

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

VALÉRIA NUNES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS HEPÁTICAS E DO
BALANÇO REDOX EM UM MODELO MURINO PARA A SÍNDROME
METABÓLICA INDUZIDA POR UMA DIETA HIPERCALÓRICA**

Maceió
2011

VALÉRIA NUNES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS HEPÁTICAS E DO
BALANÇO REDOX EM UM MODELO MURINO PARA A SÍNDROME
METABÓLICA INDUZIDA POR UMA DIETA HIPERCALÓRICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa Dra Luíza Antas Rabêlo.

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S729a Souza, Valéria Nunes de.

Avaliação das alterações morfo-funcionais hepáticas e do balanço redox em um modelo murino para a síndrome metabólica induzida por uma dieta hipercalórica) / Valéria Nunes de Souza. – 2011.

95 f. : il. color.

Orientadora: Luíza Antas Rabêlo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Síndrome metabólica. 2. Fígado gorduroso não alcoólico. 3. Doença hepática. 4. Balanço Redox. 5. Senilidade. I. Título.

CDU: 612.39:612.354



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado
CEP 57.010-020. Maceió-AL
(82) 3223-5613; 3336-0757
e-mail: pgcs@propep.ufal.br

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Valéria Nunes de Souza, intitulado: "Avaliação das alterações morfo-funcionais hepáticas e do balanço redox em um modelo murino para a síndrome metabólica induzida por uma dieta hipercalórica.", orientada pela Prof.^a Dra. Luiza Antas Rabelo, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 27 de julho de 2011.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Maria Emília da Silva Menezes – (UFCG)

Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai - (UFAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto - (UFAL)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

Reitora: Ana Dayse Rezende Dorea

Vice-Reitor: Eurico de Barros Lôbo Filho

Diretora do ICBS: Theresinha C. Calado

Coordenador do Programa: Emiliano de Oliveira Barreto

Orientadora da Dissertação: Luíza Antas Rabêlo

*Aos meus pais Givanildo (in memoriam) e Fátima,
pelo amor e cuidado incondicional*

Agradecimentos

A Deus por sua infinita misericórdia, pela presença e pelo cuidado mesmo diante da minha pouca fé e da minha pequenez, por ter me dado força para concluir etapas da minha vida e me ajudado a conduzi-las diante das adversidades, muitas vezes enviando-me “anjos” disfarçados de humanos...;

A minha família, meu alicerce: meu pai Givanildo Rodrigues (*in memoriam*), minha mãe Fátima Nunes e irmãos Carlos Eduardo e Franciolly Henrique, meus tesouros terrenos, minha fonte de força, meus exemplos, meu porto seguro...Obrigada por entenderem minha opção pela pesquisa, minhas noites em claro para escrever e estudar, minhas inúmeras ausências... obrigada pela formação que me deram, pelo apoio em tudo que fiz até o momento, pelo exemplo de vida que são...

O meu respeito e agradecimento aos animais experimentais (**C57Bl/6J**) que constituíram o corpo desta dissertação;

À **Professora Dra. Luíza Antas Rabêlo** pelo aprendizado, orientação, tempo dispensado, reuniões, experimentos, conversas, caronas e muitas caronas (pessoais e experimentais). Pela força, incentivo e cuidado (mesmo que implícito) em diferentes momentos da minha vida e, principalmente, pelo exemplo acadêmico. Desculpe minhas falhas e fraqueza, muitas vezes detectada por você em algumas situações...

Aos colegas do Laboratório de Reatividade Cardiovascular: **Cheila Gomes** (nossa! Como foi importante nesse processo, sua participação foi ímpar, em todos os momentos: início, meio e fim dos experimentos, tanta coisa para te agradecer que aqui não caberia, obrigada ainda é muito pouco), **Lucas Fonseca** (meu amigo único e muito especial, meu primo de quarto grau, obrigada pela disponibilidade de sempre (no laboratório e fora deste) e pelo apoio experimental), **Glaucevane Guedes** (amiga de todas as horas, verdadeiro “quebragalho”... obrigada pela força em momentos difíceis, pela ajuda experimental durante o tratamento dos animais e nas dosagens e análises hepáticas), **Glauber Schettino** (pelas vezes que foi buscar maravalha para nossos animais experimentais, gelo seco, e pelas tantas caronas nas noites de quarta-feira, obrigada pelo seu companheirismo dentro e fora do laboratório), **Anita Gomes** (pela ajuda nos sacrifícios, nas caronas para UFAL em dias de dosagens, caronas (inúmeras) para casa em noites de quarta-feira, mas além de tudo isso obrigada pela sua amizade e seu cuidado), **Alberto Silva** (o Sr. Oliveira, meu grande amigo, me perturba muito, mas eu gosto tanto dele, é grande no tamanho e no coração, um verdadeiro irmão mais velho, obrigada por todo apoio e ajuda), **Reidson Beiriz** (Sr. Muniz, sua participação também foi muito importante dentro e fora do laboratório, obrigada pelo apoio, meu amigo), **Alexandre Omena** (pela maravalha, gelo seco, caronas... obrigada), **Marcos Eleutério** (obrigada pelas suas caronas também, principalmente aquelas fora de hora, pelas conversas e tudo mais), **Flávio Moura**, **Halina Araújo**, **Luíza Fernandes**, **Sócrates Afonso**, **Mariana Alencar**, **Stella Vasconcelos** e **José Leitão**, pelo companheirismo laboratorial. Ao **Jeomacio Silva**, o técnico do laboratório, pela sua boa vontade e disponibilidade;

Parágrafo merecido a minha grande amiga **Tâmara Gomes**, amiga de poucas datas, mas de uma intensidade sem igual. Lembro-me da primeira vez que estive em minha casa, foi tudo tão natural que parecia que você já fazia parte da minha vida há muito tempo, neste dia eu percebi que você seria uma grande amiga e eu não errei. Te admiro demais, principalmente

pela sua ética, seu senso de justiça, companheirismo, amizade e esse sangue cientista que corre em suas veias e artérias, você vai muito longe. Muito obrigada pela sua amizade, seu companheirismo, seu cuidado, sua alegria contagiante, pelas conversas que rendem muitas idéias científicas ou não (ainda seremos colaboradoras, acredite!), pelas tapiocas...;

A um grande amigo, **Agamenon Ramos**, pelas palavras sempre tão animadoras e de conforto, pelo incentivo a ser feliz e fazer os outros felizes, por transmitir-me Deus e seus ensinamentos, pelos sorrisos que consegui tirar de mim em momentos tensos (o que é muito difícil, mas ele consegue), pela presença e pela epigrafe desta dissertação, obrigada meu amigo;

A todos os meus amigos que, de alguma forma, contribuíram em meu crescimento, seja ele científico ou não;

Aos integrantes dos laboratórios de **Recursos Naturais, Eletroquímica e Biologia Celular**, coordenado pelo Prof. Euzébio S'antana, Profa. Marília Oliveira e Profs. Salete Smaniotto e Emiliano Barreto, respectivamente, pelo apoio no uso de equipamentos necessários para as dosagens;

Aos integrantes do Laboratório de Imunohistologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), representado pela Profa. Salete Smaniotto, pela colaboração na parte histológica do trabalho, a citar: Fátima Sarmiento, pelos cortes histológicos, Dona Delma Souza, pela ajuda durante a coloração, Larissa Oliveira, Danielma Reis, Altair Brandão, Rafael Vital, pelo tempo dispensado durante os experimentos;

Meus agradecimentos aos **funcionários do ICBS**: da limpeza, da portaria, da “Xerox”, da secretaria, do laboratório de informática, da cantina e da biblioteca;

Ao **Prof. Dr. Michael Bader** e a **Dra. Natalia Alenina** (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, MDC-Berlin) pela doação de alguns reagentes necessários para realização das dosagens enzimáticas;

A **Universidade Federal de Alagoas** pelo acolhimento desde a graduação;

À **Pós-Graduação em Ciências da Saúde e todos os professores** pela oportunidade de realização deste mestrado e colaboração na minha formação acadêmica;

Aos **colegas de turma** pelos momentos bons de aprendizado que passamos juntos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo fomento financeiro e bolsa de mestrado;

À Banca de qualificação, composta pelos Profs. Emiliano Barreto, Fabiana Cavalcante e Profa. Salete Smaniotto, pela contribuição, sugestões e leitura minuciosa da dissertação;

À Banca de defesa pelo aceite e contribuição neste momento ímpar de formação acadêmica.

“A palavra é metade de quem a pronuncia e metade de quem a ouve”. (Michel Montaigne)

Muito Obrigada!!!

Valéria Nunes

Os Melhores Intérpretes de Deus

Acreditamos que os melhores intérpretes de nosso tempo são os cientistas, cujo objetivo nutriente de suas pesquisas é de traduzir a dimensão, majestade, harmonia, elegância e absoluta engenharia do Universo.

Esses seres são os sinais visíveis do Amor de Deus em querer construir um mundo sem esquecer-se do Céu.

Vários cientistas apontam que o Universo foi projetado por um Engenheiro Notável, que é conhecido como Deus e que

a ciência não faz nada além de explorar a criação de Deus. Queremos dizer que Deus e ciência podem coexistir de maneira que tornará o mundo um lugar em que todos vivam de forma amorosa. Os cientistas acreditam que Deus está na ciência e que o ato de pesquisar os leva a compreenderem que todas as informações adquiridas em um laboratório têm, por trás, um agente inteligente.

Agamenon Duarte Ramos

RESUMO

As doenças hepáticas gordurosas não-alcoólicas (DHGNA) foram apresentadas, recentemente, como um novo componente da Síndrome Metabólica (SMet), desempenhando o estresse oxidativo papel fundamental na progressão destas. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar as alterações morfo-funcionais hepáticas e do balanço redox em um modelo murino para a SMet induzida por uma dieta hipercalórica, após tratamentos com tempol e apocinina. Camundongos machos C57Bl/6, jovens (6-8 semanas) e idosos (53-57 semanas), foram divididos em quatro grupos: grupo controle (CT; “n” jovem=8 e “n” idoso=5), alimentado com dieta “chow” (14% calorias provenientes dos lipídios); grupo DHC (“n” jovem=9 e “n” idoso=5), que recebeu dieta hipercalórica por 14 semanas (58,4% calorias provenientes dos lipídios); grupo DHC + Tempol (“n” jovem=4 e “n” idoso=9), que recebeu dieta hipercalórica e tratamento com tempol (50mg/kg) na água de beber; grupo DHC + Apocinina (“n” jovem=4 e “n” idoso=9), alimentado com dieta hipercalórica e tratado com apocinina (50mg/kg) na água de beber. Avaliações metabólicas, do estado redox e análise histológica hepática foram realizadas. Após o término do período experimental, os animais DHC jovens não apresentaram significativo ganho de peso corporal, sendo este observado nos animais DHC idosos quando comparados ao grupo CT. O tratamento com tempol e apocinina não modificou este parâmetro em ambos os grupos. Os animais DHC, tanto jovens quanto idosos, apresentaram hiperglicemia de jejum e o tratamento com tempol e apocinina não modificou este perfil. Uma significativa melhora na tolerância à glicose dos animais jovens foi observada após o tratamento com a apocinina, o mesmo não ocorrendo após o tratamento com o tempol. Nos animais idosos, uma melhora significativa foi observada na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina após o tratamento com tempol e apocinina. Acentuado acúmulo de gordura visceral foi identificado nos animais DHC (jovens e idosos), de modo que o tratamento com o tempol e a apocinina não alterou este perfil. Elevada concentração plasmática de colesterol total foi observada nos animais DHC jovens e idosos comparado ao CT, o mesmo não ocorrendo para triglicerídeos, VLDL e peroxidação lipídica plasmática em ambos grupos DHC, jovens e idosos. O tratamento farmacológico em questão não modificou estes parâmetros plasmáticos. Nos animais DHC jovens, não foram observadas mudanças significativas na atividade das enzimas AST, ALT, razão AST/ALT, ALP, -GT, LDH, albumina e proteínas totais, quando comparado ao grupo CT. Contudo, nos animais idosos DHC, elevada atividade da AST e da razão AST/ALT foram observadas dentre estes parâmetros de avaliação hepática. Os animais DHC, jovens e idosos, apresentaram elevada peroxidação lipídica e acúmulo de gordura hepática, com numerosos vacúolos gordurosos à histologia. O tratamento farmacológico com tempol e apocinina melhorou, de forma qualitativa, o acúmulo de gordura hepática, tanto nos animais jovens quanto nos idosos, sem, entretanto, modificar a peroxidação lipídica hepática. Além disso, os animais idosos DHC apresentaram elevados níveis hepáticos de lipídios totais, triglicerídeos, colesterol total e VLDL colesterol, não sendo observado o mesmo nos animais jovens DHC. A atividade hepática das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) não diferiu significativamente após os tratamentos dietético e farmacológico. O aumento na atividade da NADPH oxidase, e consequentemente a produção de anion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), pode estar envolvida nos mecanismos associados à SMet e às DHGNA.

Palavras-chave: Síndrome Metabólica. Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica. Balanço Redox. Senilidade.

ABSTRACT

The non-alcoholic fat liver diseases (NAFLD) have been presented, recently, as a novel component of the Metabolic Syndrome (MetS), representing the oxidative stress a critical role in their progression. In this context, the present study aimed to assess the morphofunctional hepatic alterations and the redox balance in a murine model for the MetS induced by a high calorie diet, after treatment with tempol and apocinina. C57Bl/6 male mice, young (6-8 weeks) and elderly (53-57 weeks), were divided in four groups: control group (CT; “n” young=8 and “n” elderly=5), fed with “chow” diet (14% calories from lipids); DHC group (“n” young=9 and “n” elderly=5), receiving hypercaloric diet for 14 weeks (58,4% calories from lipids); DHC + Tempol group (“n” young=4 and “n” elderly=9), which received hypercaloric diet and treatment with tempol (50mg/kg) in the water for drinking; DHC + Apocinin group (“n” young=4 and “n” elderly=9), fed with a hypercaloric diet and under apocinin treatment (50mg/kg) in the water for drinking. Metabolic and the redox state assessment, as well as the histological analyses were performed. After the end of the experimental period, young DHC animals were not shown to present significant weight gain, being the latter observed in the elderly DHC animals, when compared to CT group. The treatment with tempol and apocinin was not effective in modifying this parameter in both groups. The DHC animals, both young and elderly, showed fasting hyperglycaemia, and the treatment with tempol and apocinin did not change this profile. A significant improvement in the glucose tolerance was observed in the young animals after the treatment with apocinin, but the treatment with tempol failed to show so. In the elderly animals, a significant improvement in the glucose tolerance and insulin sensitivity was identified after the treatment with tempol and apocinin. An elevated accumulation of visceral fat was identified in the DHC animals (young and elderly), so that the treatment with tempol and apocinin did not alter this profile. An elevated serum concentration of total cholesterol was shown in the young and elderly DHC animals when compared to the CT group, the same not happening to triglycerides, VLDL and lipid peroxidation in both groups, young and elderly. The pharmacological treatment was not shown to be effective in altering these serum parameters. In the young DHC animals, it was not observed significant changes in the enzymatic activities of the AST and ALT, as well as AST/ALT ratio, ALP, -GT, LDH, albumin and total proteins, when compared to the CT group. However, in the DHC elderly animals, and increased AST activity and AST/ALT ratio were observed among these parameters of hepatic assessment. The DHC animals, young and elderly, presented elevated lipid peroxidation and fat liver accumulation, with numerous fat vacuoles at histology. The pharmacological treatment with tempol and apocinin ameliorated, in a qualitative manner, the fat accumulation in the liver, both in the young and elderly animals, without, however, modifying the hepatic lipid peroxidation. Furthermore, the DHC elderly animals presented high hepatic levels of total lipids, triglycerides, total cholesterol and VLDL cholesterol, with a similar condition not being observed in the DHC young animals. The hepatic activity of the antioxidant enzymes (SOD and CAT) was not shown to be significantly different after the dietary and pharmacological treatments. An increase in the NADPH oxidase activity, and consequently the increased production of superoxide anion (O_2^-), may be involved in the mechanisms associated to the MetS and the NAFLD.

Keywords: Metabolic Syndrome. Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Redox Balance. Senility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Via de sinalização desencadeada pela insulina após ligação com o receptor na membrana celular.....	28
Figura 2 -	Mecanismo de resistência à insulina induzido pela obesidade.....	30
Figura 3 -	Esquema simplificado da hipótese dos dois <i>hits</i>	34
Figura 4 -	Caminhos chave na patogênese da DHGNA.....	36
Figura 5 -	Diminuição da produção de $\cdot\text{NO}$ via sinalização insulínica.....	38
Figura 6 -	A obesidade corrompe o funcionamento do sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria.....	40
Figura 7 -	Camundongos C57BL/6 (A) e dietas utilizadas no estudo, “chow”(B) e hipercalórica (C).....	44
Figura 8 -	Esquema para dosagem em microplaca.....	47
Figura 9 -	Reação para avaliação da atividade da SOD (Fluka [®]).....	49
Figura 10 -	Foto representativa dos camundongos C57BL/6J (A) CT-Jovem, (B) DHC-Jovem, (C) CT-Idoso e (D) DHC-Idoso, após intervenção dietética, com enfoque (em círculo vermelho) para o acúmulo de gordura visceral.....	59
Figura 11 -	Fotomicrografias de cortes histológicos (6 μm) obtidos dos camundongos C57BL/6 jovens, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE).....	70
Figura 12 -	Fotomicrografias de cortes histológicos (6 μm) obtidos dos camundongos C57BL/6 idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE).....	71
Figura 13 -	Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações observadas no modelo de síndrome metabólica, com e sem obesidade central, induzida por uma dieta hipercalórica.....	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Ingesta alimentar dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com tempol (50 mg/kg) e apocinina (50 mg/kg).....	52
Gráfico 2 - Acompanhamento do peso corporal dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B) com intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	53
Gráfico 3 - Comprimento tibial dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B) após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e apocinina (50 mg/kg).....	54
Gráfico 4 - Avaliação da glicose de jejum dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B) durante intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	55
Gráfico 5 - Tolerância à glicose em camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	56
Gráfico 6 - Sensibilidade à insulina em camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	57
Gráfico 7 - Peso relativo do tecido adiposo epididimal (A e B), perirenal (C e D) e mesentérico (E e F) dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	60
Gráfico 8 - Peso hepático relativo dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	61
Gráfico 9 - Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e a razão AST/ALT dos camundongos C57BL/6 jovens (A , C e E , respectivamente) e idosos (B , D e F , respectivamente), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).....	64
Gráfico 10 - Peroxidação lipídica hepática em concentração de MDA (malonildialdeído) por miligrama de proteína dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).....	66
Gráfico 11 - Atividade da SOD (superóxido dismutase) em camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	67
Gráfico 12 - Atividade da catalase em camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina	

(50mg/kg).....	67
Gráfico 13 - Conteúdo lipídico total no tecido hepático dos camundongos C57BL/6 jovens (A) e idosos (B), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	68
Gráfico 14 - Concentração de triglicerídeos, colesterol e VLDL no tecido hepático dos camundongos C57BL/6 jovens (A , C e E , respectivamente) e idosos (B , D e F , respectivamente), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica de acordo com diferentes organizações mundiais.....	26
Tabela 2 -	Distribuição calórica percentual dos macronutrientes das dietas <i>chow</i> e hipercalórica.....	44
Tabela 3 -	Peso tecidual relativo dos animais jovens submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	58
Tabela 4 -	Peso tecidual relativo dos animais idosos submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	58
Tabela 5 -	Concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, VLDL e [MDA] dos animais jovens submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	62
Tabela 6 -	Concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, VLDL e [MDA] dos animais idosos submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).....	62
Tabela 7 -	Atividades plasmáticas de marcadores hepáticos: fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (-GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos camundongos C57Bl/6 jovens, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).....	65
Tabela 8 -	Atividades plasmáticas de marcadores de função hepática: fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (-GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos camundongos C57Bl/6 idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína cinase de serina/treonina
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ATP III	Adult Treatment Panel III
BHT	Hidroxitolueno butilado
BH4	Tetrahydrobiopterina (<i>Tetrahydrobiopterin</i>)
CAT	Catalase
CC	Circunferência da cintura
CHCl₃	Clorofórmio
COL	Colesterol total
CT	Controle
DHC	Dieta hipercalórica
DHGNA	Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
GLUT	Transportadores de glicose (<i>Glucose transporters</i>)
GPx	Glutationa peroxidase
HC	Hipercalórico (a)
HE	Hematoxilina e Eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
High fat	Gordura elevada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
IDF	Federação Internacional de Diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
i.p.	Intraperitoneal
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária (<i>Intermediate Density</i>)

	<i>Lipoprotein</i>)
IMC	Índice de massa corpórea
IRS1	Substrato do receptor da insulina 1 (<i>insulin receptor substrate 1</i>)
IRS2	Substrato do receptor da insulina 2 (<i>insulin receptor substrate 2</i>)
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LPL	Lipase lipoproteica (<i>lipoprotein lipase</i>)
LRC	Laboratório de Reatividade Cardiovascular
MeOH	Metanol
MDA	Malonildialdeído
MDC	<i>Max Delbrück Center for Molecular Medicine</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NADPHox	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>)
NAFLD	non-alcoholic fat liver diseases (Doença do fígado gorduroso não alcoólico)
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Sintase do óxido nítrico
O₂	Oxigênio molecular
·O₂⁻	Ânion radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
OONO⁻	Peróxido nitrito
PA	Pressão arterial
PBS	Solução fosfato tamponada (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PI3- kinase	Fosfoinositol-3-kinase
PKC	Proteína cinase C
PKC	Proteína cinase tetha
PTNs	Proteínas
RI	Resistência à insulina
RIPA	Tampão para radioimunoprecipitação (<i>radioimmunoprecipitation assay buffers</i>)
rpm	Rotações por minuto
RCQ	Relação cintura quadril

SMet	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid</i>)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TG	Triglicerídeos
TNF-	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UI	Unidade internacional
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio)
-GT	Gama glutamiltransferase
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Problematização	19
1.2 Justificativa	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 Síndrome metabólica: marcos históricos, definições e contexto epidemiológico	24
3.2 Patogenia e o novo componente da SMet: DHGNA	27
3.3 Papel do balanço redox na SMet e DHGNA	36
3.4 SMet e seus agravos no processo de envelhecimento	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Animais e delineamento experimental	43
4.2 Dieta hipercalórica	44
4.3 Tratamento farmacológico	44
4.4 Avaliações <i>in vivo</i>	45
4.4.1 Ingesta alimentar.....	45
4.4.2 Peso corporal.....	45
4.4.3 Glicose de jejum.....	45
4.4.4 Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.....	45
4.5 Sacrifício dos animais	45
4.6 Peso relativo tecidual	46
4.7 Avaliações sistêmicas	46
4.7.1 Avaliação do perfil lipídico plasmático.....	46
4.7.2 Mensuração dos marcadores de função e lesão hepática.....	47
4.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica plasmática.....	48
4.8 Avaliações locais (hepáticas)	48
4.8.1 Obtenção do homogenato hepático.....	48
4.8.2 Avaliação da peroxidação lipídica hepática.....	49
4.8.3 Mensuração da atividade da superóxido dismutase hepática.....	49
4.8.4 Mensuração da atividade da catalase hepática.....	49
4.8.5 Perfil lipídico hepático.....	50
4.8.6 Avaliações histológicas hepáticas.....	51

4.9 Análise dos Resultados	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Ingesta alimentar	52
5.2 Avaliação do peso corporal e crescimento dos animais	52
5.3 Glicose de jejum	54
5.4 Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	55
5.5 Peso relativo tecidual	57
5.5.1 Perfil de gordura visceral.....	58
5.5.2 Peso tecidual hepático.....	61
5.6 Avaliações sistêmicas	62
5.6.1 Perfil lipídico e peroxidação lipídica plasmática.....	62
5.6.2 Marcadores de função e lesão hepática.....	63
5.7 Avaliações teciduais hepáticas	66
5.7.1 Peroxidação lipídica hepática.....	66
5.7.2 Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase hepática.....	66
5.7.3 Perfil lipídico hepático.....	67
5.7.4 Avaliações histológicas hepática.....	70
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	87
8 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problematização

A obesidade é associada com diversas doenças e alterações metabólicas, como o diabetes tipo II, e sofre influências sociais, culturais e econômicas (GARCÍA et al., 2008; OUCHI et al., 2011). A obesidade pode surgir devido a fatores genéticos e fatores ambientais. Entretanto, é decorrente, principalmente, destes últimos, ou seja, aqueles associados à ingestão alimentar inadequada, e ao estilo de vida sedentário, isto é, aumento do consumo energético e diminuição de gasto energético, respectivamente (MARQUES et al., 2010; PALETAS et al., 2010).

