic syndrome?. National Heart, Lung and Blood institute (NIH). Disponível em: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/metabolicsyndrome.org>. Acesso em: 31/08/2022.

WON, E et al. Sodium-glucose cotransporters-2 inhibitors ameliorate liver enzyme abnormalities in Korean patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease. Frontiers endocrinology. V 12. 2021.

WONG, et al. Animal models of metabolic syndrome: a review. Nutrition & Metabolism. Vol.13. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: WHO, 2014

XU, H., et al. Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention. International Journal of Molecular Science. Vol.20.2019.

YADAV, D. et al. Incremental predictive value of serum AST-to-ALT ratio for incident Metabolic Syndrome: the ARIRANG study. Plos One. v.11.2016.

YKI-JÄRVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. The Lancet. Diabetes&Endocrinology. V2,p-901-910.2014.

ZAHA,D.M. et al. Influence of inflammation and adipocyte biochemical markers on the components of metabolic syndrome. Experimental and Therapeutic medicine. Vol.20. 2020.

ZIEGLER, M.G. et al. Epinephrine and the metabolic syndrome. *Current Hypertension Reports* volume 14, pages1–7 (2012).