Nesse contexto, a predisposição genética, a alimentação inadequada e a inatividade física estão entre os principais fatores que contribuem para o surgimento da Síndrome metabólica (SMet), condição complexa que reúne, além de obesidade corporal e/ou visceral (FONSECA, 2008), diversos fatores de risco cardiovasculares, como o diabetes tipo II (MOLNAR et al., 2005), hipertensão arterial sistêmica (MATHIEU et al., 2009), dislipidemia (BERTOLAMI, 2004), resistência à insulina (RI) (ZECCHIN et al., 2004), hiperinsulinemia (NADRUS Jr. e FRANCHINI, 2004) e as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) (KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2007; FRAULOB et al., 2010), constituindo, desta forma, um desafio multidisciplinar na prática clínica, com importante repercussão para a saúde.

As mudanças anteriormente citadas podem vir acompanhadas e/ou advirem de alterações sistêmicas e locais, em destaque, as possíveis alterações no balanço redox. Uma vez alterada a sinalização redox, seja pela elevada produção e concentração destas espécies reativas e/ou pela diminuição daquelas ditas antioxidantes, o efeito biológico deixa de ser benéfico (pela participação na regulação em vários mecanismos fisiológicos chaves), e passa a ser citotóxico (reagindo diretamente com vários alvos intracelulares como lipídios, proteínas e DNA), caracterizando desta forma, o desbalanço redox (WEYDERT e CULLEN, 2009; HIGASHI et al., 2009; WIRTZ et al., 2009).

O desbalanço redox possui um papel relevante na gênese e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares relacionadas à SMet, podendo estar relacionado a condições

dietéticas (ROBERTS et al., 2006; JIMÉNEZ et al., 2007). Nesse cenário, o uso inadequado de dietas hipercalóricas (HC) pode constituir uma das principais causas do aparecimento deste desequilíbrio e conseqüentemente, daqueles relacionados à SMet, como o diabetes, a dislipidemia, a resistência à insulina e DHGNA (ROBERTS et al., 2006; GUEDES, 2009; FRAULOB et al., 2010).

A DHGNA é uma doença crônica caracterizada pela infiltração de gordura no fígado (esteatose), podendo progredir para esteatohepatite não alcoólica, a qual é composta por inflamação e fibrose, e em último estágio levando a cirrose e hepatocarcinoma (MANTENA et al., 2008; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008).

O estresse oxidativo participa da progressão das DHGNA e esta relação pode ser devido à sobrecarga de ácidos graxos de cadeia longa ao fígado e, em um segundo passo a produção de espécies reativas, o que pode saturar o sistema antioxidante hepático (UCHIYAMA et al., 2006; QURESHI e ABRAMS, 2007; MANTENA et al., 2008). Tal evento pode acontecer pela diminuição da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), como também pela elevada peroxidação lipídica, além da indução de citocinas pró-inflamatórias. Esses eventos contribuem para a progressão da esteatose para esteatohepatite não alcoólica, fibrose e por último, cirrose (VIDELA et al., 2004; UCHIYAMA et al., 2006; RAMADORI et al., 2008).

A progressão das DHGNA aumenta com o grau de obesidade, fato que a classifica como uma manifestação da SMet. (QURESHI e ABRAMS, 2007). Além disso, existe uma correlação entre os componentes da SMet, incluindo a circunferência da cintura e a deposição de gordura visceral, com a concentração de gordura no fígado (KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2007).

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram a presença de DHGNA em camundongos com fenótipo para a SMet, obtido pela exposição à uma dieta hipercalórica por um período de 26 semanas. Além disso, essa dieta hipercalórica também induziu, nesse mesmo modelo, um desbalanço redox hepático e sistêmico, avaliado pela atividade alterada de enzimas antioxidantes e presença de peroxidação lipídica (GUEDES, 2009; SOUZA, 2009). Contudo, as avaliações em função da idade animal ainda não haviam sido avaliadas.

O uso de dietas com alto teor calórico em idade avançada contribui para o aparecimento mais precoce de doenças metabólicas, incluindo as DHGNA (GUPTE et al., 2010). Nesse contexto, fazem-se necessários estudos que correlacionem este componente hepático da SMet (a DHGNA) com a idade e a contribuição das dietas “high fat” no aparecimento e progressão destas patologias, bem como a investigação de possíveis vias oxidativas envolvidas nesse processo, tendo em vista a grande importância deste órgão para o metabolismo de nutrientes, síntese de proteínas, metabolização de fármacos, entre outros.

1.2 Justificativa

A elevação das taxas de doenças cardiometabólicas, como as observadas na SMet, é decorrente, principalmente, das mudanças dietéticas observadas na atualidade e associadas ao sedentarismo. Assim, a obesidade surge à medida que o se consome é superior ao gasto energético, situação corriqueiramente observada no mundo ocidental. Atualmente, este cenário compõe um grave problema de saúde pública (GARCÍA et al. 2008; PALETAS et al., 2010).

Além da obesidade, outras desordens metabólicas surgem em decorrência desta prática alimentar inadequada, como aquelas que caracterizam a SMet. Somando-se a estes agravos, tem ganhado destaque, como o mais novo componente da SMet, a DHGNA (FRAULOB et al., 2010; MARQUES et al., 2010).

Neste contexto, sabendo-se da importância fisiológica do fígado, o conhecimento das alterações patológicas no mesmo, principalmente quando associadas a outras manifestações da SMet, são de grande importância para a manutenção da qualidade de vida, sendo, portanto, a DHGNA alvo de diferentes pesquisas na atualidade (FRAULOB et al., 2010; MARQUES et al., 2010; MEIJER et al., 2010). Estas intentam investigar, de forma mais aprofundada, possíveis vias, inclusive as oxidativas, envolvidas no aparecimento deste agravo, bem como a busca por novos métodos de prevenção, diagnóstico e terapêutica desta condição patológica, decorrente, principalmente, da ingestão de dietas com alto teor calórico (HADDAD et al., 2009; VINAIXA et al., 2010; LI et al., 2010).

A partir das premissas levantadas, este estudo tem a finalidade de contribuir com o conhecimento destas vias patogênicas induzidas por uma dieta hipercalórica rica em lipídios,

no que diz respeito ao aparecimento de complicações semelhantes às aquelas observadas na SMet e, desta forma, incentivar a busca por novos métodos de prevenção, diagnóstico e terapêutica que venham melhorar a qualidade de vida de pacientes portadores destes agravos metabólicos, bem como evitar o aparecimento e progressão destes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil morfo-funcional hepático e o balanço redox em um modelo murino para a síndrome metabólica induzida por uma dieta hipercalórica, após tratamentos com tempol e apocinina.

2.2 Específicos

- Analisar parâmetros relacionados com a síndrome metabólica, tais como: peso corporal, perfil glicêmico, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, perfil lipídico plasmático e hepático em camundongos C57BL/6 jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica;
- Avaliar o peso relativo tecidual e o perfil de gordura visceral em camundongos C57BL/6 jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica;
- Mensurar os níveis plasmáticos de marcadores de lesão e função hepática (AST, ALT, ALP, -GT, LDH, proteínas totais e a fração albumina) em camundongos C57BL/6 jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica;
- Avaliar o balanço redox hepático pela mensuração da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, bem como a peroxidação lipídica em camundongos C57BL/6 jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica;
- Realizar a análise histopatológica hepática em camundongos C57BL/6 jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Síndrome metabólica: marcos históricos, definições e contexto epidemiológico

A SMet é reconhecida como uma doença metabólica complexa que reúne fatores de risco cardiovasculares, o que a classifica como um dos principais desafios da prática clínica atualmente, na medida em que a dificuldade terapêutica soma-se a dificuldade de manter os resultados em longo prazo, tornando-a um grande e importante foco de investigações (GARCÍA et al., 2008).

Esta desordem vem sendo discutida desde a década de 80, porém as primeiras descrições foram feitas em 1965 com estudo de Avogaro e colaboradores. No ano de 1979, houve grande expansão no entendimento de um dos principais componentes da SMet, a resistência à insulina, por DeFronzo e colaboradores, e mais tarde Reaven (1991A,B; 1992) progrediu com a hipótese da resistência à insulina como mecanismo central da SMet. Contudo, o conhecimento acerca desta síndrome progrediu a partir do reconhecimento do tecido adiposo como um órgão endócrino produtor de substâncias bioativas e não apenas como um reservatório energético (LOPES, 2004; OUCHI et al., 2011).

A prevalência da SMet é crescente e estudos apontam os fatores ambientais, tais como hábitos alimentares e sedentarismo, como principais causas. O aumento do consumo de alimentos com conteúdos lipídicos e glicídicos elevados e o menor consumo de itens naturais (frutas e verduras) levam a deficiências nutricionais e o aparecimento de morbidades crônicas. Este quadro se agrava quando associado a um comportamento sedentário, situação observada nos centros urbanos e que decorrem, principalmente, de fatores como falta de tempo para a prática de exercícios e o comodismo. Essas alterações no perfil nutricional e na diminuição da atividade física da população são representadas pelo aparecimento da obesidade, resultado do aumento do consumo e diminuição de gasto energético, respectivamente (BARNES et al., 2007; MARQUES et al., 2010; PALETAS et al., 2010).

A resistência à insulina é caracterizada como ponto central da SMet (ZECCHIN et al., 2004). Contudo, dentre as alterações metabólicas que a caracterizam, a obesidade parece ser um dos fatores desencadeantes mais importantes. Nas definições de SMet de acordo com as diferentes organizações mundiais, a saber Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998),

“National Cholesterol Evaluation Program for Adult Treatment Panel III” (ATP III, 2001) e Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation (IDF, 2005), mostradas na tabela 1, a obesidade é um parâmetro constante como critério diagnóstico, avaliada pelo índice de massa corporal e circunferência da cintura. Além disso, na prática clínica, a associação de obesidade e SMet são comuns, para fins de prevenção, diagnóstico e tratamento (GARCÍA et al., 2008)

A obesidade como parâmetro da SMet é expressa tanto pela obesidade corporal quanto pela visceral, isto é, os indivíduos podem apresentar uma ou outra manifestação, não sendo, portanto, necessária a presença de obesidade corporal para serem considerados portadores de SMet. A própria definição de SMet, de acordo com o IDF (2005), não inclui a obesidade corporal como parâmetro diagnóstico, mas a abdominal (ou visceral), avaliada pela medida da circunferência da cintura (CC). Além disso, estudos apontam que sujeitos com obesidade abdominal e que apresentam características associadas com a resistência à insulina, estão com risco aumentado de doenças cardiovasculares, semelhantes àquelas que caracterizam a SMet (GASTALDELLI et al., 2002; VERLOHREN et al., 2004; CHATTERJEE et al., 2009).

Outras alterações metabólicas, apesar de parecer ser menos importantes (pressão arterial, níveis de glicose de jejum e níveis lipídicos), são consideradas em todas as organizações supracitadas. Contudo, recentemente, as DHGNA passaram a ser consideradas como mais um componente da SMet, pela forte associação de todos os componentes da SMet com a concentração de gordura no fígado, representando, desta forma, mais um parâmetro diagnóstico para a SMet (KOTRONEN et al., 2007; FRAULOB et al., 2010).

No Brasil, os critérios do ATP III (2001) são os recomendados pela I Diretriz Brasileira no Diagnóstico e Tratamento da SMet (2005), em função da sua simplicidade e praticidade clínica, uma vez que nos critérios da OMS (1998) é considerada como ponto de partida a avaliação da resistência à insulina, o que não o torna prático sob o ponto de vista clínico. A diferença que existe entre as definições de SMet, de acordo com as organizações mundiais mostradas na tabela 1, no que diz respeito aos componentes essenciais e a combinação dos critérios, dificulta os estudos comparativos de prevalência da SMet entre as diferentes populações, bem como as variações geográficas (FORD e GILES, 2003; Diretriz Brasileira de Diabetes, 2007).

Tabela 1 – Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica de acordo com diferentes organizações mundiais - Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998), “National Cholesterol Evaluation Program for Adult Treatment Panel III” (ATP III, 2001) e Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation (IDF, 2005).

Organização	Parâmetros
OMS¹ (1998)	Hiperinsulinemia ou regulação de glicose alterada e 2 outros fatores: <ul style="list-style-type: none"> ✓ TG⁴ (mg/dL) > 150 ✓ HDL⁵ (mg/dL) < 35 P/H⁶ e <39 P/M⁷ ✓ Tratamento anti-hipertensivo ou PA⁸ (mmHg) 140 e/ou 90 ✓ RCQ⁹ > 0,90 P/H e > 0,85 P/M ✓ Microalbuminúria (mg/min) 20 ✓ IMC¹⁰ > 30 kg/m²
ATP III² (2001)	Três ou mais fatores: <ul style="list-style-type: none"> ✓ TG (mg/dL) > 150 ✓ HDL (mg/dL) < 40 P/H e < 50 P/M ✓ PA (mmHg) 130 e/ou 85 ✓ CC¹¹ (cm) > 102 P/H e > 88 P/M ✓ Glicemia de jejum (mg/dL) 110
IDF³ (2005)	CC elevada, de acordo com a etnia, mais 2 fatores: <ul style="list-style-type: none"> ✓ TG (mg/dL) > 150 ✓ HDL (mg/dL) < 40 P/H e < 50 P/M ✓ PA (mmHg) 135 e/ou 85 ✓ Tratamento para dislipidemia e pressão arterial ✓ Glicemia de jejum (mg/dL) 100

¹Organização Mundial de Saúde; ²Adult Treatment Panel III; ³International Diabetes Federation; ⁴triglicerídeos; ⁵high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade); ⁶para homens; ⁷para mulheres; ⁸pressão arterial; ⁹relação cintura quadril; ¹⁰índice de massa corporal; ¹¹circunferência da cintura. **Fonte:** adaptado de OMS, 1998; ATP III, 2001 e IDF, 2005.

A prevalência de SMet é crescente e os valores aumentam de forma progressiva de acordo com o aumento da idade. Em uma população americana a prevalência de SMet, quando ajustada para a idade, foi de 23,7%. Para a faixa etária de 20-29 anos a prevalência é de 6,7%, aumentando de forma brusca na faixa de 60-69 anos para 43,5% (FORD et al., 2002). No Brasil, não foram encontrados registros de estudos que representem toda a população, mas estudos isolados como o de Pelegrini e colaboradores (2010) que mostram uma prevalência de 28% no Distrito Federal, Rocha e colaboradores (2011) que demonstram a prevalência de 65,3% em indígenas do Rio Grande do Sul. Contudo, estudos em diferentes populações como a mexicana, a norte-americana e a asiática revelaram prevalências elevadas da SMet, dependendo do critério utilizado e das características da população estudada, variando as taxas de 12,4% a 28,5% em homens e de 10,7% a 40,5% em mulheres (FORD e GILES, 2003; GANG et al., 2004; AGUILAR-SALINAS et al., 2004; OH et al., 2004).

3.2 Patogenia e o novo componente da SMet: DHGNA

No meio científico, a SMet e os fatores a ela associados encontra-se, atualmente, como uma prioridade de pesquisa, visto seu alto impacto sobre a saúde da população em geral e sua relação com as doenças cardiovasculares. Nesse contexto, as pesquisas, tanto em humanos quanto em animais, têm sido largamente utilizados para melhor entender os mecanismos fisiopatológicos que regem a SMet (GANG et al., 2004; PALETAS et al., 2010; MARQUES et al., 2010).

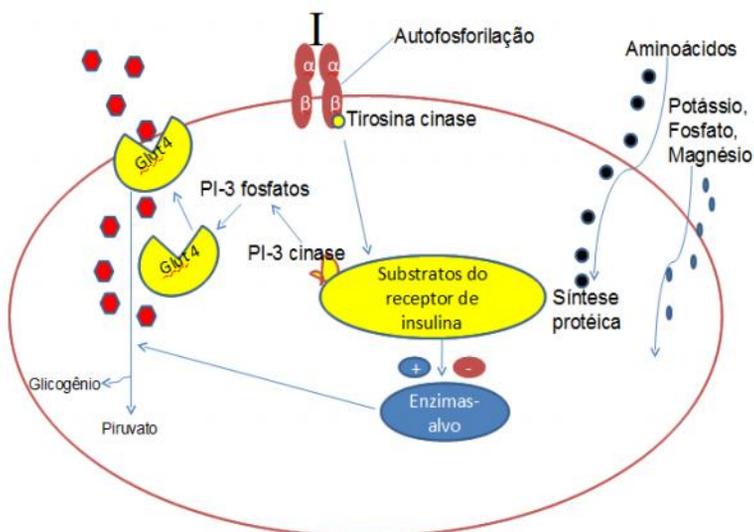
Este agravo metabólico, como descrito anteriormente, tem como característica chave a RI e esta, por sua vez, está diretamente associada aos demais componentes, como o diabetes tipo II, por exemplo, e estes, geralmente, à obesidade (GARCÍA et al., 2008). A insulina é um hormônio secretado pelas células beta () das ilhotas pancreáticas e tem a função principal de manter os níveis de glicose normais, pois promove a captação celular periférica da glicose, principalmente no músculo e no tecido adiposo, e reduz a produção hepática de glicose pela diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, além de regular o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e promover o crescimento e divisão celular. Uma vez que ocorra alteração da sensibilidade à insulina a disponibilidade de glicose, temos o que chamamos de resistência à insulina (WILCOX, 2005; LECLERCQ et al., 2007; MUOIO e NEWGARD, 2008).

Inicialmente, a elevação nos níveis de glicose é compensada pelo aumento da secreção de insulina, porém em um quadro hiperglicêmico prolongado, como o observado no diabetes tipo II, essa secreção aumenta ainda mais, causando a diminuição da resposta, aumento da resistência à ação da insulina e diminuição da função da célula beta (WILCOX, 2005). Além disso, a RI é um fator de risco independente para o desenvolvimento do diabetes tipo II e da aterosclerose (DUNCAN et al., 2007). A **Figura 1** mostra a via de sinalização desencadeada pela insulina após ligação com o receptor na membrana celular.

O diabetes tipo II é caracterizado pela elevada concentração de glicose sanguínea, decorrente, como citado anteriormente, da incapacidade insulínica em exercer seus efeitos nos tecidos alvos. A deficiência insulínica observada no diabetes tipo II produz alterações no metabolismo dos carboidratos e desta forma, associa-se à obesidade, principalmente quando se faz uso de dietas com elevado teor calórico, o que o torna um grande problema mundial,

principalmente em países desenvolvidos, onde os índices de prevalência são crescentes (GASTALDELLI et al., 2002; DEFRONZO, 2004; WINZELL e AHRÉN, 2004).

Figura 1 – Via de sinalização desencadeada pela insulina após ligação com o receptor na membrana celular.



A ligação da insulina na subunidade β do receptor da insulina culmina na ativação da tirosina cinase e esta fosforila os substratos do receptor da insulina. Uma vez fosforilados, os substratos irão desencadear uma série de ações, dentre elas a ativação da PI-3 cinase (fosfoinositol-3-cinase) que, por sua vez, gera PI-3 fosfatos e na sequência a síntese e translocação dos transportadores de glicose (Glut4) para a membrana plasmática, favorecendo a captação de glicose mediada pela insulina **Fonte:** adaptado de Consitt et al., 2009.

Estudo de Gastaldelli e colaboradores (2002) mostra que em pacientes diabéticos o acúmulo de gordura visceral tem um impacto negativo no controle glicêmico, decorrente da diminuição da sensibilidade insulínica periférica e da acentuada gliconeogênese. Além disso, o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares, como a hipertensão arterial, aterosclerose, entre outras, podem ser advindas do diabetes (STEINBERG et al., 1996; MOLNAR et al., 2005).

A hipertensão arterial associada ao diabetes envolve vários fatores, dentre eles, as modificações vasculares, como a diminuição do relaxamento dependente do endotélio decorrente do desbalanço redox e consequente disfunção endotelial vascular (REDON et al., 2009). A hipertensão associada à obesidade é decorrente da elevada secreção de leptina pelos adipócitos, situação diretamente relacionada com um aumento da atividade nervosa simpática (AIZAWA-ABE et al., 2000; ALVAREZ et al., 2002). Além disso, existe uma associação do índice de massa corporal com o aumento da pressão sanguínea, dos níveis de glicose de jejum, colesterol total, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDL (lipoproteína

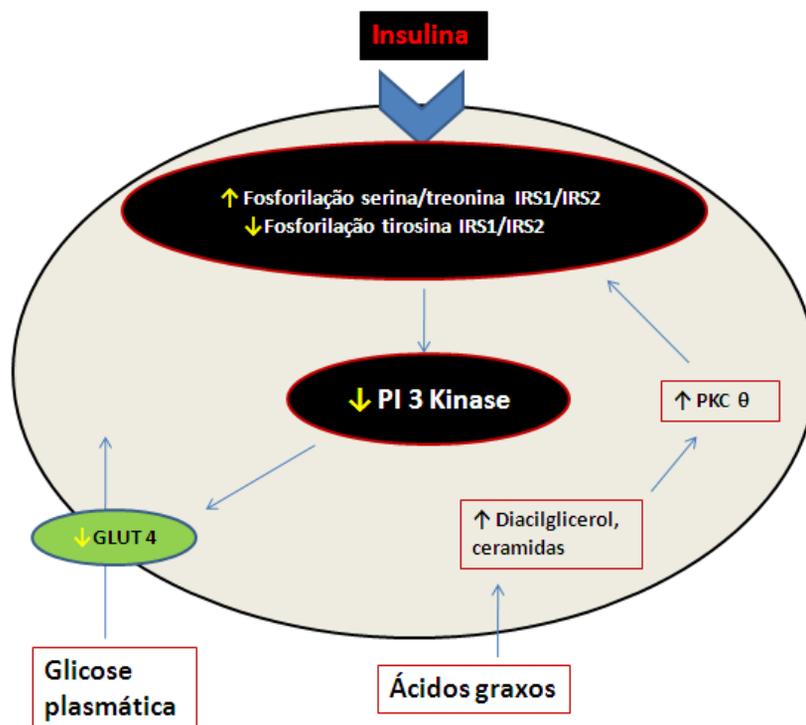
de baixa densidade) e diminuição dos níveis de HDL colesterol (lipoproteína de alta densidade) (LAMON-FAVA et al., 1996).

A elevação dos ácidos graxos livres no plasma, observada em pacientes obesos e com um índice de adiposidade visceral elevado, tem um papel chave na patogênese da RI através de ações específicas que bloqueiam a transdução de sinal insulínico, alterando, desta forma, o transporte de glicose celular (SHULMAN, 2000; GASTALDELLI et al., 2002). Isso acontece devido ao aumento da captação desses ácidos graxos livres e consequentemente, aumento dos seus metabólitos (diacilglicerol, acetil Coenzima A gordurosa e ceramidas) no meio intracelular. Uma cascata de fosforilação é ativada nos aminoácidos serina e treonina dos substratos do receptor da insulina, desencadeada pela proteína cinase *tetha* (PKC), reduzindo a ação de ativação da fosfoinositol-3-cinase (PI3-cinase) e, consequentemente, os efeitos da insulina na síntese e translocação dos transportadores de glicose (GLUT) e o transporte de glicose para o interior celular propriamente dito, são reduzidos (SHULMAN, 2000), sugerindo, desta forma, uma associação direta da obesidade com o aparecimento do diabetes e da RI, podendo ser mais exacerbada quanto maior for a concentração de glicose ingerida na dieta (WILLET et al., 2002). A **Figura 2** mostra o mecanismo de RI proposto por Shulman (2000).

O tecido adiposo produz citocinas pró-inflamatórias que são marcadores de inflamação sistêmica, a exemplo da interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), altamente correlacionados com o grau de obesidade (WISSE, 2004).

A IL-6 é produzida no tecido adiposo por macrófagos e adipócitos, e sua liberação depende da concentração de gordura no corpo (WEISBERG et al., 2003). Esta induz ao aumento da proteína C reativa, um forte marcador de risco metabólico; aumento nos níveis de fibrinogênio e, em células endoteliais e do músculo liso vascular causa o aumento da expressão de moléculas de adesão e ativa sistemas locais de renina-angiotensina, favorecendo o dano e a inflamação da parede vascular, contribuindo desta forma com processos ateroscleróticos (WISSE 2004; WASSMANN et al., 2004).

Figura 2 – Mecanismo de resistência à insulina induzido pela obesidade.



O aumento da disponibilidade de ácidos graxos para a célula leva ao aumento na quantidade intracelular de seus metabólitos. Estes metabólitos, a exemplo do diacilglicerol, ativam uma cascata de fosforilação nos aminoácidos serina e treonina dos substratos do receptor de insulina (IRS1 e IRS2), desencadeada pela PKC, diminuindo a fosforilação do aminoácido tirosina. Ocorre então a diminuição da ativação da PI 3-quinase, reduzindo assim os efeitos da insulina na translocação do transportador de glicose (Glut 4) e, desta forma, diminui o transporte de glicose para o interior celular. **Fonte:** adaptado de Shulman, 2000.

O TNF- α representa um elo entre o desenvolvimento da RI e obesidade. Isso ocorre através da fosforilação em serina do receptor da insulina e do substrato do receptor da insulina, resultando na diminuição da ativação da PI3-quinase, essencial para as ações da insulina, e, conseqüentemente induzindo a diminuição dos transportadores de glicose funcionalmente disponíveis (WISSE, 2004). Fernandes-Real e colaboradores (1998) demonstram que os níveis circulantes do receptor 2 do TNF- α são proporcionais ao índice de massa corpórea, circunferência da cintura, massa de gordura livre, níveis de glicose e RI, mostrando esta citocina como um sistema de regulação da ação da insulina na obesidade. Além disso, o TNF- α contribui com a RI pela elevação nos níveis circulantes de ácidos graxos livres causados pela indução da lipólise e estímulo da lipogênese no fígado e no tecido adiposo, e diminuição da secreção de adiponectina pelos adipócitos (KERN et al., 2003; WISSE, 2004).

Outra citocina liberada pelos adipócitos e crucial para o controle energético, saciedade e ingestão de alimentos é a leptina. Esta transmite informações sobre o esgotamento ou acúmulo dos estoques de gordura para o cérebro. Indivíduos obesos com SMet geralmente têm uma alta concentração de leptina circulante, porém mostram-se resistentes ao efeito da leptina no hipotálamo e, desta forma, a redução do apetite e o aumento do gasto energético não são ativados, e o peso corporal em excesso é mantido. Além disso, outro efeito da leptina no organismo humano é o aumento da atividade simpática, representando assim, um elo fisiopatológico entre a obesidade e a hipertensão arterial no homem (AIZAWA-ABE et al., 2000; WISSE, 2004).

Uma vez presente o quadro de RI, a supressão da lipólise mediada por este hormônio estará prejudicada, ou seja, a degradação de lipídios será favorecida, bem como a contínua migração de ácidos graxos ao fígado, acarretando no aparecimento de RI hepática e consequente hiperinsulinemia. Esta, por sua vez, estimula a lipogênese de novo hepática, elevando, desta forma, o acúmulo de triglicerídeos no fígado e a lipase hormônio sensível no tecido adiposo. Este estímulo eleva ainda mais a liberação de ácidos graxos para a circulação mantendo, desta forma, um círculo vicioso de liberação e captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e pelo fígado, respectivamente, caracterizando assim um mecanismo envolvido na patogenia das DHGNA pela diminuída ação da insulina (PAGANO et al., 2002; BERTOLAMI, 2004; FONSECA, 2008). Além disso, o depósito de gordura visceral favorece a captação hepática de ácidos graxos, via circulação portal, pela sua favorável localização e esse acúmulo hepático de gordura é também acentuado pela captura dos lipídios que chegam ao tecido a partir da alimentação, através dos quilomicrons (MATHIEU et al., 2009). Dessa forma, os ácidos graxos, principal reserva de caloria no organismo, são considerados importantes mediadores dos efeitos do tecido adiposo como tecido endócrino complexo na SMet.

O quadro de RI também leva ao aumento da atividade da lipase hepática e da produção de apolipoproteína B, eventos associados com aumento das partículas de LDLs pequenas e densas e diminuição da HDL; e com o aumento da síntese e secreção de triglicerídeos e VLDL pelo fígado, respectivamente, contribuindo, desta forma, para o aparecimento do quadro dislipidêmico característico da SMet (BERTOLAMI, 2004; FONSECA, 2008). Desta forma, as alterações no metabolismo das lipoproteínas representam a maior manifestação hepática de RI (WILCOX, 2005).

A dislipidemia é caracterizada por altos níveis de triglicerídeos (TG), baixos níveis de HDL e/ou pelo aparecimento de LDLs pequenas e densas (BERTOLAMI, 2004; ADIELS et al., 2008). A mudança no metabolismo de lipoproteínas é iniciada pela produção hepática excessiva de TG e VLDL pelo aumento da produção de apolipoproteína B100. A VLDL é liberada do fígado, podendo ser convertida em IDL (lipoproteína de densidade intermediária) pela lipase lipoproteica presente no endotélio capilar dos vasos sanguíneos (LPL; “lipoprotein lipase”) e esta em LDL ainda nos vasos sanguíneos. Esta, por sua vez, é rica em colesterol e catabolizada, principalmente, através do reconhecimento hepático pelos seus receptores LDL específico. O aumento da lipase hepática está associado com a hidrólise dos triglicerídeos e fosfolípides nas partículas de LDLs pequenas e densas e HDL, causando aumento e diminuição destas, respectivamente (BERTOLAMI, 2004 ; ADIELS et al., 2006; ADIELS et al., 2008).

Outros fatores podem estar envolvidos na relação da obesidade visceral com o metabolismo lipídico do fígado alterado. Nesse sentido, a diminuição da secreção da adiponectina, uma importante citocina liberada pelo tecido adiposo, acarretada pelo aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias como o TNF- α , poderia contribuir para diminuir o metabolismo das lipoproteínas hepáticas, uma vez que esta participa de processos metabólicos em vários órgãos, incluindo o fígado (KERN et al., 2003; ZECCHIN et al., 2004). Assim, esta desregulação no metabolismo lipídico do fígado e consequente desenvolvimento de esteatose hepática, dislipidemia e RI, explicadas anteriormente, pode representar papel chave na patogênese da SMet.

Todos os componentes da SMet correlacionam-se com a concentração de gordura no fígado e a progressão desta aumenta com o grau de obesidade, fato que classifica as DHGNA como mais uma manifestação da SMet (PAGANO et al., 2002; KELLEY et al., 2003; QURESHI e ABRAMS, 2007). Marchesini e colaboradores (2003) avaliaram a prevalência de SMet em portadores de DHGNA e observaram que esta aumenta com o aumento do índice de massa corporal, de 18% em indivíduos com o peso normal para 67% em indivíduos obesos.

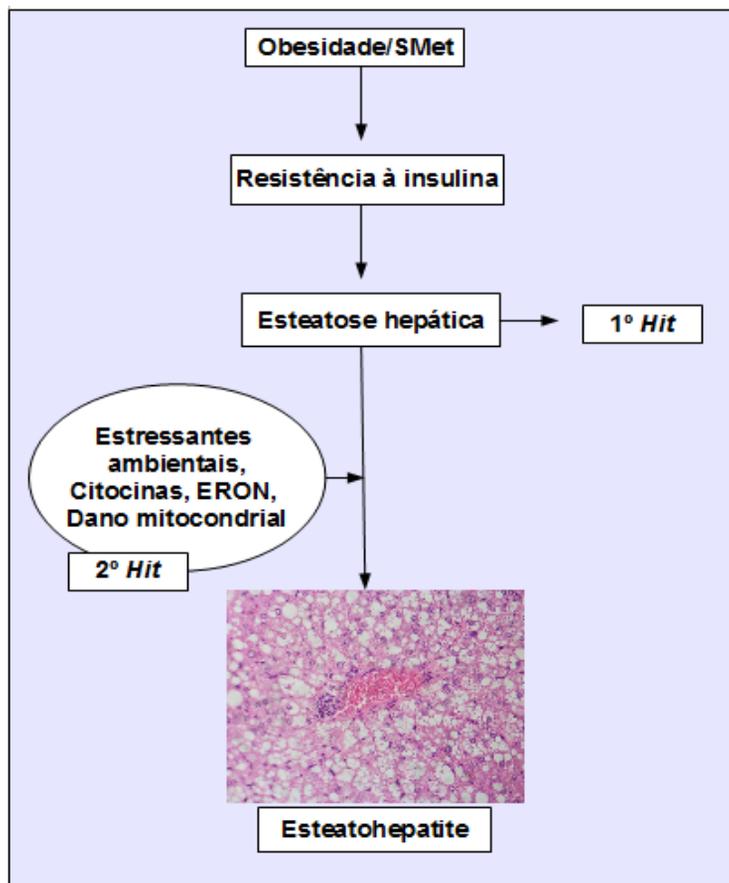
A DHGNA é uma doença crônica caracterizada pela infiltração de gordura no fígado na ausência de consumo crônico de álcool ou outras causas conhecidas de doença hepática, podendo progredir para esteatohepatite não alcoólica, a qual é caracterizada por esteatose,

inflamação e fibrose, e em último estágio levando a cirrose e hepatocarcinoma (QURESHI e ABRAMS, 2007; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008).

Estima-se que a DHGNA, uma doença do fígado comum nos Estados Unidos, mas com prevalência aumentada em todo mundo, afeta em torno de 25-30% da população geral, 10% de crianças e até 80% de indivíduos obesos e diabéticos (WIECKOWSKA et al., 2007; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008). No Brasil, Cotrim e colaboradores (2011) observaram que a DHGNA é mais frequente em homens assintomáticos e o frequente diagnóstico histológico encontrado foi de esteatohepatite com fibrose, somando-se a um número significativo de casos com cirrose.

A progressão das DHGNA é explicada pela hipótese dos dois *hits*, proposta primeiramente por Day e James em 1998. Nesta, o primeiro *hit* corresponde à esteatose simples e envolve o acúmulo de TG no fígado, condição que sozinha desencadeia RI e cria um círculo vicioso de disfunções metabólicas, como explicado anteriormente, propiciando assim condições para o desenvolvimento ou aparecimento do segundo *hit*, que envolve inflamação, fibrose e morte celular, características de esteatohepatite. Vários fatores estão envolvidos na progressão deste segundo *hit*, e devido ao fígado gorduroso ser mais susceptível ao estresse oxidativo, este constitui um dos principais fatores (VIDELA et al., 2004). Nesta condição, a produção elevada de espécies reativas de oxigênio pela disfunção mitocondrial ocorre no fígado, resultante da sobrecarga do sistema de oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa, e em sequência, a peroxidação lipídica e a indução de citocinas pró-inflamatórias promovem a progressão da esteatohepatite para fibrose e finalmente cirrose (WIECKOWSKA et al., 2007; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008). Nesse contexto, condições propícias para gerar o segundo *hit*, como por exemplo, aquelas relacionadas com a SMet (obesidade, diabetes), contribuem para causar lesão hepática, culminando com esteatohepatite e, ao longo do tempo, a doença hepática em estágio final. A **Figura 3** mostra um esquema simplificado da hipótese dos dois *hits*.

Figura 3 – Esquema simplificado da hipótese dos dois *hits*.



O primeiro *hit* corresponde a esteatose simples e envolve o acúmulo de triglicerídeos no fígado, desencadeado na presença de obesidade e SMet. Vários fatores estão envolvidos no aparecimento e progressão do segundo *hit*: estressantes ambientais (como o consumo de dietas “high fat”), a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e o dano mitocondrial. O segundo *hit* envolve inflamação, fibrose e morte celular característico de esteatohepatite **Fonte:** adaptado de Mantena et al., 2008.

A insulina promove a formação de matriz extracelular e pode determinar a progressão da fibrose pela ação desta no estímulo de fatores de crescimento (PARADIS et al., 2001). Além disso, o estresse oxidativo exacerbado poderia modular as funções das células de Kupffer através da ativação de fatores de transcrição que aumentam a expressão de genes relacionados com mediadores pró-inflamatórios e fibrogênicos (VIDELA et al., 2004; ARAYA et al., 2006). Somando-se, estudos mostram que a apoptose pode ser consequência da ação tóxica dos ácidos graxos livres de cadeia longa sobre os hepatócitos pela desregulação do metabolismo lisossomal e por induzirem estresse no retículo endoplasmático (FELDSTEIN et al., 2004; WEI et al., 2006). O TNF- de origem hepática e tecido adiposo também está envolvido no processo da apoptose pela indução da liberação de espécies

reativas de oxigênio e caspases da mitocôndria (GUICCIARDI et al., 2000; QURESHI e ABRAMS, 2007; MARIAPPAN et al., 2009).

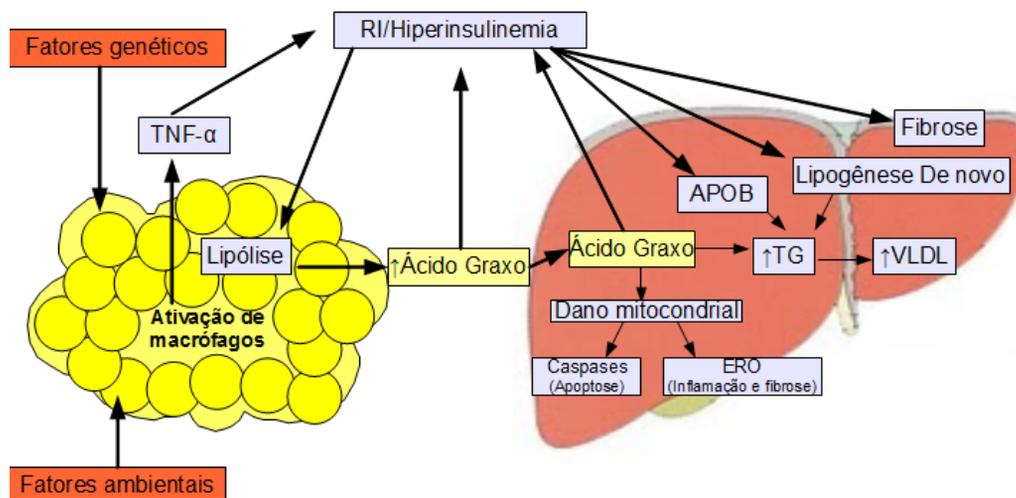
Ainda não existe um marcador específico para diagnosticar as DHGNA. Contudo, métodos comuns de imagem, como a tomografia computadorizada e ultrassonografia, são utilizados. Entretanto, existe uma limitação na utilização destas pela limitada sensibilidade e especificidade. Informações como a presença de inflamação, fibrose e se a esteatose é micro ou macrovesicular só são obtidas por biópsia hepática, que é considerada o “padrão ouro” para quantificação de gordura no fígado e diagnóstico da esteatohepatite (KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2007; WIECKOWSKA et al., 2007).

No geral, os testes laboratoriais que são rotineiramente incluídos na avaliação de pacientes com suspeita de DHGNA incluem a análise sérica de enzimas como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamil transferase (-GT), uma vez que atividade elevada é indicativa de lesão hepática, porém esta elevação não é observada em todos os indivíduos com diagnóstico de DHGNA, o que limita a investigação, instigando, desta forma, a busca por novos biomarcadores ideais, isto é, que sejam reprodutíveis, de baixo custo, facilmente disponíveis e que estejam envolvidos no mecanismo patofisiológico deste agravo (MOFRAD et al., 2003; KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2007; WIECKOWSKA et al., 2007).

Nesse contexto, biomarcadores séricos não invasivos que reflitam a patofisiologia da doença, como os de estresse oxidativo, inflamação, apoptose e fibrose, têm sido avaliados, porém estudos prospectivos e de validação ainda são necessários, visto que encontram-se em fase inicial de investigação (FELDSTEIN et al., 2004; HOROZ et al., 2005; RATZIU et al., 2006; WIECKOWSKA et al., 2007).

Diversos estudos com ratos e camundongos demonstram a presença de DHGNA pelo uso de dietas “high-fat” (MURAYAMA et al., 2009; WADA et al., 2010; FRAULOB et al., 2010; MEIJER et al., 2010). Nesse contexto, é importante salientar a importância dos ácidos graxos dietéticos para o aparecimento de DHGNA, bem como da necessidade de medidas de intervenção dietética, além das farmacológicas, no tratamento e/ou controle deste agravo, salientando também a importância da abordagem multidisciplinar na gestão das desordens que abordam a SMet, como as DHGNA. A **Figura 4** mostra os caminhos chaves na patogênese da DHGNA.

Figura 4 – Caminhos chave na patogênese da DHGNA.



A obesidade, induzida tanto por fatores genéticos quanto ambientais, causa a maior liberação de ácidos graxos do tecido adiposo para a corrente sistêmica. Estes, por sua vez, podem levar ao aparecimento de RI e hiperinsulinemia. Esta condição favorece a maior liberação de ácidos graxos pela supressão da lipólise diminuída no tecido adiposo. A liberação de TNF- α pelos adipócitos também contribui, por mecanismo semelhante ao dos ácidos graxos, para o aparecimento da RI e hiperinsulinemia. Na sequência, ocorre a maior captação de ácidos graxos pelo fígado e aparecimento de RI e hiperinsulinemia hepática. O aumento, induzido por esta condição, de apolipoproteína B e da lipogênese de novo hepática causam, juntamente com a concentração de ácidos graxos elevado, o acúmulo de TG, caracterizando assim a esteatose hepática e a maior liberação para a corrente sistêmica da lipoproteína VLDL. O acúmulo de gordura hepática causa dano mitocondrial, culminando na liberação de caspases (que participam do processo de apoptose celular) e maior produção e liberação de espécies reativas (envolvidas no processo inflamatório e fibrótico). A RI/Hiperinsulinemia também contribuem diretamente com o processo fibrótico. O quadro inflamatório e fibrótico, juntamente com o acúmulo de gordura, constituem a esteatohepatite. **Fonte:** Adams et al., 2005; Cobbold et al., 2010.

3.3 Papel do balanço redox na SMet e DHGNA

O estado redox normal é caracterizado pelo equilíbrio orgânico entre a produção de substâncias oxidantes e a remoção destas por aquelas ditas antioxidantes. Uma vez alterado esse equilíbrio (desbalanço redox), seja pela elevada produção e concentração das oxidantes e/ou pela diminuição das antioxidantes, o efeito biológico benéfico de participação na regulação em vários mecanismos fisiológicos chaves passa a ser citotóxico, podendo reagir diretamente com vários alvos intracelulares como lipídios, proteínas e DNA, e desta forma, possuindo um papel chave na gênese e desenvolvimento de doenças como aquelas observadas na SMet (ZALBA et al., 2001; WEYDERT e CULLEN, 2009; WIRTZ et al., 2009).

As principais fontes de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) nos sistemas fisiológicos são a mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons

(MANTENA et al., 2008), a NADPH oxidase, que catalisa a redução de um elétron do oxigênio molecular para gerar ânion radical superóxido (O_2^-) usando NADPH como doador de elétron (SONTA et al., 2004), a mieloperoxidase (VAZ e AUGUSTO, 2008), a enzima sintase do óxido nítrico (NOS) desacoplada (SHINOZAKI et al., 2000).

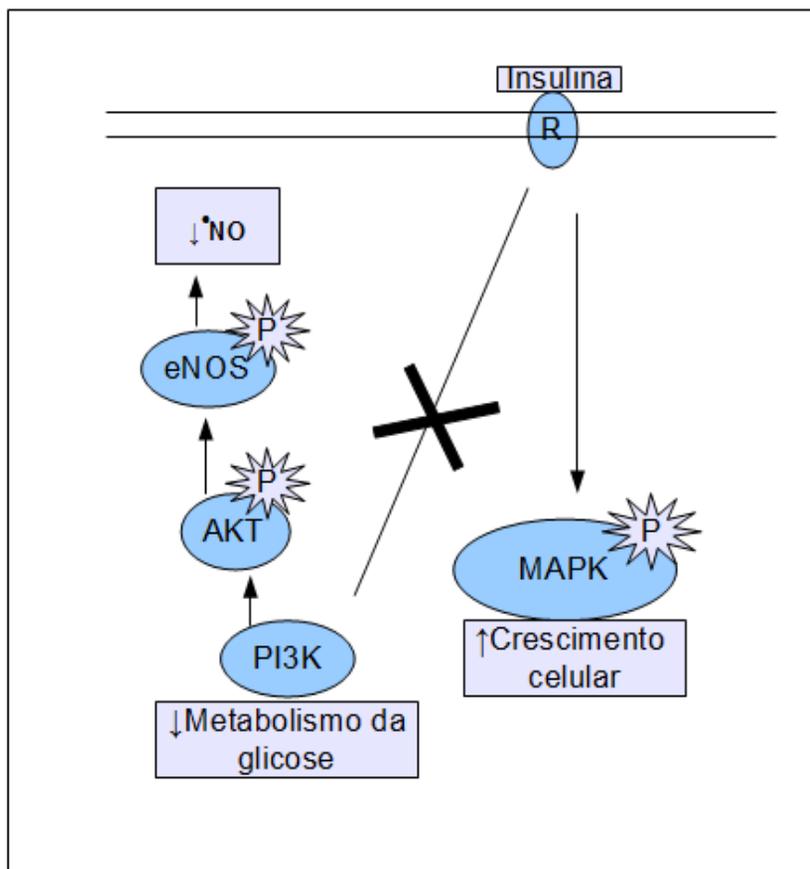
A produção crônica de EROs, pelo aumento da atividade da NADPH oxidase, excede a capacidade dos antioxidantes celulares enzimáticos, como a GPx e as formas de SOD. Além disso, a NADPH oxidase pode ser ativada e regulada por diversos fatores, como forças mecânicas, hormônios e citocinas, dentre eles a trombina, TNF- α , interleucina-1, LDL oxidada (GRIENGLING et al., 2000; CAI et al., 2003; DUSTING et al., 2005; FURUKAWA et al., 2004; ROBERTS et al., 2006). Estudo de Furukawa e colaboradores (2004) demonstra que o aumento de ERO na obesidade está associado com o aumento da expressão da NADPH oxidase e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD no tecido adiposo, mostrando que a obesidade pode induzir ERO sistêmica. A atividade da NADPH oxidase elevada também contribui com outras alterações clínicas como o diabetes e a hipertensão, pelo aumento da produção de O_2^- , situação observada na patogênese da SMet (SONTA et al., 2004; XU et al., 2008). Somando-se, estudo de Roberts e colaboradores (2006) mostra que o estresse oxidativo na SMet induzida por dieta “high-fat” é acompanhado de uma regulação elevada da NADPH oxidase e uma baixa regulação de enzimas chave no sistema de defesa antioxidante (a SOD e a glutatona peroxidase) nos rins e na aorta de ratos, e isto foi associado com um aumento da peroxidação lipídica plasmática.

Grandes quantidades de O_2^- formados captam o óxido nítrico (NO) biodisponível, promovendo, desta forma, a formação de outro tipo de espécie reativa com elevada citotoxicidade, o peroxinitrito (ONOO^-) (DIEDERICH et al., 1994; VANHOUTTE, 2001). O NO é um radical livre com ação antioxidante e vasodilatadora, sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é transformado em óxido nítrico e L-citrulina sob a ação catalizadora da enzima NOS (PALMER e MONCADA, 1989), existente no organismo sob três isoformas: a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), a sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) e a sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) (FORSTERMANN et al., 1993).

Redução nos níveis de tetrahydrobiopterina (BH4) em animais com RI leva a produção aumentada de O_2^- na vasculatura. A BH4 é um cofator essencial para a atividade da NOS e uma vez reduzidos os níveis deste cofator, a NOS fica desacoplada, catalizando a

formação de $\cdot\text{O}_2^-$ ao invés de $\cdot\text{NO}$ (SHINOZAKI et al., 2000). Além disso, a RI diminui a produção de $\cdot\text{NO}$ via sinalização insulínica, uma vez que a ativação da PI3-quinase é necessária para a ativação da AKT e na sequência, da NOS endotelial (**Figura 5**) (NADRUZ JR e FRANCHINI, 2004).

Figura 5 – Diminuição da produção de $\cdot\text{NO}$ via sinalização insulínica.



A ativação prejudicada da PI3K via sinalização insulínica diminui a ativação da eNOS e, consequentemente, a produção de $\cdot\text{NO}$ catalizada por esta. **Fonte:** adaptado de Nadruz Jr e Franchini, 2004.

A hiperglicemia também é uma fonte geradora de espécies reativas, como o $\cdot\text{O}_2^-$, através da auto-oxidação da glicose, da ativação da via polioliol para degradação da glicose em excesso e da glicosilação de proteínas (WOLFF e DEAN, 1987; WAJCHENBERG, 2002; YAN et al, 2003; CERIELLO, 2005).

As defesas antioxidantes mais relevantes no citoplasma incluem a SOD (enzima envolvida na dismutação de $\cdot\text{O}_2^-$ com produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)), a CAT (enzima que decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio) e a GPx (principal enzima antioxidante no citoplasma e mitocôndria que metaboliza H_2O_2 em água), enquanto que no plasma, moléculas como o ácido ascórbico, vitamina E e flavonóides, provenientes da dieta,

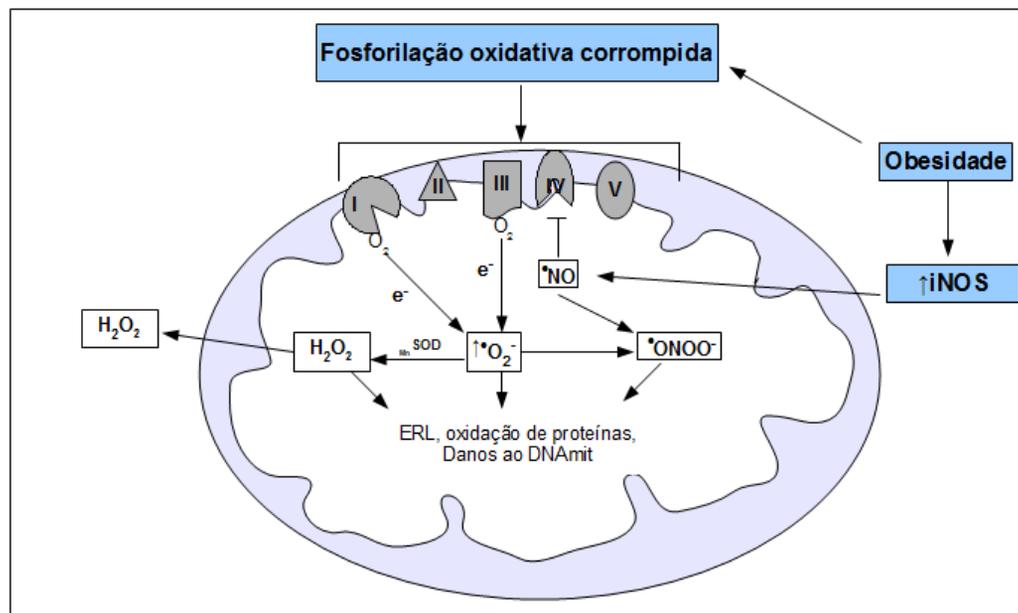
respondem pela maior atividade antioxidante (WOLIN, 2000; DRÖGE, 2002; MARITIM et al., 2003). Animais com perfil para SMet possuem uma diminuição de antioxidantes endógenos, a exemplo dos estudos de Beltowski e colaboradores (2000), que demonstraram diminuição da atividade da SOD em ratos obesos, diabéticos e com níveis de triglicerídeos elevados.

Como explicado anteriormente, o estresse oxidativo participa da progressão das DHGNA (QURESHI e ABRAMS, 2007). Vários caminhos oxidativos podem exercer um papel principal no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na esteatohepatite, incluindo a mitocondrial, citocromo P-450, mieloperoxidases, óxido nítrico sintase (VIDELA et al., 2004; UCHIYAMA et al., 2006; WIECKOWSKA et al., 2007; MANTENA et al., 2008).

Mantena e colaboradores (2008) apontam um mecanismo de indução de estresse oxidativo, ruptura da sinalização do NO e disfunção mitocondrial pela obesidade, como os principais eventos moleculares que aceleram a progressão da esteatose para esteatohepatite e fibrose. A **Figura 6** mostra esse mecanismo detalhadamente.

Muitas enzimas chaves dos sistemas de oxidação dos ácidos graxos são reguladas pelo receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR α). Deficiência na oxidação induzida por este receptor ou a sobrecarga da oxidação por via peroxissomal (ao invés da mitocondrial, por disfunção desta), causa defeitos no metabolismo energético e favorece o desenvolvimento de esteatohepatite, pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (REDDY, 2001). Somando-se, a RI pode predispor o estresse oxidativo pela diminuição da oxidação de ácidos graxos mitocondriais (QURESHI e ABRAMS, 2007).

Figura 6 – A obesidade corrompe o funcionamento do sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria.



A obesidade corrompe o funcionamento do sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria, resultando na geração de $O_2^{\bullet-}$ dentro dos complexos I e III. O $O_2^{\bullet-}$ é então dismutado para H_2O_2 pela $MnSOD$ e pode difundir da mitocôndria para o citoplasma e afetar outras vias de sinalização celular. A obesidade também causa aumento na expressão da iNOS, devido a infiltração de células inflamatórias e via indução em células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais biliares, que leva a difusão do $^{\bullet}NO$ para dentro da mitocôndria, onde inibe o citocromo c oxidase e altera o controle da respiração mitocondrial dependente de $^{\bullet}NO$, reage com $O_2^{\bullet-}$ para formar $^{\bullet}ONOO$. O H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}ONOO$ podem iniciar reações que levam ao aumento da geração de espécies reativas de lipídios, induzir modificações de proteínas e danos ao DNA mitocondrial. O H_2O_2 em excesso pode também alterar a capacidade antioxidante das enzimas catalase e glutatona peroxidase, responsáveis pela detoxificação deste radical livre. **Fonte:** adaptada de Mantena et al., 2008.

Várias condições são favoráveis ao aparecimento do desbalanço redox, incluindo condições dietéticas pelo uso de dietas ricas em gordura e açúcar (MOLNAR et al., 2005; ROBERTS et al., 2006; GUEDES, 2009; MARTINS et al., 2010). Este comportamento dietético é relacionado com o aparecimento das complicações que compõem a SMet. Desta forma, torna-se interessante a utilização de modelos animais para este agravo com base na dieta praticada pelas populações, principalmente aquelas ocidentalizadas, e a avaliação de suas repercussões metabólicas pode fisiopatologicamente ser realizada, incluindo as DHGNA (GADJA et al., 2007). Nesse contexto, Uchiyama e colaboradores (2006) mostraram que a dieta “high-fat” causou um acúmulo de lipídios no fígado em camundongos deficientes de $CuZnSOD$, pela diminuição da secreção de TG hepático devido à degradação de apolipoproteína B no fígado e no plasma, sugerindo que o estresse oxidativo acentua o acúmulo de lipídeo hepático e assim, participa da progressão das DHGNA em modelos animais.

3.4 SMet e seus agravos no processo de envelhecimento

O processo de envelhecimento precoce, observado na população atualmente, pode ser consequência direta das mudanças no estilo de vida, em especial ao ritmo acelerado dos grandes centros urbanos associado, muitas vezes, à falta de tempo para a prática de exercícios físicos e ao comportamento alimentar desregulado.

Como já explanado anteriormente, a prevalência da SMet aumenta proporcionalmente ao avanço da idade e também em pacientes com DHGNA, indicando a idade avançada como um fator crítico para o aparecimento de agravos metabólicos (FORD et al., 2002; MARCHESINI et al., 2003; GRUNDY et al., 2004). Além disso, situações de estresse crônico, como a ingestão constante de dietas com alto teor calórico, por exemplo, na idade avançada, também contribui para o aparecimento mais precoce de doenças metabólicas (SINCLAIR, 2005; BAUR et al., 2006; GUPTE et al., 2010).

O principal fator que contribui para o processo do envelhecimento e o aparecimento mais precoce de doenças metabólicas é o estresse oxidativo, e durante este processo de envelhecimento, a NADPH oxidase é uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (HAMILTON et al., 2001; PARK et al., 2007; SALMON et al., 2010).

A diminuição da biodisponibilidade de NO pode também acontecer com o avanço da idade e não apenas pela presença de patógenias que envolvam esta diminuição. Sendo assim, a idade avançada constitui um fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares, e a elevação de espécies reativas de oxigênio associada a este avanço é o fator que contribui para o prejuízo da função endotelial e vasodilatação dependente desta, contribuindo com o aparecimento de doenças como a hipertensão arterial (HAMILTON et al., 2001; DAI e RABINOVITCH, 2009).

A idade é um fator de risco para aterosclerose e na condição de exposição à dieta “high-fat”, animais idosos desenvolvem mais intensamente a aterosclerose e outros fatores relacionados à SMet que animais jovens, sugerindo que o envelhecimento acentua os efeitos metabólicos e vasculares da dieta “high-fat” pelo aumento do estresse oxidativo associado a esta condição (COLLINS et al., 2009).

A idade avançada acentuou a esteatohepatite induzida por dieta “high-fat” em camundongos “knockout” para o receptor de LDL em estudo de Gupta e colaboradores

(2010) de tal forma que a esteatose hepática, inflamação, fibrose, estresse oxidativo e marcadores de lesão hepática estavam muito mais acentuados em camundongos idosos *versus* jovens. Esses dados demonstram a contribuição do processo de envelhecimento no agravamento e progressão das DHGNA associada à dieta “high-fat”. Além disso, essa contribui para o processo de senescência celular, contribuindo para a patogênese de doenças associadas ao consumo desta (SONE e KAGAWA, 2005).

Sendo assim, na relação existente entre envelhecimento e estresse oxidativo e destes com os agravos relacionados à SMet e a progressão de DHGNA, faz-se necessário a investigação mais aprofundada das possíveis vias metabólicas envolvidas nestes processos, associadas ao fator que predispõe: o consumo de dieta “high-fat”, mimetizando, desta forma, a inadequada prática alimentar observada atualmente pelo consumo de dietas com elevado teor calórico e o aparecimento da SMet.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos machos isogênicos, da raça C57Bl/6J (**Figura 7A**), jovens [com idade variando entre 6 a 8 semanas (21.5 ± 0.46 g)] e idosos [com idade variando entre 53 a 57 semanas (30.9 ± 0.59 g)] provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Os animais foram mantidos em condições padrão de experimentação animal, em um espaço específico, Laboratório Experimental para Camundongos do Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), localizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), onde tiveram livre acesso à água e alimentação *ad libitum*, ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h), temperatura variando entre $21 \pm 2,0$ °C e condições adequadas de higienização. A ética durante todo o tratamento e sacrifício destes animais foi obedecida, evitando-se ao máximo o sofrimento dos mesmos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (Protocolo 005208/2010-46).

Os animais jovens (n total = 25) e os animais idosos (n total = 28) foram divididos em quatro subgrupos: grupo controle (“n” jovem = 8 e “n” idoso = 5), que recebeu dieta *chow* (CT); grupo dieta hipercalórica (“n” jovem = 9 e “n” idoso = 5), que recebeu dieta hipercalórica (DHC); grupo dieta hipercalórica + tempol (“n” jovem = 4 e “n” idoso = 9), que recebeu dieta hipercalórica e tratamento com o tempol na água de beber (DHC + Tempol); grupo dieta hipercalórica + apocinina (“n” jovem = 4 e “n” idoso = 9), que recebeu dieta hipercalórica e tratamento com a apocinina na água de beber (DHC + Apocinina). A **Figura 7 B e C** ilustra as dietas utilizadas no estudo, “chow e hipercalórica, respectivamente.

O tratamento dietético experimental aconteceu em um intervalo de 14 semanas, sendo o tratamento farmacológico iniciado na 4ª semana (± 3 dias) de intervenção dietética (período onde começa a ocorrer aumento da glicose) até o final desta, ou seja, com duração total de 10 semanas.

Figura 7 – Camundongos C57BL/6 (A) e dietas utilizadas no estudo, “chow”(B) e hipercalórica (C).



4.2 Dieta hipercalórica

A dieta hipercalórica utilizada continha 58,4% (GUEDES, 2009) das calorias provenientes dos lipídios, foi manipulada no LRC de forma asséptica e oferecida aos animais sob a forma de *pellet*. A dieta *chow* (Nuvilab®) continha 14% calorias provenientes dos lipídios. A **Tabela 2** mostra a composição dos macronutrientes das dietas utilizadas.

Tabela 2. Distribuição calórica percentual dos macronutrientes das dietas *chow* e hipercalórica.

Macronutriente	Dieta <i>chow</i>	Dieta hipercalórica
Carboidratos (% calórica)	63,0	26,6
Proteínas (% calórica)	23,0	15,0
Lipídios (% calórica)	14,0	58,4

Fonte: Guedes, 2009.

4.3 Tratamento farmacológico

No tratamento farmacológico foram utilizados o tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), um mimético da superóxido dismutase (WILCOX, 2010), na dose de 50 mg/kg de peso corporal e diluído na água de beber, e a apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), um inibidor seletivo da NADPHox (STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008), também na dose de 50 mg/kg de peso corporal e diluído na água de beber. Antes de iniciar o tratamento farmacológico foi mensurado, diariamente, a ingestão líquida para saber, em média, a quantidade de água ingerida pelo grupo a fim de utilizar este dado para ajustar a dose dos fármacos utilizados no estudo. Sendo assim, a dose foi ajustada baseada na média de peso corporal semanal e na média de água ingerida semanal por cada grupo tratado farmacologicamente. O tratamento prosseguiu até o dia do sacrifício.

4.4 Avaliações *in vivo*

4.4.1 Ingesta alimentar

A ingestão alimentar dos animais foi avaliada três vezes por semana em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu[®]) durante todo o tratamento dietético experimental.

4.4.2 Peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu[®]), antes, durante (semanalmente, respeitando os mesmos dias e horários da semana) e ao final do tratamento dietético experimental.

4.4.3 Glicose de jejum

Os níveis de glicose foram determinados semanalmente pela leitura no aparelho “Optium Xceed” (Abbott[®]). Para tanto, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e em seguida submetidos à coleta de sangue a partir da veia caudal, após um pequeno corte na ponta da cauda do animal.

4.4.4 Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Após restrição alimentar noturna de 12 horas, o teste de tolerância à glicose foi realizado através da aplicação intraperitoneal de 2 g de glicose/kg de peso corporal. Foi coletada uma gota de sangue (veia caudal) para verificação da glicemia no momento anterior à aplicação (glicemia de jejum) e após a aplicação, de forma temporal, nos intervalos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (MOLNAR et al., 2005). O aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o “Optium Xceed” (Abbott[®]).

Para a realização do teste de sensibilidade à insulina, os animais foram mantidos no estado alimentado e seguiu-se com a aplicação intraperitoneal de 0,75 U de insulina/kg de peso corpóreo. A insulina utilizada foi de ação rápida (Humulin[®]). Os níveis de glicose foram avaliados, assim como no teste supracitado, no momento anterior à aplicação e de forma temporal nos intervalos de 15, 30 e 60 minutos (MOLNAR et al., 2005).

4.5 Sacrifício dos animais

Após jejum noturno de 12 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina (110/10 mg/kg; i.p.) e em seguida, sacrificados por punção cardíaca. O fluido sanguíneo coletado durante a punção foi transferido para tubos tipo “eppendorf” de 1,5 mL heparinizados (25 UI/mL). Em seguida, centrifugou-se o material biológico a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C, objetivando-se a separação do plasma e do componente eritrocitário. As gorduras viscerais epididimal, perirenal e mesentérica foram retiradas dos animais, assim como o fígado, coração, pulmão, rim, intestino e músculo, em seguida pesados em balança semi-analítica e estocados, juntamente com o plasma e o componente eritrocitário, em freezer -86 °C para análises posteriores. O osso tibial direito foi removido para avaliação do crescimento animal, e para a medida do comprimento do mesmo foi utilizado um paquímetro (Tramontina®).

Após a pesagem do fígado total, antes do procedimento para armazenamento em -86 °C, foram realizados dois cortes longitudinais de aproximadamente 5 mm de espessura no lóbulo direito destinado à análise histológica. Outros fragmentos de pesos conhecidos foram realizados para as demais análises (perfil lipídico total e balanço redox, descritos mais adiante) e o tecido remanescente foi estocado separadamente em outro tubo. Para minimizar variações provindas de diferentes localizações do órgão, os fragmentos foram obtidos através do mesmo tipo de corte nos diferentes animais.

4.6 Peso relativo tecidual

Os tecidos retirados para avaliação de peso tecidual foram: gorduras visceral epididimal, perirenal e mesentérica, fígado, coração, pulmão, rim, intestino e músculo. Foram pesados em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®) e todos os valores foram normalizados pelo peso corporal de cada animal e os resultados demonstrados em percentual.

4.7. Avaliações sistêmicas

4.7.1 Avaliação do perfil lipídico plasmático

Os níveis de colesterol e triglicerídeos foram mensurados através de *Kit* comercial (Labtest®) adaptado para microplaca, observando-se as recomendações do fabricante (**Figura**

8) (FAZIO, 1997). Sucintamente, as amostras de plasma foram diluídas em tampão PBS 0,01 M na proporção de 1:100 para colesterol, e 1:50 para triglicerídeos. Em seguida, 100 µL do reagente para cada teste (colesterol e triglicerídeos) foi adicionado a uma alíquota de 100 µL da amostra diluída. Em seguida, adicionou-se 100 µL dos padrões e a mesma quantidade de reagente para cada teste à placa. Após homogeneização e incubação a 37 °C durante 10 minutos em banho-maria, a absorbância foi determinada em leitor para microplaca (Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 492 nm. Utilizando as equações de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972), estimou-se as concentrações de VLDL ($VLDL = TG/5$).

Figura 8 – Esquema para dosagem em microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	B1	A1	A1	A9	A9	A17	A17	A25	A25	A33	A33
B	B2	B2	A2	A2	A10	A10	A18	A18	A26	A26	A34	A34
C	P1	P1	A3	A3	A11	A11	A19	A19	A27	A27	A35	A35
D	P2	P2	A4	A4	A12	A12	A20	A20	A28	A28	A36	A36
E	P3	P3	A5	A5	A13	A13	A21	A21	A29	A29	A37	A37
F	P4	P4	A6	A6	A14	A14	A22	A22	A30	A30	A38	A38
G	P5	P5	A7	A7	A15	A15	A23	A23	A31	A31	A39	A39
H	P6	P6	A8	A8	A16	A16	A24	A24	A32	A32	A40	A40

Os poços são representados verticalmente por letras (A-H) e horizontalmente por números (1-12). Nos poços, a letra **B** representa o branco (1 e 2), **P**, os pontos da curva (1-6) e **A**, as amostras biológicas (1-40). Todos os pontos foram realizados em duplicata. **Fonte:** Souza, 2009.

4.7.2 Mensuração dos marcadores de função e lesão hepática

A análise da função e da lesão hepática foi realizada através da mensuração das concentrações plasmáticas de albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (-GT) e desidrogenase láctica (LDH). Para análise destes marcadores, o plasma obtido a partir do sangue coletado por punção cardíaca no momento do sacrifício dos animais, conforme descrito no item 4.5, foi utilizado. Após esse procedimento, diluiu-se o material biológico em PBS 0,01 M ou solução

salina 0,9 %, de acordo com o parâmetro a ser analisado. A concentração de proteínas totais (PTNs) foi medida através do método colorimétrico de Bradford (1976) com leitura espectrofotométrica a 595 nm e as demais análises foram realizadas através de *kits* colorimétricos comerciais Labtest[®], conforme instruções do fabricante, e adaptado para microplacas. A razão AST/ALT foi obtida pela divisão da atividade plasmática destas enzimas.

4.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica plasmática

O ensaio utiliza como marcadores de peroxidação lipídica as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malonildialdeído. A mensuração dos metabólitos peroxidados foi realizada em microplacas pelo método descrito por Wallin e colaboradores (1993) com adaptações realizadas por Rabêlo (2004). Sucintamente, utilizaram-se 100 µL de material biológico diluído em PBS 0,01 M (diluição 1:5). Em seguida, este material foi submetido à reação com 1000 µL de uma solução do ácido tiobarbitúrico (TBA, 1,3%; p/v; Sigma[®], USA). Uma curva padrão foi preparada com 190 µL de diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetra-metoxi-propano (0-7,5 nmol/L, Sigma[®], USA) e 10 µL de hidroxitolueno butilado (BHT). Este material foi aquecido a 100 °C por 60 minutos, resfriados a 4 °C por 10 minutos para finalizar a reação. Na sequência, procedeu-se a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em um leitor para microplacas (Thermo Scientific[®]), tendo-se como comprimentos 532 e 600 nm.

Os dados obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas plasmáticas (Método de BRADFORD, 1976).

4.8 Avaliações locais (hepáticas)

4.8.1 Obtenção do homogenato hepático

Para obtenção do homogenato, o tecido hepático foi triturado em tampão de lise celular RIPA (Tampão para radioimunoprecipitação) na proporção de 1:10 até obtenção de um homogenato. Em seguida, o material foi sonificado por 10 segundos e centrifugado (5000 rpm por 1 hora). O sobrenadante foi então utilizado para dosagens enzimáticas e avaliação da peroxidação lipídica.

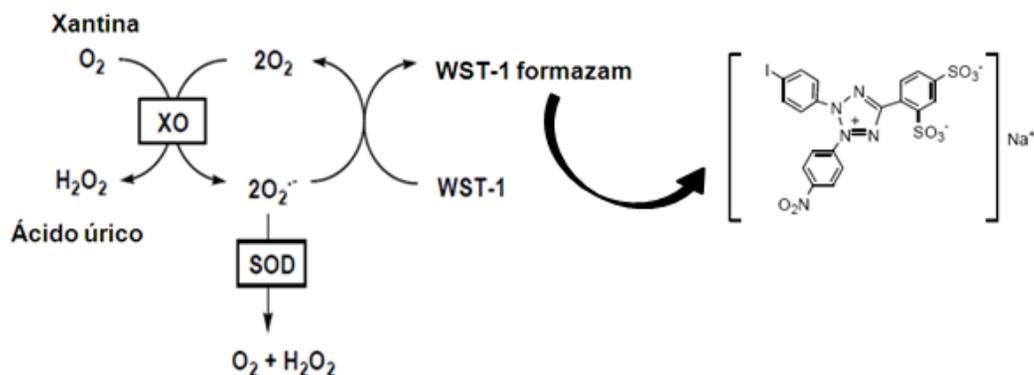
4.8.2 Avaliação da peroxidação lipídica hepática

A metodologia utilizada para mensuração da peroxidação lipídica hepática foi realizada semelhante a do plasma (ver item 4.7.3.), porém sem diluição do material biológico e os dados obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas hepáticas (Método de BRADFORD, 1976).

4.8.3 Mensuração da atividade da SOD hepática

Para mensuração da atividade da enzima SOD foi utilizado o *kit* comercial Fluka® e foi realizado em microplaca (Nunc®, Dinamarca) conforme instruções do fabricante. O método é baseado na utilização de um sal hidrossolúvel, o WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio, sal monossódico), que é reduzido pelo ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). O produto desta reação é o cromógeno “formazana”. A taxa de redução é linearmente relacionada à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD. Assim, a atividade desta última é expressa como porcentagem de inibição da XO pela da SOD (**Figura 9**). O homogenato hepático foi diluído em PBS 0,01 M na proporção 1:100 e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 450 nm (Leitora para microplacas (Thermo Scientific®). Os dados foram normalizados pela concentração de proteínas hepáticas (Método de BRADFORD, 1976).

Figura 9 – Reação para avaliação da atividade da SOD (Fluka®).



O método é baseado na utilização de um sal hidrossolúvel, o WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio, sal monossódico), que é reduzido pelo ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). O produto desta reação é o cromógeno “formazam”. A taxa de redução é linearmente relacionada à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD. Assim, a atividade desta última é então expressa como porcentagem de inibição da XO pela da SOD. **Fonte:** Fluka® SOD Assay kit.

4.8.4 Mensuração da atividade da CAT hepática

A metodologia utilizada para avaliação da atividade da CAT foi padronizada no Laboratório de Reatividade Cardiovascular e no Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) Berlin-Buch e, no momento, encontra-se em fase final de escrita do documento envolvendo a proteção técnico-científica. Assim, os detalhes relacionados à metodologia não estão aqui expostos. Contudo, resumidamente, os reagentes foram preparados imediatamente antes do início da reação, 20 µL do homogenato hepático diluído (1:500) em tampão específico foi adicionado a microplaca e para início da reação, adicionaram-se 20 µL de H₂O₂ (Concentração final = 1 mM). Em seguida, uma substância cromógena foi adicionada e o produto reacional foi quantificado em microplaca, a 540 nm em uma leitora específica (Thermo Scientific®). Uma curva padrão foi preparada para calcular a concentração da enzima nas amostras. A atividade da CAT foi normalizada pela concentração de proteínas hepáticas (Método de BRADFORD, 1976).

4.8.5 Perfil lipídico hepático

A determinação do perfil lipídico hepático foi realizado pela técnica descrita por Folch e colaboradores (1957). Sucintamente, esta se baseia na separação dos lipídios totais hepáticos pela utilização de solventes com diferentes polaridades. Assim, aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi triturado (semelhante à obtenção do homogenato para dosagens enzimáticas) em solução de clorofórmio:metanol (CHCl₃:MeOH - na proporção 2:1). O homogenato obtido foi centrifugado, após a adição de 400 µL de MeOH, a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante reservado em tubo previamente pesado. Neste, por sua vez, foram acrescentados 800 µL de CHCl₃ e 640 µL de cloreto de sódio (NaCl 0,73%) e, novamente foi realizada uma centrifugação nas condições descritas, sendo a fase inferior utilizada para a etapa seguinte, que consistiu na lavagem desta por três vezes com 600 µL de solução de Folch composta por 3% de CHCl₃, 48% de MeOH, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%. Após cada procedimento de lavagem, os tubos foram submetidos a uma nova centrifugação e o sobrenadante, desprezado. Os tubos foram mantidos em estufa 37 °C, *overnight*, para obtenção dos extratos lipídicos. Estes foram quantificados gravimetricamente em balança analítica e normalizados pelo peso tecidual hepático total.

Os extratos lipídicos obtidos, por sua vez, foram ressuspensos e homogeneizados em 500 µL de isopropanol até obtenção de uma suspensão. Esta foi utilizada para a mensuração do nível de triglicérides e colesterol no tecido hepático, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente no item 4.7.1.

4.8.6 Avaliações histológicas hepáticas

Todas as técnicas de processamento e coloração dos fragmentos hepáticos foram realizadas no Laboratório de Imunohistologia (ICBS – UFAL), em colaboração com a Profa. Dra. Salete Smaniotto.

Os fragmentos hepáticos (lóbulo direito) obtidos após sacrifício dos animais, foram fixados por imersão em formalina tamponada 10% por, no máximo, 16 horas. As amostras foram incluídas em parafina e em seguida foram seccionadas em micrótomo manual (Leica[®]), tendo-se de 4-6 µm como padrão para a espessura de corte. Em seguida, as lâminas foram devidamente coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e a análise morfológica realizada em microscópio óptico de luz (Olympus) no aumento de 400x. O registro fotográfico dos resultados foi obtido utilizando-se uma câmara fotográfica digital, tendo sido expressos resultados representativos por grupo experimental.

4.9 Análise dos Resultados

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias com correção de *Bonferroni* e teste T de *Student* não pareado. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel[®] (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism[®] 5.0 (San Diego, CA, USA), respectivamente.

5 RESULTADOS

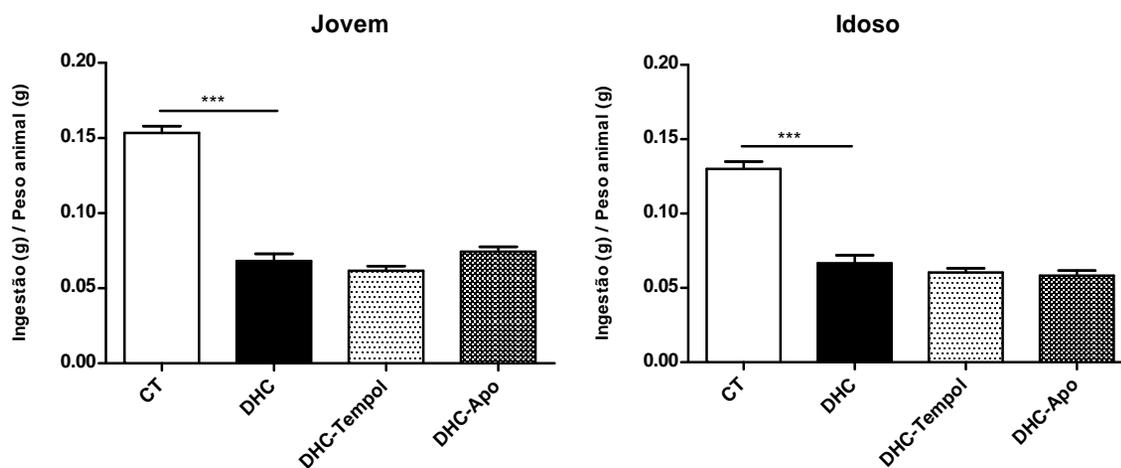
5.1 Ingesta alimentar

Durante 14 semanas de intervenção dietética foi mensurada a quantidade de dieta ingerida pelos animais, sendo esta avaliada pelo coeficiente de eficiência alimentar, representado graficamente no **Gráfico 1A-B** (jovens e idosos, respectivamente), onde a ingesta da última semana de intervenção foi normalizada pelo peso corporal dos animais, também da última semana, nos grupos experimentais em questão. Os animais, tanto jovens quanto idosos, pertencentes aos grupos alimentados com dieta hipercalórica (DHC, DHC-Tempol e DHC-Apocinina), ingeriram uma quantidade significativamente menor que os animais alimentados com a dieta controle “chow”, como mostra o **Gráfico 1**, e o tratamento farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) não modificou de forma significativa, para mais ou para menos, a ingesta destes animais DHC.

Gráfico 1 – Ingesta alimentar dos camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e apocinina (50 mg/kg).

A

B



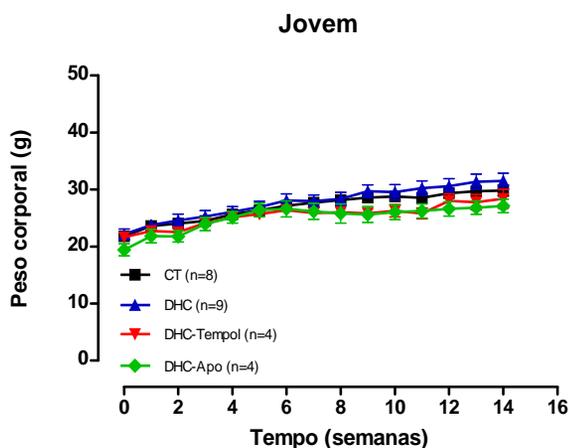
Os valores estão expressos em gramas (g) de dieta consumida individual normalizada pelo peso do animal em gramas (g). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado: *** $p < 0,001$ DHC vs CT.

5.2 Avaliação do peso corporal e crescimento dos animais

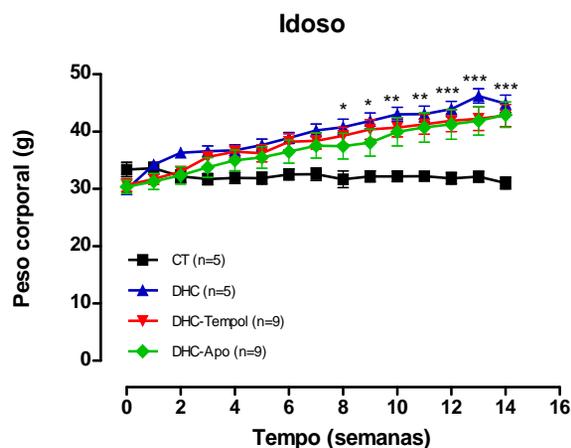
O acompanhamento do peso corporal durante as semanas de intervenção dietética e farmacológica encontra-se representado no **Gráfico 2A-B** (jovens e adultos, respectivamente). Os resultados mostram que não há diferença significativa entre os grupos jovens durante todo o período experimental (**Gráfico 2A**). Contudo, para os animais idosos observa-se uma diferença significativa entre os animais alimentados com dieta HC comparados aos animais controle, observada a partir da 8ª semana de intervenção dietética (* $p < 0,05$). Esta diferença é mantida até o final do experimento (*** $p < 0,001$, **Gráfico 2B**). Os tratamentos farmacológicos com o tempol, um mimético da SOD, e a apocinina, um inibidor seletivo do complexo NAD(P)H oxidase, não modificou, de forma significativa, o ganho ponderal dos animais DHC.

Gráfico 2 – Acompanhamento do peso corporal dos camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**) com intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

A



B

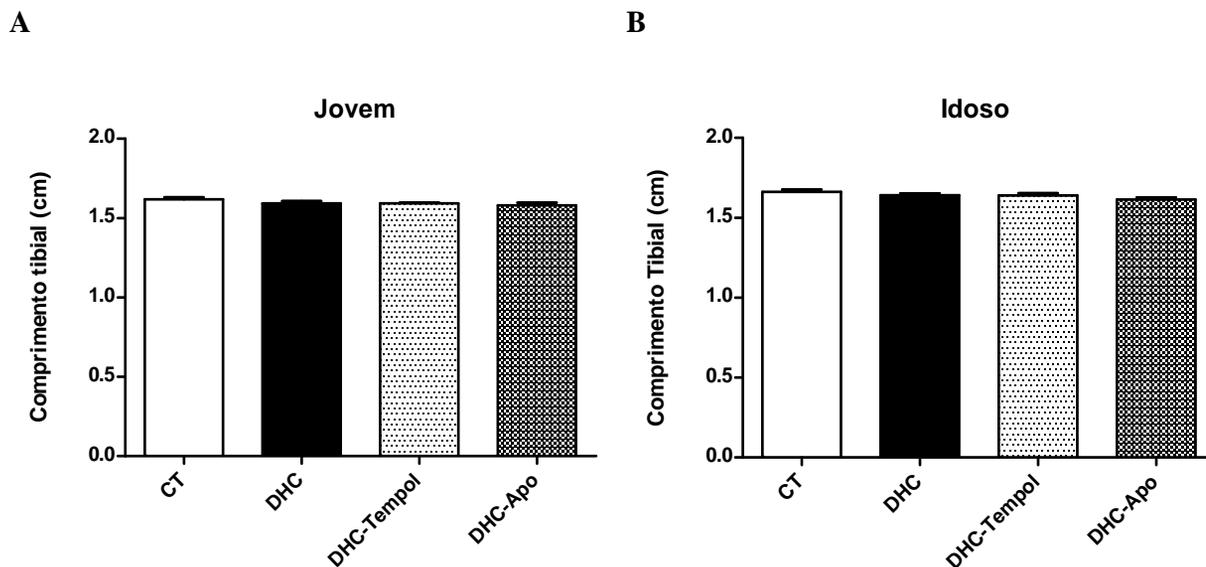


Os valores estão expressos em gramas (g). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ DHC vs CT.

O crescimento animal, avaliado pelo comprimento tibial direito dos animais está expresso no **Gráfico 3A-B** (jovens e idosos, respectivamente). A análise dos dados mostra que não houve diferença significativa entre os animais pertencentes ao grupo jovem (controle e hipercalórico com e sem tratamento farmacológico), bem como aqueles pertencentes ao grupo idoso (controle e hipercalórico com e sem tratamento farmacológico), sugerindo que a dieta hipercalórica utilizada no presente estudo não influenciou no desenvolvimento dos animais jovens, assim como não interferiu na modulação deste parâmetro nos animais idosos.

Os resultados obtidos também demonstram que o tratamento farmacológico não interferiu no desenvolvimento animal.

Gráfico 3 – Comprimento tibial dos camundongos C57BL/6J jovens (A) e idosos (B) após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e apocinina (50 mg/kg).

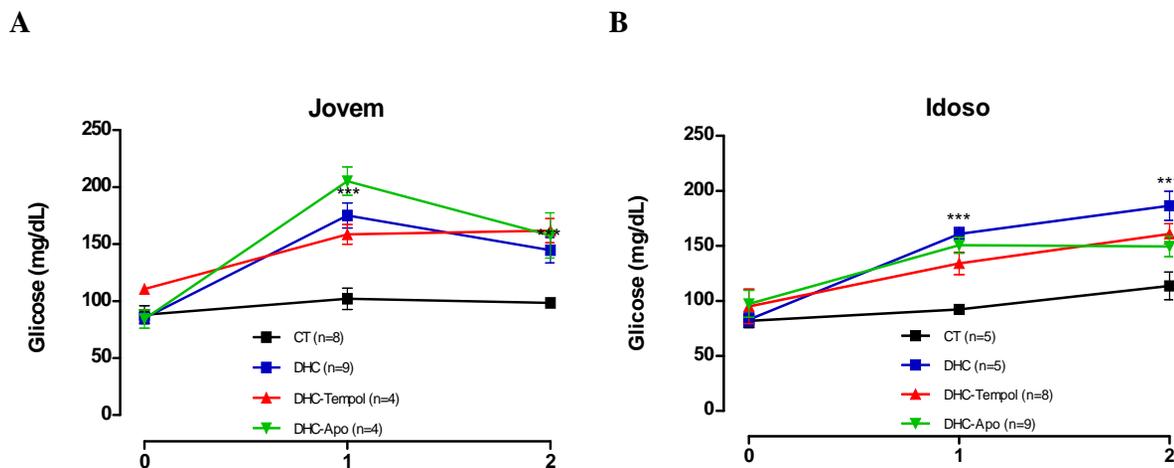


Os valores estão expressos em centímetros (cm). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado.

5.3 Glicose de jejum

Os níveis de glicose de jejum (mg/dL) dos animais medidos semanalmente estão representados no **Gráfico 4A-B** (jovens e adultos, respectivamente) em tempos distintos: tempo 0 (basal, antes da intervenção dietética), tempo 1 (início do tratamento farmacológico com o tempol e a apocinina) e tempo 2 (final do tratamento farmacológico e dietético). Nota-se, tanto nos animais jovens quanto nos animais idosos DHC, um aumento significativo dos níveis de glicose de jejum quando comparados ao grupo CT correspondente. É possível observar, nos grupos tratados com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), tanto jovens quanto idosos, que não ocorreram mudanças significativas neste perfil ao final do tratamento.

Gráfico 4 – Avaliação da glicose de jejum dos camundongos C57BL/6J jovens (A) e idosos (B) durante intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).



Glicose de jejum basal (0), início de intervenção farmacológica (1) e final de intervenção farmacológica e dietética (2), de cada grupo experimental. Os valores estão expressos em miligramas/decilitro (mg/dL). Cada ponto do gráfico representa a média \pm EPM. ANOVA (duas vias) com *Bonferroni*: *** $p < 0,001$ DHC vs CT.

5.4 Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

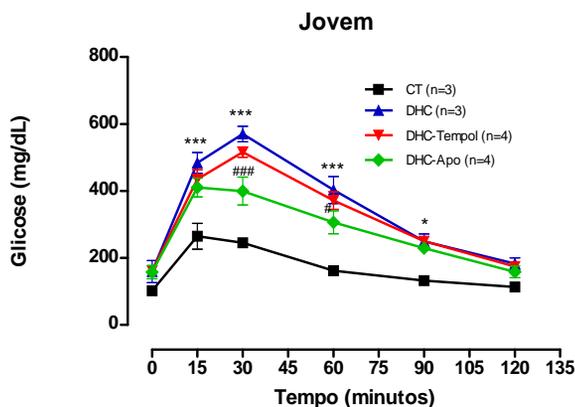
O **Gráfico 5A-B** (jovens e idosos, respectivamente) mostra a tolerância à glicose. Como observado, a curva do gráfico dos animais alimentados com dieta hipercalórica (DHC), mostra um pico de concentração de glicose significativamente maior, após injeção intraperitoneal de 2g de glicose/kg de peso corporal, em relação aos animais alimentados com dieta “chow”.

A análise do perfil da curva mostra um declínio na glicemia em função do tempo. Tal declínio, por sua vez, mostra-se significativamente menor nos animais expostos a uma dieta hipercalórica comparados aos animais expostos a uma dieta “chow”, indicando um perfil de intolerância à glicose nos animais DHC (**Gráfico 5A-B**).

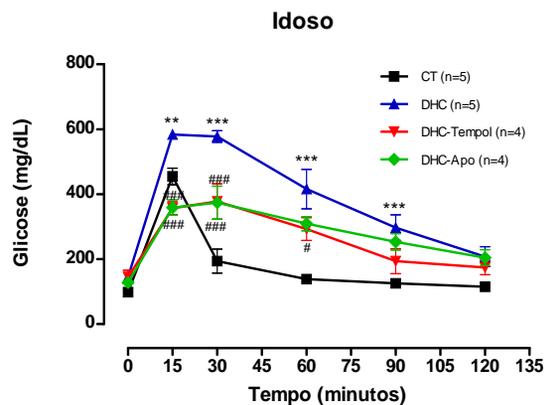
Nos grupos jovem e idoso tratados farmacologicamente com a apocinina, é possível observar um declínio significativo na curva glicêmica em função do tempo, em relação ao grupo DHC não tratado, indicando uma melhora na intolerância à glicose (**Gráfico 5A-B**) quando comparado ao grupo controle. Um declínio significativo na curva glicêmica do grupo idoso tratado com o tempol também é observado (**Gráfico 5B**). Contudo, o mesmo não ocorre no grupo jovem tratado com o tempol (**Gráfico 5A**).

Gráfico 5 – Tolerância à glicose em camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

A



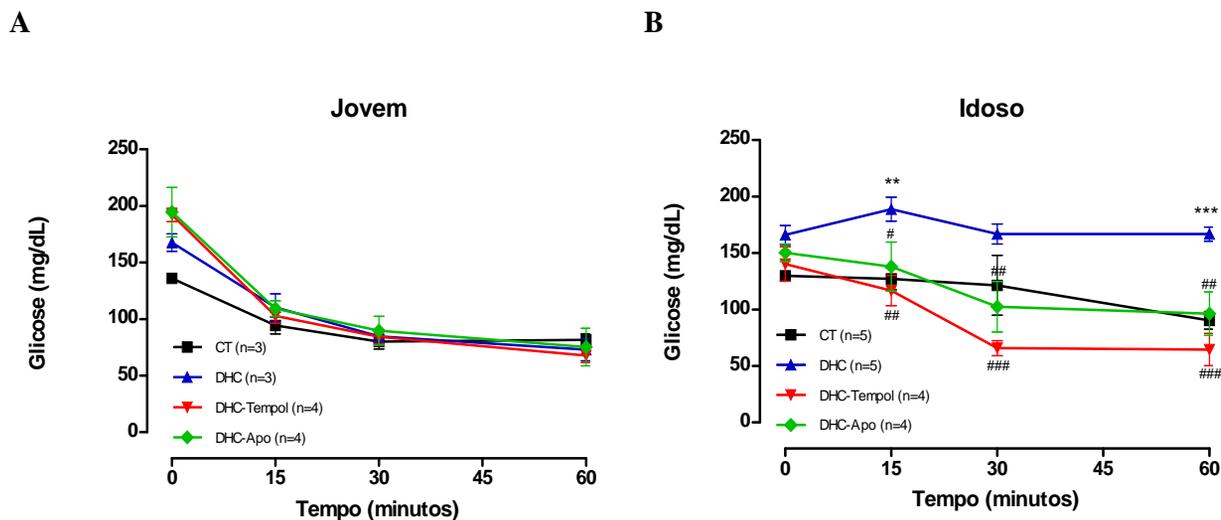
B



Após 12 horas de jejum noturno, administraram-se, por via intraperitoneal, uma dose de 2g de glicose/kg de peso corporal. Após este procedimento, a glicose sanguínea foi avaliada antes ($t=0$) e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. Os valores estão expressos em miligramas/decilitro (mg/dL). Todos os pontos representam a média \pm EPM. ANOVA (duas vias) com *Bonferroni*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ DHC vs CT; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ DHC + Tempol e DHC + Apocinina vs DHC.

O **Gráfico 6A-B** (jovens e idosos, respectivamente) mostra o perfil de sensibilidade à insulina dos grupos em questão. É possível observar, nos animais jovens, que as curvas glicêmicas em função do tempo, após injeção intraperitoneal de 0,75 U de insulina/kg de peso corporal, apresentaram comportamento semelhante. Contudo, a curva glicêmica dos animais idosos DHC indica uma sensibilidade à insulina diminuída. No entanto, após o tratamento com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), foi observada uma melhora neste parâmetro, visto que ocorreu uma decaída significativa nos níveis glicêmicos, observados em função do tempo e comparados aos animais DHC.

Gráfico 6 – Sensibilidade à insulina em camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).



Após a aplicação intraperitoneal de 0,75 U de insulina/kg de peso corporal, os níveis glicêmicos foram avaliados antes ($t=0$) e 15, 30 e 60 minutos após a injeção de insulina. Os valores estão expressos em miligramas/decilitro (mg/dL). Todos os pontos representam a média \pm EPM. ANOVA (duas vias) com *Bonferroni*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ DHC vs CT; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ DHC - Tempol e DHC - Apocinina vs DHC.

5.5 Peso relativo tecidual

Os valores de peso tecidual estão representados graficamente e numericamente em percentual, nas figuras e tabelas, respectivamente, que se seguem.

As **Tabelas 3** e **4** mostram o peso tecidual para os grupos jovens e idosos, respectivamente: peso relativo cardíaco, pulmonar, renal, muscular e intestinal. O peso tecidual hepático está representado graficamente no **Gráfico 8**, assim como o perfil de gordura visceral no **Gráfico 7**.

É possível observar uma perda tecidual cardíaca, renal e intestinal nos animais jovens alimentados com dieta hipercalórica quando comparados ao controle. Uma vez tratados com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), não foi observado melhora significativa em relação ao grupo DHC que não foi submetido à intervenção com os fármacos supracitados (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Peso tecidual relativo dos animais jovens submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

Parâmetro	Grupos Jovens				CT vs DHC	DHC vs DHC-Tempol	DHC vs DHC-Apocinina
	CT	DHC	DHC-Tempol	DHC-Apocinina			
Coração (%)	0,505 ± 0,012	0,419 ± 0,023	0,389 ± 0,018	0,451 ± 0,017	< 0,05	NS	NS
Pulmão (%)	0,612 ± 0,034	0,551 ± 0,057	0,648 ± 0,029	0,605 ± 0,002	NS	NS	NS
Rim (%)	1,25 ± 0,032	1,078 ± 0,053	1,002 ± 0,029	1,161 ± 0,036	< 0,05	NS	NS
Músculo Gastrocnêmio (%)	0,543 ± 0,018	0,484 ± 0,023	0,541 ± 0,034	0,597 ± 0,059	NS	NS	NS
Intestino (%)	3,949 ± 0,180	2,368 ± 0,155	2,25 ± 0,053	3,052 ± 0,298	< 0,001	NS	NS

Os valores estão expressos como média ± EPM obtidos de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Teste *t de Student* não pareado. NS = Não significativo.

Nos animais idosos DHC, a perda tecidual ocorreu em todos os parâmetros avaliados: cardíaco, pulmonar, renal, muscular e intestinal, em relação ao grupo CT. O tratamento com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) não melhorou a perda tecidual observada quando comparados ao grupo DHC não submetido a intervenção farmacológica (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Peso tecidual relativo dos animais idosos submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

Parâmetro	Grupos Idosos				CT vs DHC	DHC vs DHC-Tempol	DHC vs DHC-Apocinina
	CT	DHC	DHC-Tempol	DHC-Apocinina			
Coração (%)	0,488 ± 0,011	0,332 ± 0,019	0,384 ± 0,027	0,393 ± 0,023	< 0,01	NS	NS
Pulmão (%)	0,578 ± 0,034	0,390 ± 0,043	0,452 ± 0,028	0,446 ± 0,030	< 0,05	NS	NS
Rim (%)	1,250 ± 0,042	0,900 ± 0,025	0,992 ± 0,052	1,005 ± 0,053	< 0,01	NS	NS
Gastrocnêmio (%)	0,590 ± 0,027	0,394 ± 0,026	0,347 ± 0,027	0,403 ± 0,040	< 0,05	NS	NS
Intestino (%)	3,614 ± 0,102	1,864 ± 0,071	1,327 ± 0,354	1,487 ± 0,089	< 0,001	NS	NS

Os valores estão expressos como média ± EPM obtidos de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Teste *t de Student* não pareado. NS = Não significativo.

5.5.1 Perfil de gordura visceral

Os dados do **Gráfico 7** representam o percentual de gordura epididimal, perirrenal e mesentérica, dos animais jovens (**A**, **C** e **E**, respectivamente) e idosos (**B**, **D** e **F**, respectivamente). Nota-se um aumento significativo nas gorduras epididimal e perirrenal nos animais jovens alimentados com dieta hipercalórica quando comparados com o grupo

controle “chow” (**Gráfico 7A e C**, respectivamente), não sendo observado diferença significativa na gordura mesentérica (**Gráfico 7E**). A intervenção farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) não modificou o padrão tecidual de gorduras. Já para os camundongos idosos, os dados mostram um aumento significativo nas gorduras epididimal, perirrenal e mesentérica do grupo DHC em relação aos animais alocados no grupo controle (**Gráfico 7B, D e F**, respectivamente). Nos grupos tratados com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), o aumento de gordura visceral não foi alterado significativamente em relação ao grupo exposto apenas à dieta hipercalórica.

A **Figura 10** mostra fotos representativas de um animal de cada grupo CT e DHC, jovem e idoso, dando ênfase (no círculo vermelho) para o acúmulo de gordura visceral, onde é possível visualizar que nos animais idosos a intensidade do acúmulo foi maior.

Figura 10 – Foto representativa dos camundongos C57BL/6J (**A**) CT-Jovem, (**B**) DHC-Jovem, (**C**) CT-Idoso e (**D**) DHC-Idoso, após intervenção dietética, com enfoque (em círculo vermelho) para o acúmulo de gordura visceral.

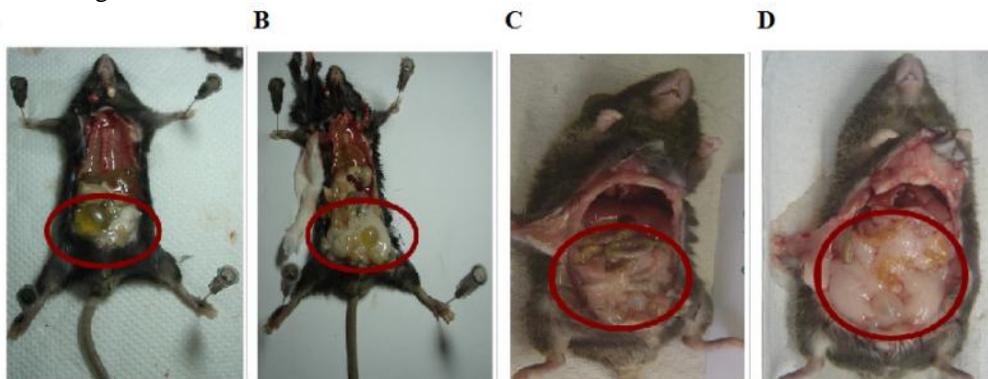
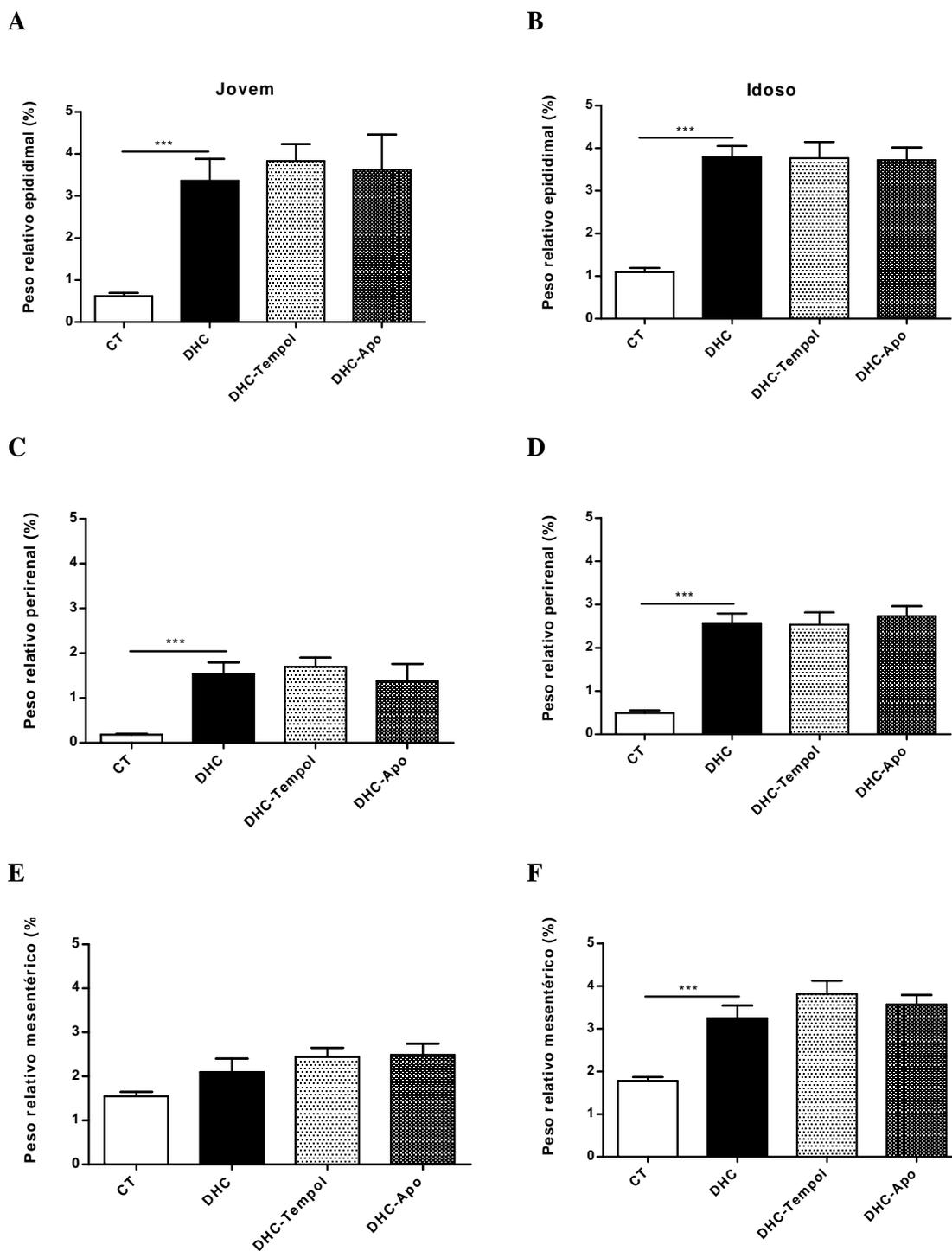


Gráfico 7 - Peso relativo do tecido adiposo epididimal (A e B), perirenal (C e D) e mesentérico (E e F) dos camundongos C57BL/6J jovens e idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).



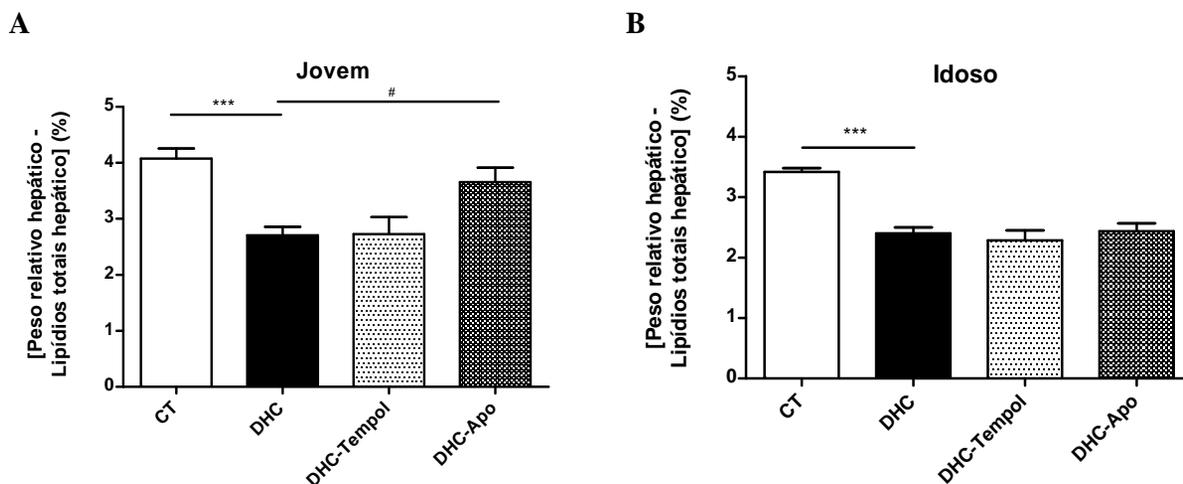
Os valores estão expressos em percentual (%). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado: *** $p < 0,001$ DHC vs CT.

5.5.2 Peso tecidual hepático

O peso relativo hepático, além de constituir um dos parâmetros de caracterização macroscópica, é também um parâmetro de avaliação da integridade morfológica e funcional do fígado, ou seja, através dessa medida é possível se avaliar o comprometimento funcional por perda tecidual deste órgão.

No **Gráfico 8A e B** é possível observar uma diminuição significativa na massa hepática entre o grupo DHC e o CT ($p < 0,001$), tanto nos jovens quanto nos idosos, indicando que a dieta hipercalórica compromete o tecido hepático, representando prejuízo funcional. O grupo tratado com o tempol, jovem e idoso, não apresentou uma melhora neste quadro, porém após intervenção com a apocinina, é possível observar, no grupo jovem, um aumento significativo na massa tecidual hepática em relação ao grupo DHC não submetido a este tratamento farmacológico. Estes dados sugerem uma possível ação protetora da apocinina (50 mg/kg) sobre este tecido.

Gráfico 8 – Peso hepático relativo dos camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).



Os valores estão expressos em percentual (%). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado: *** $p < 0,001$ DHC vs CT; # $p < 0,05$ DHC – Apocinina vs DHC.

5.6 Avaliações sistêmicas

5.6.1 Perfil lipídico e peroxidação lipídica plasmática

Os dados obtidos dos níveis de triglicerídeos, colesterol e VLDL estão expressos nas **Tabelas 5 e 6**, jovens e idosos respectivamente. Não foi observado diferença significativa nos níveis de triglicerídeos e VLDL plasmáticos, tanto nos grupos jovens quanto nos grupos idosos DHC vs CT para o período de intervenção do protocolo experimental (14 semanas). Contudo, é possível visualizar que o nível de colesterol dos animais alimentados com dieta hipercalórica é estaticamente mais elevado quando comparados ao grupo controle “chow”, tanto para jovens quanto para idosos.

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada através da mensuração da concentração de malonildialdeído [MDA], um dos principais produtos da peroxidação lipídica, através do método TBARS. Observa-se que não há diferença significativa para os grupos jovens (**Tabela 5**) e para os grupos idosos (**Tabela 6**) para este parâmetro avaliado.

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, VLDL e [MDA] dos animais jovens submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

Parâmetro	Grupo CT	Grupo DHC	Grupo DHC-Tempol	Grupo DHC-Apocinina
Triglicerídeos (mg.mL ⁻¹)	60.93 ± 5.13	77.91 ± 10.05	63.33 ± 4.024	101.9 ± 16.51
Colesterol Total (mg.mL ⁻¹)	23.32 ± 11.09	66.03 ± 9.225 ^a	62.42 ± 7.742	49.88 ± 14.03
VLDL (mg.mL ⁻¹)	12.19 ± 1.03	15.58 ± 2.01	12.67 ± 0.805	20.37 ± 3.30
[MDA] (nM.mgProteína ⁻¹)	62.12 ± 9.03	91.48 ± 28.75	47.97 ± 8.15	81.39 ± 7.393

Cada valor representa a média ± EPM. Teste *t de Student* não pareado: ^ap<0,05 DHC vs CT.

Tabela 6 – Concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, VLDL e [MDA] dos animais idosos submetidos ao tratamento dietético com dieta HC e farmacológico com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).

Parâmetro	Grupo CT	Grupo DHC	Grupo DHC-Tempol	Grupo DHC-Apocinina
Triglicerídeos (mg.mL ⁻¹)	66.50 ± 10.24	118.3 ± 26.74	124.9 ± 18.05	88.69 ± 17.07
Colesterol Total (mg.mL ⁻¹)	32.13 ± 9.37	74.59 ± 10.12 ^a	74.54 ± 10.80	84.46 ± 13.73
VLDL (mg.mL ⁻¹)	13.30 ± 2.05	23.67 ± 5.35	24.99 ± 3.61	17.74 ± 3.41
[MDA] (nM.mg Proteína ⁻¹)	47.44 ± 8.76	77.42 ± 27.59	51.98 ± 8.80	40.88 ± 9.70

Cada valor representa a média ± EPM. Teste *t de Student* não pareado: ^ap<0,05 DHC vs CT.

5.6.2 Marcadores de função e lesão hepática

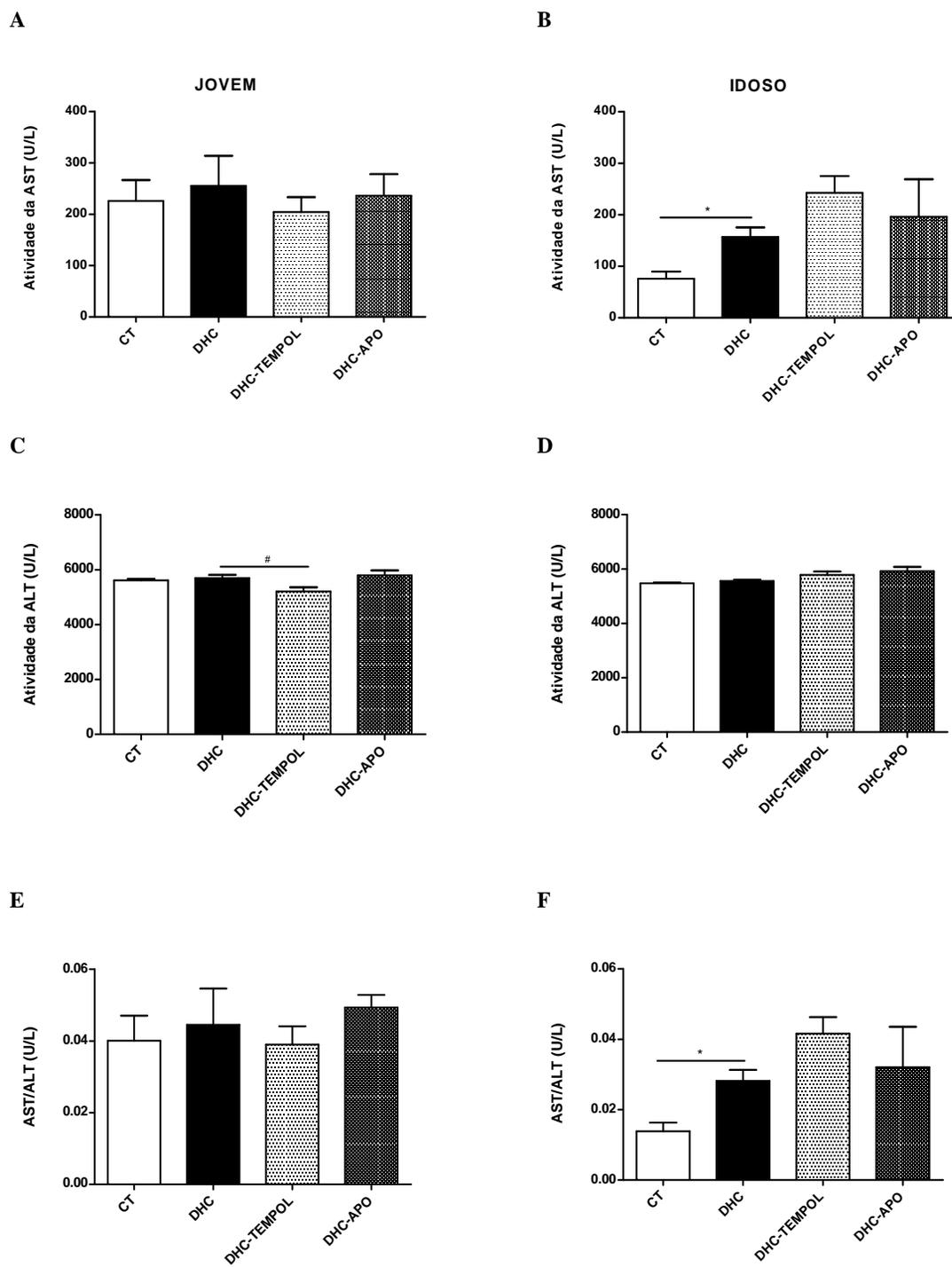
Os dados referentes aos marcadores de função e lesão hepática estão expressos no **Gráfico 9** e nas **Tabelas 7 e 8**.

Nota-se, pelos resultados obtidos que a atividade da AST nos animais jovens não foi estatisticamente diferente entre os grupos (**Gráfico 9A**). Contudo, nos animais idosos, alimentados com uma dieta hipercalórica, é possível observar um aumento significativo na atividade desta enzima quando comparado aos animais que receberam dieta “chow” (**Gráfico 9B**), apontando, desta forma, lesão hepática nesses animais. Nos grupos tratados farmacologicamente com o tempol (50 mg/kg) e com a apocinina (50 mg/kg) a atividade da AST não alterou de forma significativa, tanto para os jovens quanto para os idosos, em comparação com o respectivo grupo controle destes (DHC).

Na avaliação do marcador de lesão hepática mais específico, a enzima ALT, não foi observado mudanças significativas entre os grupos CT e DHC, tanto jovens quanto idosos (**Gráfico 9C-D**, respectivamente). No entanto, no grupo jovem tratado com o tempol (50mg/kg), é possível observar uma diminuição significativa da atividade desta enzima em relação ao grupo controle correspondente, o DHC (**Gráfico 9C**).

A razão AST/ALT, indicador de lesão e grau de comprometimento hepático, foi verificada (**Gráfico 9E-F**). Nota-se que a razão AST/ALT nos animais jovens não foi estatisticamente diferente entre os grupos (**Gráfico 9E**). Contudo, nos animais idosos, alimentados com uma dieta hipercalórica, é possível observar um aumento significativo nesta razão quando comparado aos animais que receberam dieta “chow” (**Gráfico 9F**), apontando, desta forma, grau de comprometimento hepático mais elevado nesses animais. Nos grupos tratados farmacologicamente com o tempol (50 mg/kg) e com a apocinina (50 mg/kg) não foi observado diferença significativa, tanto para os jovens quanto para os idosos, em comparação com o respectivo grupo controle destes (DHC).

Gráfico 9 – Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e a razão AST/ALT dos camundongos C57BL/6J jovens (**A, C e E**, respectivamente) e idosos (**B, D e F**, respectivamente), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).



Os valores estão expressos em unidade enzimática por litro de analito (U/L). Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado: * $p < 0,05$ DHC vs CT; # $p < 0,05$ DHC - Tempol vs DHC.

O resultado referente aos demais marcadores de função hepática avaliados, tais como ALP, -GT, LDH, albumina e PTNs totais, encontra-se expresso na **Tabela 7** (jovens) e **8** (idosos). As análises não indicaram mudanças significativas nos parâmetros avaliados, tanto para os grupos jovens quanto para os grupos idosos.

Tabela 7 – Atividades plasmáticas de marcadores hepáticos: fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (-GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos camundongos C57Bl/6J jovens, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).

Parâmetro	Grupo CT	Grupo DHC	Grupo DHC-Tempol	Grupo DHC-Apocinina
ALP (U/L)	4857 ± 26.76	4934 ± 104.1	4883 ± 84.50	4993 ± 77.47
-GT (U/L)	2786 ± 110.3	3289 ± 339.1	3084 ± 107.3	3412 ± 224.3
LDH (U/L)	535.8 ± 21.36	593.2 ± 32.11	545.4 ± 5.63	643.6 ± 54.86
Albumina (mg/mL)	78.51 ± 0.66	78.48 ± 0.57	80.20 ± 1.05	78.59 ± 0.64
PTNs (mg/mL)	5.125 ± 0.64	8.373 ± 1.63	8.502 ± 1.01	6.411 ± 1.11

ALP (fosfatase alcalina), -GT (gama glutamiltransferase), desidrogenase láctica (LDH). U/L: unidade enzimática por litro de analito, quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitrofenol, p-nitroanilina e NADH, respectivamente. Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste *t de Student* não pareado.

Tabela 8 – Atividades plasmáticas de marcadores de função hepática: fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (-GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos camundongos C57Bl/6J idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).

Parâmetro	Grupo CT	Grupo DHC	Grupo DHC-Tempol	Grupo DHC-Apocinina
ALP (U/L)	4733 ± 55.14	4678 ± 69.15	4969 ± 132.1	4966 ± 132.5
-GT (U/L)	2546 ± 22.49	2624 ± 102.5	3109 ± 187.5	3184 ± 223.6
LDH (U/L)	528.0 ± 6.5	521.9 ± 8.89	589.2 ± 25.28	562.8 ± 21.06
Albumina (mg/mL)	77.64 ± 0.80	77.69 ± 1.4	78.79 ± 0.9	78.69 ± 0.36
PTNs (mg/mL)	4.687 ± 1.17	5.855 ± 1.18	8.910 ± 2.9	10.58 ± 1.38

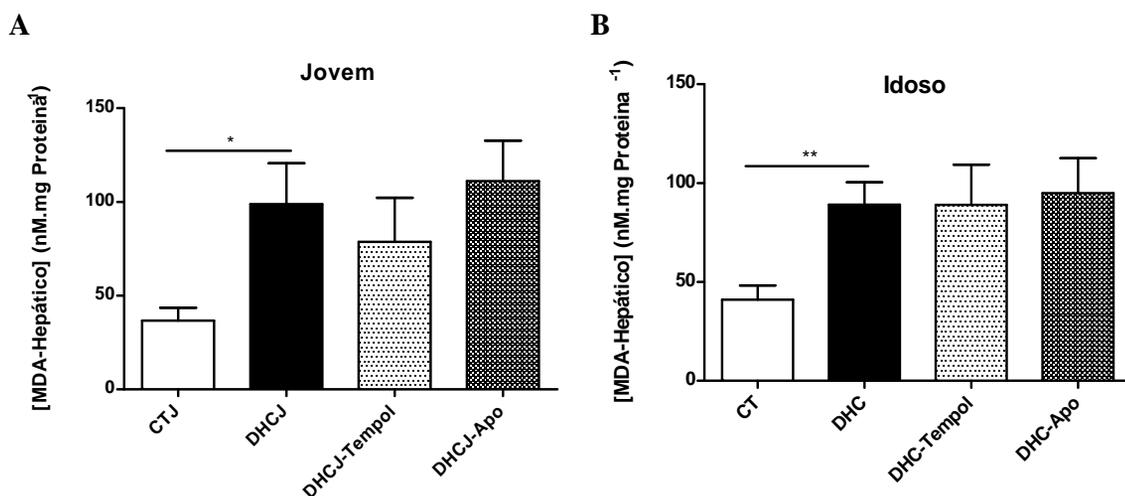
ALP (fosfatase alcalina), -GT (gama glutamiltransferase), desidrogenase láctica (LDH). U/L: unidade enzimática por litro de analito, quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitrofenol, p-nitroanilina e NADH, respectivamente. Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste *t de Student* não pareado.

5.7 Avaliações teciduais hepáticas

5.7.1 Peroxidação lipídica hepática

Os níveis de peroxidação lipídica hepática observados tanto para os grupos jovens como idosos, alimentados com dieta hipercalórica, mostraram-se significativamente diferentes, quando comparado aos respectivos grupos controles “chow”, como mostra o **Gráfico 10A-B**. Nos grupos tratados farmacologicamente com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), tanto jovens quanto idosos, não foi observado melhora significativa da peroxidação lipídica em relação ao grupo que recebeu apenas dieta hipercalórica.

Gráfico 10 – Peroxidação lipídica hepática em concentração de MDA (malonildialdeído) por miligrama de proteína dos camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50mg/kg).

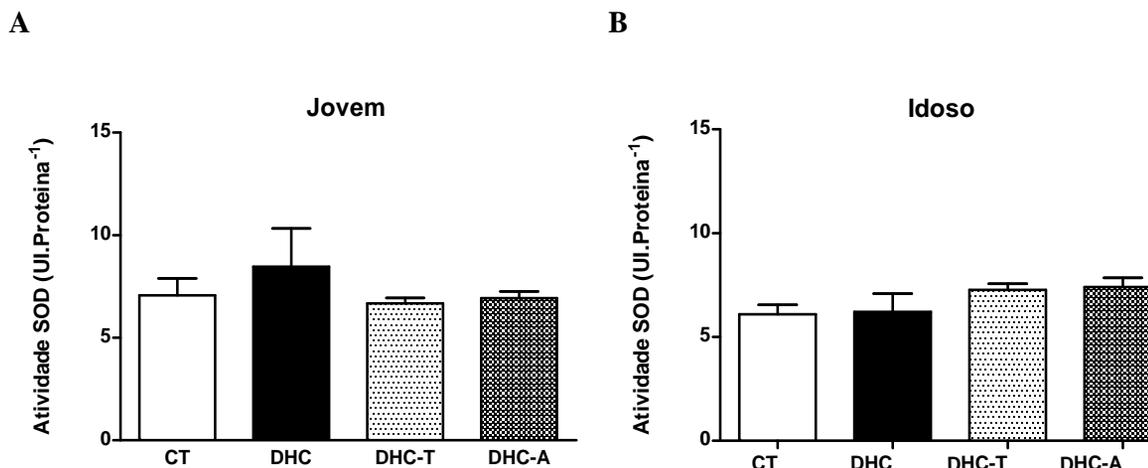


Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ DHC vs CT.

5.7.2 Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase hepática

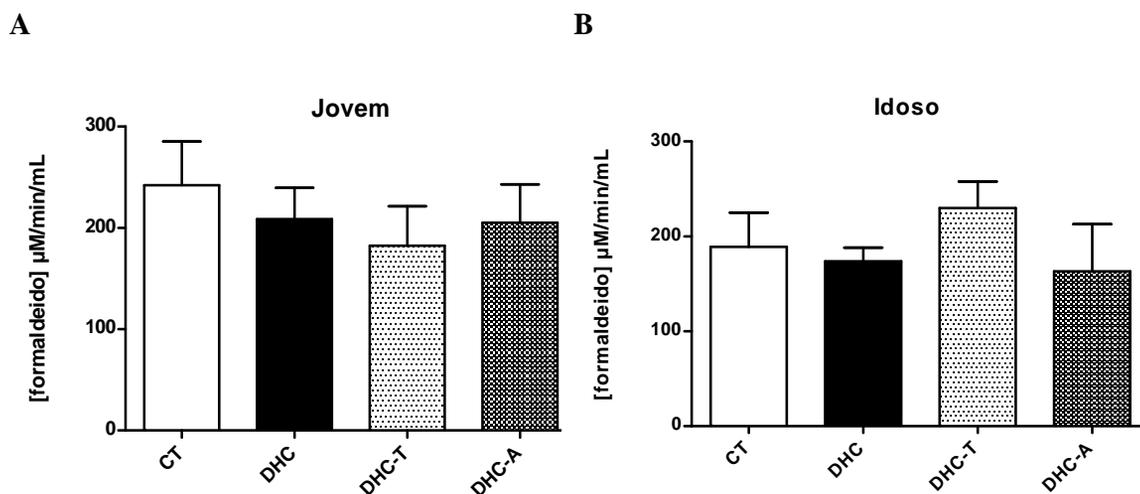
A atividade da SOD, medida como porcentagem de inibição da enzima xantina oxidase (XO), não diferiu significativamente entre os grupos experimentais jovens (**Gráfico 11A**) e entre os grupos experimentais idosos (**Gráfico 11B**). Da mesma forma a atividade da catalase, expressa em unidade enzimática, não se mostrou significativamente alterada entre os grupos (**Gráfico 12A-B**, jovem e idoso, respectivamente).

Gráfico 11 – Atividade da SOD (superóxido dismutase) em camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg), em percentual de inibição da enzima XO (xantina oxidase) por miligrama de proteína.



Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado.

Gráfico 12 – Atividade da catalase em camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50mg/kg) e a apocinina (50mg/kg), em mM/min/mL normalizada pela concentração hepática de proteínas em miligrama.



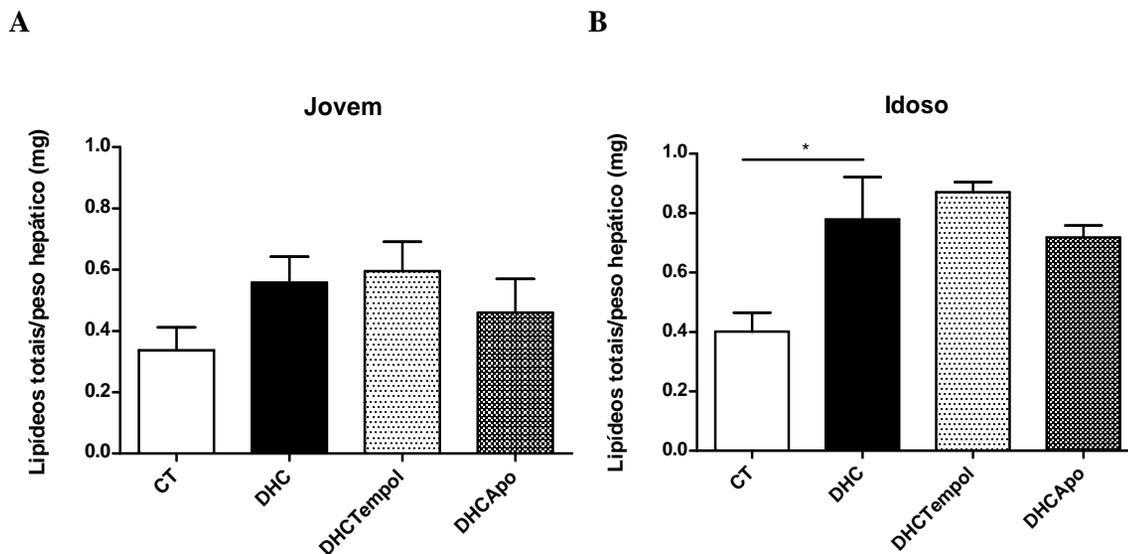
Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado.

5.7.3 Perfil lipídico hepático

A composição lipídica do tecido foi investigada e, com relação ao teor lipídico total dos animais jovens, os resultados observados não apresentaram diferença entre os grupos

experimentais (**Gráfico 13A**). Por outro lado, nos idosos é possível observar que quando alimentados com dieta hipercalórica, o teor lipídico total encontra-se significativamente elevado (**Gráfico 13B**).

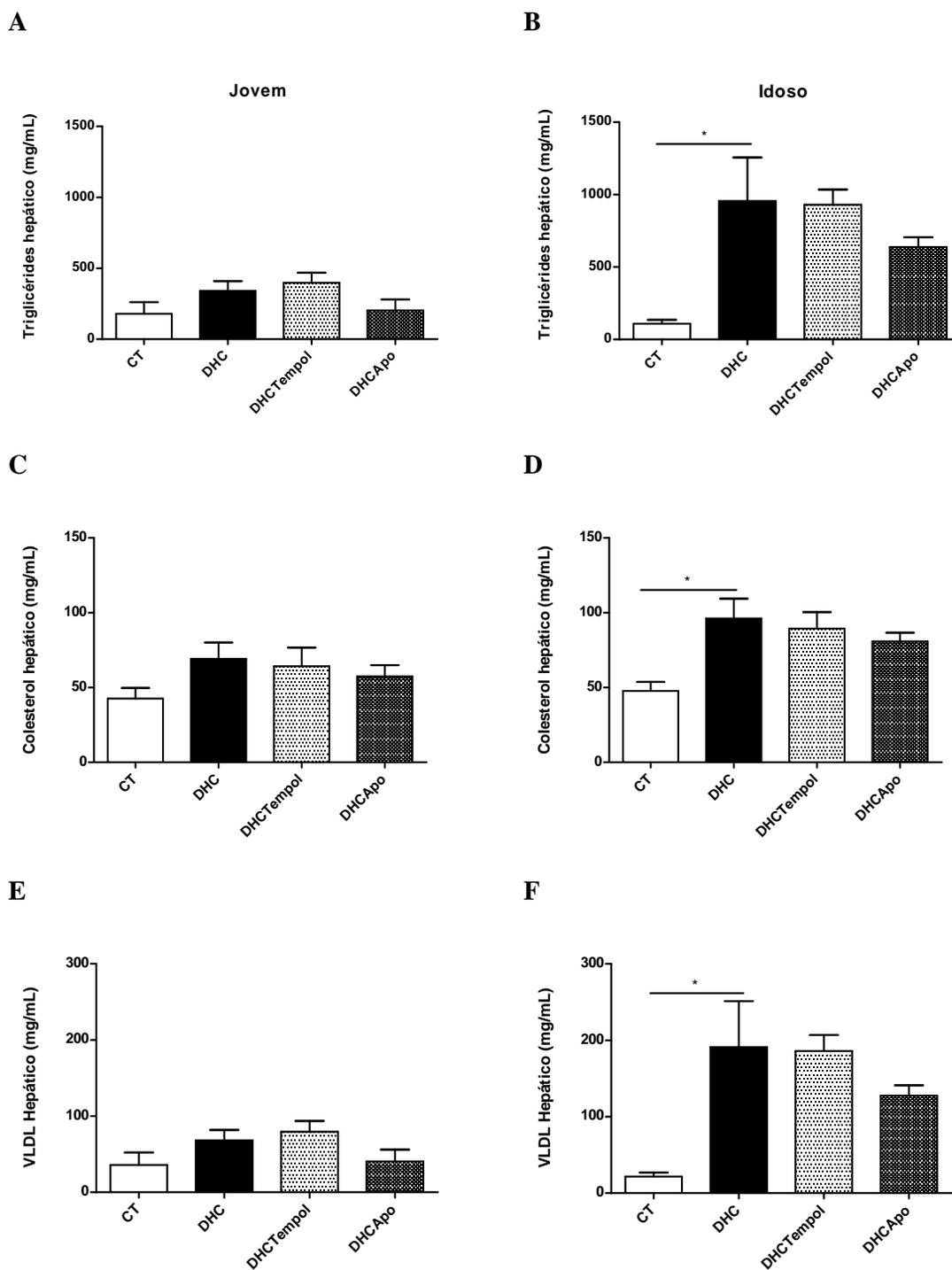
Gráfico 13 – Conteúdo lipídico total no tecido hepático dos camundongos C57BL/6J jovens (**A**) e idosos (**B**), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg). Os valores estão expressos em miligramas por miligramas de tecido (dados normalizados).



Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t de Student* não pareado: * $p < 0,05$ DHC vs CT.

Os parâmetros TG, COL e VLDL foram mensurados e os resultados obtidos estão representados no **Gráfico 14** (A-B; C-D; E-F, respectivamente). Nos jovens, os níveis dos parâmetros supracitados não diferiram estatisticamente entre os grupos (**Gráfico 14 A, C e E**). Nos idosos, os níveis destes parâmetros encontram-se significativamente elevados nos animais DHC comparados ao controle (**Gráfico 14 B, D e F**).

Gráfico 14 – Concentração de triglicerídeos, colesterol e VLDL no tecido hepático dos camundongos C57BL/6J jovens (**A, C e E**, respectivamente) e idosos (**B, D e F**, respectivamente), após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg).



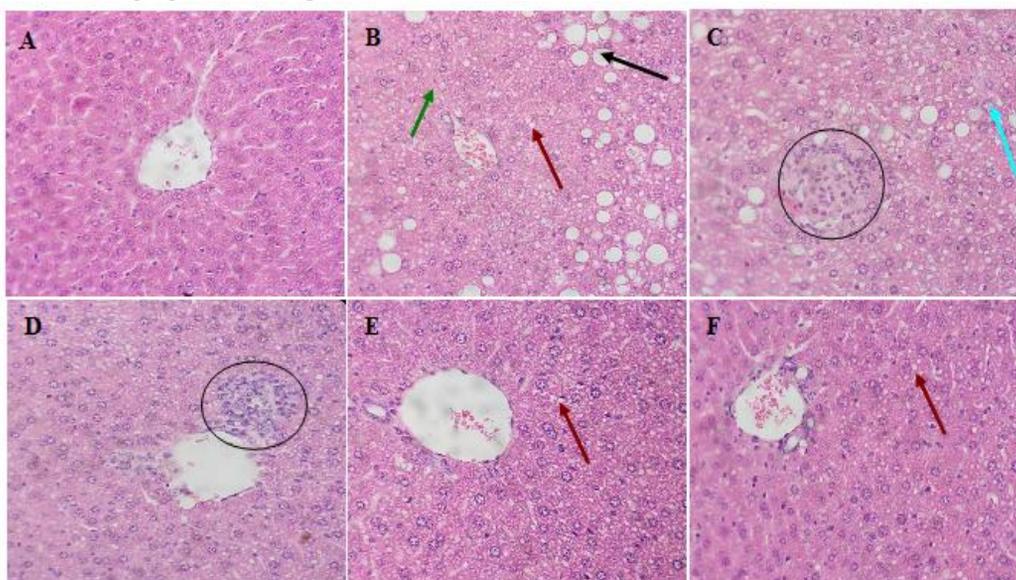
Os valores estão expressos em miligramas por mililitros. Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado: * $p < 0,05$ DHC vs CT.

5.7.4 Avaliações histológicas hepática

As alterações morfológicas do fígado foram avaliadas a partir dos cortes histológicos do órgão de cada animal experimental, representados nas **Figuras 11** (Grupos Jovens) e **12** (Grupos Idosos). Os resultados visualizados nos cortes histológicos aqui apresentados são representativos dos grupos experimentais.

Na fotomicrografia do corte histológico dos animais controle jovens é possível observar uma arquitetura normal do tecido hepático, com os cordões de hepatócitos, o espaço sinusoide e a veia centrolobular (**Figura 11A**).

Figura 11 – Fotomicrografias de cortes histológicos (6µm) obtidos dos camundongos C57BL/6J jovens, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE).



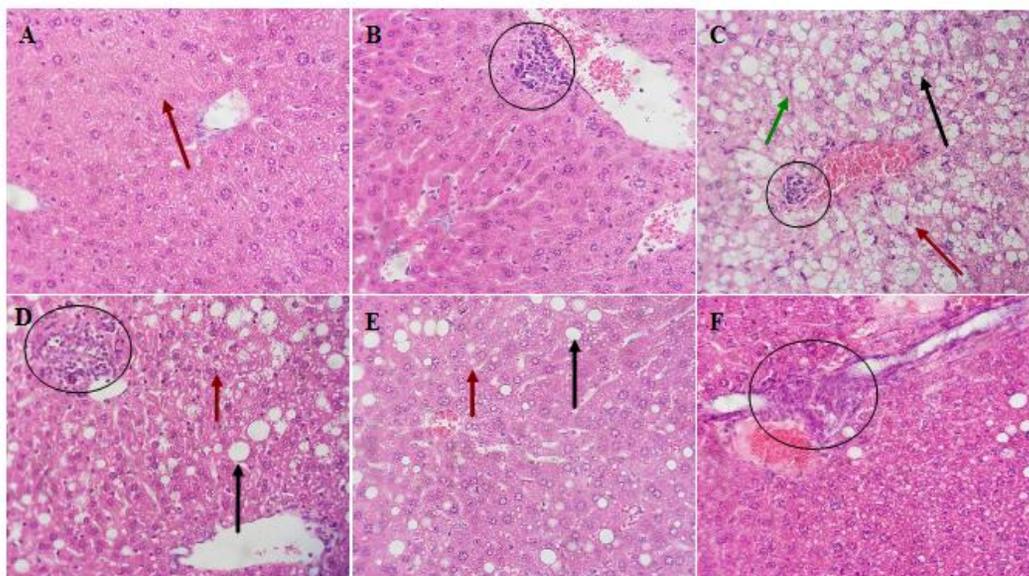
As microfotografias apresentadas representam os principais achados histológicos por grupo experimental. (**A**) Histologia hepática normal do grupo controle; (**B** e **C**) grupo DHC com desorganização celular hepática, vacuolização (micro -seta vermelha- e macro -seta preta) intracelular, focos de inflamação (círculo) e possível fibrose (seta verde escuro) e presença de células em balão (seta azul); (**D** e **E**) grupo DHC-Tempol com vacuolização (micro -seta vermelha-) intracelular, focos de inflamação (círculo) e (**F**) grupo DHC-Apocinina com vacuolização (micro -seta vermelha-) intracelular. Aumento de 400X.

Nos animais jovens alimentados com dieta hipercalórica foi observado alteração no parênquima hepático, com desorganização celular, presença de micro e macro vacúolos de gordura, sendo mais abundantes os microvacúolos, aglomerados de células inflamatórias, células em formato de balão (indicativo de processo inflamatório) e, apesar da coloração não ser específica para visualização de fibrose, é possível que estes animais apresentem, possivelmente pela deposição de matriz entre as células o que aumenta a distância entre elas

(Figura 11B-C). Nos animais tratados com o tempol (Figura 11D-E) e a apocinina (Figura 11F), a análise qualitativa indica uma presença menos acentuada de microvacúolos e raros macrovacúolos. Contudo, focos inflamatórios ainda foram visualizados no grupo tratado com o tempol.

A análise dos cortes histológicos dos fígados do grupo controle “chow” idoso (Figura 12A-B) indica um processo inicial de alteração no parênquima hepático com presença rara de pequenos vacúolos, aglomerados de células inflamatórias, células em formato de balão e núcleos picnóticos (sinais característicos de degeneração celular), decorrido, muito provavelmente, pela idade já avançada destes animais. Este quadro se agrava quando estes animais idosos ingerem dieta hipercalórica, pois o grau de comprometimento hepático observado foi mais severo, com infiltrado gorduroso intenso, caracterizado pela presença acentuada de micro e macrovacúolos, além de aglomerados inflamatórios e possível fibrose (Figura 12C). Contudo, no grupo tratado com o tempol (Figura 12D) e a apocinina (Figura 12E-F), a análise qualitativa indica uma presença menos acentuada de micro e macrovacúolos. Entretanto, alguns aglomerados inflamatórios ainda foram visualizados.

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos (6µm) obtidos dos camundongos C57BL/6J idosos, após intervenção dietética, controle e hipercalórica, e farmacológica com o tempol (50 mg/kg) e a apocinina (50 mg/kg) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE).



As microfotografias apresentadas representam os principais achados histológicos por grupo experimental. (A e B) Histologia hepática do grupo controle com desorganização celular (seta vermelha) e foco inflamatório (círculo); (C) grupo DHC com desorganização celular hepática, vacuolização (micro (seta vermelha) e macro (seta preta)) intracelular, focos de inflamação (círculo) e possível fibrose (seta verde escuro); (D) grupo DHC-Tempol com vacuolização (micro-seta vermelha- e macro -seta preta-) intracelular, focos de inflamação (círculo) e (E e F) grupo DHC-Apocinina com vacuolização (micro-seta vermelha- e macro -seta preta) intracelular e foco inflamatório (círculo). Aumento de 400X.

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a ingestão de dieta hipercalórica, por 14 semanas, induz alterações metabólicas semelhantes às aquelas observadas em portadores de doenças cardiometabólicas (como a SMet humana) e que, de fato, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas associadas às mudanças dietéticas constituem mais um componente diagnóstico para a SMet, onde a infiltração gordurosa hepática é acentuada quando a dieta hipercalórica é ingerida em idade avançada (GUPTE et al., 2010).

Levando-se em consideração estudos anteriores realizados por nosso grupo, nos quais o desbalanço redox (tanto local (hepático) quanto sistêmico) e a presença de esteatohepatite foram observados no modelo animal para a SMet, após intervenção dietética hipercalórica por 26 semanas, o presente estudo visou investigar, principalmente, as alterações hepáticas e o papel do balanço redox local neste modelo animal, porém com uma intervenção dietética por 14 semanas. Somando-se a isso, analisou-se a exposição dietética em animais adultos jovens e idosos. Além disso, foi objeto desse estudo a intervenção farmacológica com dois agentes: o tempol, um mimético da SOD e a apocinina, um inibidor seletivo do complexo NADPH oxidase. Estas ferramentas farmacológicas foram utilizadas com o intuito de se investigar as vias metabólicas envolvidas no possível desbalanço redox presente após este menor tempo de intervenção dietética hipercalórica e a relação deste possível evento oxidativo com as alterações metabólicas envolvidas na SMet.

Diversos estudos são realizados com o intuito de elucidar vias metabólicas envolvidas em determinadas patogenias e para isso, a utilização de modelos animais geneticamente modificados e agentes farmacológicos que bloqueiam determinadas vias ou mimetizam outras são largamente utilizados (VONCKEN, 2003). No campo de estudo do balanço redox os agentes 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (tempol) (WILCOX, 2010) e o 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (apocinina) (STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008) destacam-se.

O tempol atua como mimético da SOD por sequestrar as partículas de $\cdot\text{O}_2^-$ sendo, desta forma, utilizado na pesquisa de várias patogenias, incluindo aquelas relacionadas com a SMet, como a RI (BANDAY et al., 2005), e hipertensão (PATEL et al., 2006). Possui capacidade de permear a membrana celular e o trato gastrointestinal o que o torna efetivo após administração oral, sendo bem efetivo quando adicionado na água de beber de ratos e

camundongos na concentração entre 1 e 6 mmol.l^{-1} (WILCOX e PEARLMAN; 2008). A apocinina é experimentalmente utilizada como um inibidor seletivo da NADPH oxidase, que é responsável pela maior produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo assim a produção de O_2^- dos macrófagos e neutrófilos ativados e possui múltiplas ações biológicas além dos efeitos antioxidantes (STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008; RABÊLO et al., 2010).

Os resultados encontrados no presente estudo mostram que a dieta hipercalórica utilizada foi ingerida em quantidades significativamente menores pelos animais dos grupos de diferentes idades (jovens e idosos) quando comparado à ingestão de dieta “chow” (**Gráfico 1**). Alguns estudos mostram que o nível de saciedade induzido pela elevada ingestão de lipídios é mais elevado, devido, em parte, a diminuição do esvaziamento gástrico e pela elevada liberação de leptina (hormônio que participa do controle central do apetite) pelos adipócitos (WISSE, 2004; ELIAS e BITTENCOURT, 2008). No presente estudo, o aumento da adiposidade visceral, observado nos animais jovens e idosos alimentados com dieta hipercalórica pode ter causado o aumento da liberação de leptina e assim, contribuído para o nível de saciedade elevado nestes animais. Contudo, uma vez que não se dosou os níveis dessa adipocina, essa hipótese não foi confirmada.

O tempo de exposição à dieta por 14 semanas não induziu obesidade corporal nos animais jovens, porém foi suficiente para induzir a um significativo aumento de peso corporal nos animais idosos (**Gráfico 2**). Para avaliar se o crescimento dos animais jovens foi um fator determinante para este resultado de peso corporal encontrado, o comprimento tibial (**Gráfico 3**) e o comprimento céfalo-caudal (dados não mostrados) foram mensurados. Não sendo observado mudanças significativas, os dados indicam que não houve comprometimento do crescimento dos animais DHC em função da ingestão da dieta hipercalórica. Estudo de Demigné e colaboradores (2006) mostra que, em camundongos da linhagem OF1 alimentados com uma dieta “high fat” não existe diferença no comprimento cauda-nariz destes animais em relação ao controle. Estes dados corroboram com os nossos achados, apesar de tratar-se de outra raça de camundongos. Além disso, apesar da dieta hipercalórica, utilizada no presente estudo, ser rica em gordura, esta é composta de micro e macronutrientes essenciais para o crescimento e manutenção das necessidades diárias, o que, de fato, contribuiu para o crescimento normal dos animais jovens e manutenção nos animais

idosos. Sendo assim, os dados relativo ao peso corporal indicam que o envelhecimento acentua os efeitos metabólicos da dieta hipercalórica no parâmetro obesidade.

O tratamento em grupos separados com o tempol e com a apocinina não alterou o padrão de ingestão dietética, o comprimento tibial e o céfalo-caudal, bem como não houve modificações no ganho de peso corporal, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos hipercalóricos farmacologicamente tratados (DHC-Tempol, DHC-Apocinina) e o grupo controle para este (DHC). Estes dados indicam que o aumento na atividade da NADPH oxidase e a elevada concentração de ânion superóxido não estão envolvidos na modulação destes parâmetros, em decorrência do consumo de dieta hipercalórica.

Os resultados encontrados no presente estudo possibilita a investigação dos diferentes fenótipos de SMet encontrados em humanos, isto é, a presença de alterações metabólicas sem necessariamente apresentar obesidade corporal, mas apenas a descrita como obesidade visceral e corrobora com o fato de que vários componentes da SMet podem ter origem a partir do aumento da adiposidade visceral (FONSECA, 2008).

A escolha da raça isogênica C57BL/6 decorreu, principalmente, devido à susceptibilidade a intervenção dietética e a pureza gênica destes animais, além de ser uma das raças mais utilizadas (COLLINS et al., 2004). Entretanto, animais isogênicos podem carregar mutações cujo efeito possa não ser adequado para determinadas pesquisas (HARPER, 2008). Poderia se pensar, no presente estudo, que a obesidade corporal não desenvolvida pelos animais jovens após ingesta de dieta hipercalórica estaria relacionada a questão da isogenicidade, porém, características inerentes a dieta hipercalórica utilizada podem estar mais diretamente envolvida, assim como a questão da idade de exposição a esta dieta, no aparecimento do fenótipo de obesidade corporal.

Os dados glicêmicos no estado de jejum (**Gráfico 4**) mostram que, quando alimentados com dieta hipercalórica, os animais apresentaram níveis significativamente elevados em comparação àqueles que receberam a dieta “chow”, tanto no grupo de animais jovens quanto no grupo idoso, indicando que, de fato, a ingestão de uma dieta hipercalórica por 14 semanas altera a homeostase da glicose (SONE e KAGAWA, 2005), possivelmente pelo aumento da deposição de gordura e, conseqüentemente, redução do transporte de glicose para o interior celular em decorrência da maior liberação de ácidos graxos para o meio

sistêmico (CONSITT et al., 2009). Nossos achados também assemelham-se aos de Molnar e colaboradores (2005), que mostram elevados níveis de glicose de jejum e forte intolerância a glicose em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta “high fat”.

Após o tratamento farmacológico com o tempol e a apocina, não foram observadas melhoras significativas na hiperglicemia de jejum daqueles animais alimentados com dieta hipercalórica, tanto jovens quanto idosos, indicando que o aumento na atividade da NADPH oxidase e a elevada concentração de ânion superóxido não estão envolvidos diretamente na manutenção da hiperglicemia, em decorrência do consumo de dieta hipercalórica por 14 semanas.

Ao final da 14ª semana de intervenção, os animais (jovens e idosos) alimentados com dieta hipercalórica se apresentaram intolerantes à glicose. No entanto, o tratamento com o tempol (no grupo idoso) e a apocinina (em ambos os grupos, jovens e idosos) melhorou de forma significativa a tolerância à glicose após o desafio glicêmico. O perfil das curvas glicêmicas apresenta um claro e significativo decaimento em função do tempo em ambos os grupos farmacologicamente tratados, quando comparados com o grupo DHC (**Gráfico 5**).

É sabido que o principal fator que contribui para o processo do envelhecimento e o aparecimento mais precoce de doenças metabólicas é o estresse oxidativo, e que esta condição acentua os efeitos metabólicos e vasculares da dieta “high-fat” (COLLINS et al., 2009; GUPTE et al., 2010). Sendo assim, a junção destes dois fatores, a idade avançada e a utilização de uma dieta hipercalórica, realizado no presente estudo, contribuiu para acentuar a produção de espécies reativas, como o ânion radical superóxido, que, por sua vez, pode contribuir diretamente para o aparecimento e/ou manutenção da intolerância à glicose nestes animais. Como o tempol atua como sequestrador de ânion superóxido (BANDAY et al., 2005), é possível que a utilização deste agente farmacológico no modelo idoso utilizado no presente estudo possa ter contribuído para a diminuição destas espécies reativas e, com isso, a melhora na tolerância à glicose destes animais foi visualizada, como mostram os resultados (**Gráfico 5B**). No entanto, nos animais jovens, o fato de o tratamento com o tempol não culminar nos resultados semelhantes aqueles observados nos idosos, apontam para o fato de que outras espécies reativas, que não apenas o ânion radical superóxido, possam estar também envolvidas com a intolerância à glicose neste modelo.

Por outro lado, os resultados referentes aos grupos jovens e idosos tratados com a apocinina, um inibidor da NADPHox, e sendo este complexo enzimático uma das principais fontes de ânion radical superóxido (DUSTING et al., 2005; RABÊLO et al., 2010), sugere-se que é possível que o aumento na atividade deste possa estar envolvido nos mecanismos associados ao perfil glicêmico patogênico observado neste modelo dietético de SMet, tanto em animais jovens como idosos. E, que em animais jovens, a elevada concentração de ânion radical superóxido, decorrente deste possível aumento na atividade da NADPHox, esteja sendo direcionado para formação de outras espécies reativas, como o peroxinitrito (CERIELLO, 2005), que por sua vez pode estar mais diretamente envolvido na intolerância à glicose neste modelo jovem.

Ao final do tratamento dietético e da intervenção farmacológica, os animais jovens alimentados com dieta hipercalórica não se mostraram resistentes à insulina. Entretanto, os animais idosos apresentaram uma sensibilidade à insulina diminuída, observada pela menor intensidade de decaimento da curva concentração-glicose em função do tempo quando comparados aos animais que receberam dieta “chow” (**Gráfico 6**). A RI, na maioria dos casos, ocorre por defeitos pós-receptor na sinalização insulínica. Estes eventos envolvem vários mecanismos que incluem a deficiência na fosforilação do receptor da insulina, na PI3-quinase, alterações na função dos transportadores de glicose e outros (WILCOX, 2005; CHOI e KIM, 2010). Contudo, a diminuição na síntese e/ou liberação de insulina pelas células pancreáticas pode acontecer, em casos como o uso prolongado de dietas “high-fat” e a idade avançada, e desta forma contribuir com o quadro hiperglicêmico característico do diabetes (SONE e KAGAWA, 2005; HASEGAWA et al., 2010).

Uma vez que o quadro de intolerância à glicose esteja presente, é provável que algum ponto da sinalização insulínica, desde a síntese até a ação propriamente dita, esteja alterado. Sendo assim, a avaliação da resistência à insulina irá indicar a possível causa. Nesse sentido, a normalidade das curvas de glicose em função do tempo no teste insulínico, observada no presente estudo para os animais jovens alimentados com dieta hipercalórica, indica que o acoplamento insulina exógena-receptor aconteceu e na sequência a cascata de sinalização insulínica, culminando na captação de glicose pelas células, sugerindo, dessa forma, que a alteração pode estar na menor síntese e/ou liberação da insulina endógena pelas células pancreáticas. O estudo de Sone e Kagawa (2005) mostra uma liberação de insulina insuficiente em animais alimentados por um longo período de tempo com dieta “high-fat” e

os autores associam isso à senescência das células β -pancreáticas. Segundo os autores, este evento foi, provavelmente, provocado pela ingestão de dieta “high-fat”. Este mecanismo pode estar implicado ao observado no presente estudo em relação aos animais jovens. Contudo, outras abordagens precisam ser realizadas para averiguar as causas e confirmar tais suspeitas em estudos subsequentes.

A RI apresentada pelos animais idosos alimentados com a dieta hipercalórica, utilizada no presente estudo, foi atenuada após tratamento com ambos os fármacos utilizados na intervenção, o tempol e a apocinina. Estes efeitos podem ser observados a partir da análise da curva temporal de decaimento representativa dos níveis glicêmicos. Estes dados sugerem, mais uma vez, uma possível participação da concentração elevada de ânions radicais superóxidos, provavelmente, decorrentes de aumento da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase sistêmico no perfil glicêmico patogênico destes animais idosos. Estes dados são reforçados pela não observação de uma diferença estatisticamente significativa na atividade hepática total da SOD, o que leva a se pensar que a atividade desta enzima esteja sendo direcionada para o meio sistêmico em função da possível elevada concentração de ânions radicais superóxidos. Neste contexto, devido à inexistência de um luminômetro na nossa Instituição e a necessidade da obtenção de ensaios em tecidos não congelados, a atividade do complexo NADPH oxidase ainda não pode ser avaliada nestes animais. Somando-se as observações anteriores, o tempol melhora a sensibilidade insulínica pela diminuição do estresse oxidativo em ratos obesos, melhorando assim a captação de glicose estimulada pela insulina (BANDAY et al., 2005).

Independente do ganho de peso corporal, pelo consumo da dieta hipercalórica por 14 semanas, o acúmulo de gordura visceral foi marcante em ambos os grupos, jovens e idosos (**Gráfico 7 e Figura 10**). Entretanto, foi significativamente maior nos animais idosos alimentados com dieta hipercalórica comparados aos animais jovens alimentados com a mesma dieta (comparações estatísticas não mostradas, mas podem ser visualizadas qualitativamente na **Figura 10**). Sob este aspecto, os dados atentam para uma possível relação da idade com o grau de obesidade e a deposição de gordura, em função do consumo de dieta hipercalórica por 14 semanas. Além disso, sugere uma especial participação desta adiposidade visceral nas demais alterações observadas neste modelo, como a hiperglicemia de jejum, o infiltrado gorduroso hepático (mais intenso nos animais idosos).

O balanço redox é necessário para a regulação de vários mecanismos fisiológicos centrais. Entretanto, na maioria dos eventos celulares, níveis elevados de espécies reativas, devido à homeostase celular redox alterada, são citotóxicos e reagem com vários alvos intracelulares, causando danos às células (WEYDERT e CULLEN, 2009). Neste sentido, diversos estudos mostram uma perda tecidual e celular em diferentes situações patogênicas (SONE e KAGAWA, 2005; DENG-BRYANT et al., 2008; GRIFFIN et al., 2008). Sendo assim, é interessante ressaltar a perda tecidual associada ao consumo de dietas “high-fat”, uma vez que estas causam um estresse oxidativo e, desta forma, contribuem para o processo de senescência celular e o aparecimento de outras disfunções metabólicas associadas ao consumo por longo tempo.

A dieta hipercalórica, utilizada no presente estudo, induziu perda tecidual em alguns órgãos, avaliada pelo peso relativo, nos animais alimentados com a mesma durante um período de 14 semanas. De acordo com os dados obtidos, nota-se perda nos tecidos cardíaco, renal, hepático e intestinal nos animais jovens alimentados com a dieta hipercalórica quando comparados aos animais alimentados com dieta “chow” (**Tabela 3 e Gráfico 8**). Nos animais idosos, a perda tecidual induzida pela dieta hipercalórica foi ampla e ocorreu nos tecidos cardíaco, pulmonar, renal, muscular, intestinal e hepático (**Tabela 4 e Gráfico 8**). A peroxidação lipídica hepática, induzida pela dieta hipercalórica utilizada no presente estudo, pode estar envolvida diretamente na perda tecidual deste órgão, uma vez que os produtos de peroxidação lipídica são citotóxicos e altamente reativos, podendo reagir com biomoléculas e, desta forma, contribuir para a injúria tecidual (BROWNING & HORTON, 2004; STEWART et al., 2009). Possivelmente, a peroxidação lipídica também esteja presente nos demais órgãos e participe da perda tecidual, entretanto, isso não foi verificado para comprovação.

Estudos mostram que agentes antioxidantes como o tempol e a apocinina exerçam uma ação protetora sobre tecidos específicos, em consequência da diminuição de agentes oxidantes (DENG-BRYANT et al., 2008; STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008; WILCOX, 2010). Os resultados do presente trabalho, para os animais jovens, mostram uma possível ação protetora da apocinina sobre o tecido hepático, pois o peso relativo deste órgão para o grupo DHC apocinina foi significativamente maior que o DHC sem tratamento (**Gráfico 8**). Os dados sugerem que a perda tecidual hepática induzida pela dieta hipercalórica possa ser, provavelmente, advinda do possível aumento da atividade da enzima NADPH oxidase e

consequente, do aumento na produção de ânions superóxidos. Contudo, estudos mais aprofundados devem ser efetuados para averiguar os mecanismos pelos quais a dieta “high-fat” utilizada no presente estudo induziu a perda tecidual.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que neste mesmo modelo animal, porém em animais jovens alimentados com a dieta hipercalórica por um período de 26 semanas, os níveis de TG, COL, VLDL e peroxidação lipídica, tanto sistêmico quanto hepático, foram significativamente mais elevados no grupo alimentado com a dieta hipercalórica comparado àquele alimentado com dieta “chow”. No presente estudo, onde a exposição à dieta hipercalórica foi por um período de 14 semanas, alterações lipídicas plasmáticas significativamente elevadas foram observadas apenas para colesterol, para jovens e idosos (**Tabela 5 e 6**, respectivamente). No que se refere à ausência de alterações significativas para os demais parâmetros do perfil lipídico plasmático observado no presente trabalho, estudo de Dobrian e colaboradores (2000) mostra que os níveis de glicemia e de lipídios plasmáticos apresentam, até certo ponto, relação direta com o tempo de exposição a dieta “high-fat” e com o ganho de peso corporal durante a exposição. Sob este aspecto, os resultados aqui apresentados sugerem que o início das alterações lipídicas possa estar relacionado com o tempo de exposição à dieta, sendo necessário um período de exposição superior a 14 semanas para que tais alterações apareçam de forma significativa. Nesse sentido, estudo de Sone e Kagawa (2005) mostra elevados níveis de triglicerídeos e colesterol total em animais alimentados com dieta “high fat”, que adquiriram obesidade corporal, por um período de 16 semanas.

No que concerne às avaliações plasmáticas de marcadores de lesão hepática, os dados apontam para atividade da AST e a razão AST/ALT significativamente mais elevados nos animais idosos DHC comparado ao CT, não sendo observado o mesmo para os animais jovens (**Gráfico 9**). Nossos achados para os animais jovens diferem dos de Fraulob e colaboradores (2010) que observaram aumento significativo na atividade da AST e ALT em camundongos jovens expostos a dieta hipercalórica. Acredita-se que isto possa ser devido à obesidade desenvolvida pelos camundongos, diferentemente dos animais jovens do presente estudo que se apresentam como modelo de SMet sem obesidade corporal, e semelhante aos animais idosos que apresentam este parâmetro. Este fator pode estar envolvido no aumento do grau de infiltração gordurosa hepática e no comprometimento das funções do órgão.

A enzima AST apesar de menos específica que a ALT, é altamente sensível e níveis plasmáticos elevados são indicativos de morte celular e lesão grave. Além disso, elevação na razão AST/ALT indica grau de comprometimento hepático mais elevado. Sendo assim, os dados atentam para um comprometimento hepático mais acentuado para os animais idosos, possivelmente pela maior susceptibilidade às alterações advindas da exposição ao elevado teor gorduroso proveniente da dieta hipercalórica, bem como pela obesidade corporal desenvolvida por estes, fator que pode estar envolvido no comprometimento hepático.

Acerca dos demais marcadores plasmáticos hepáticos avaliados, não foram detectadas mudanças significativas, tanto nos animais jovens quanto nos idosos (**Tabela 7 e 8**, respectivamente), demonstrando que a síntese protéica foi prioritariamente mantida já que o fígado é o principal sítio deste anabolismo e que não ocorreu lesão significativa no trato biliar pelo consumo de dieta hipercalórica. Contudo, ressalta-se que alterações nas enzimas hepáticas nem sempre são detectadas em pacientes com diagnóstico de DHGNA (VIDELA et al., 2004), o que não descarta a possibilidade de alterações hepáticas advindas do consumo de dieta hipercalórica, sob o ponto de vista apenas destes marcadores. Somando-se a isto, Guedes (2009) observou elevada atividade plasmática para ALT, AST e ALP em camundongos alimentados com dieta hipercalórica por 26 semanas, sugerindo que o tempo de exposição à dieta hipercalórica pode estar relacionado com a detecção de mudança na atividade destas enzimas.

Os dados referentes aos parâmetros supracitados para os grupos tratados com o tempol e com a apocinina não diferiram daqueles sem tratamento farmacológico, mostrando que as vias investigadas no presente estudo não participam diretamente na modulação destes parâmetros. Entretanto, apesar da atividade da ALT não está significativamente mais elevada no grupo DHC jovem comparado ao CT, observa-se uma diminuição significativa desta quando tratados com o tempol, contudo os valores continuam dentro da faixa de valores encontrados para os animais CT.

Como já visto em estudos anteriores realizados por nosso grupo (GUEDES, 2009; SOUZA, 2009) esta dieta hipercalórica induz a um comprometimento no balanço redox e peroxidação lipídica (tanto hepático quanto sistêmico) quando utilizadas por 26 semanas. A literatura também aponta a utilização de dietas “high-fat” no aparecimento das complicações supracitadas (VIDELA et al., 2004; UCHIYAMA et al., 2006; MARTINS et al. 2010).

No presente estudo, onde o tempo de exposição à dieta foi de 14 semanas, uma elevada peroxidação lipídica hepática foi observada nos animais jovens e idosos expostos à dieta hipercalórica, indicando, provavelmente, uma alteração redox local (**Gráfico 10**). Contudo, esta possível alteração redox não envolve modificação na atividade hepática das enzimas antioxidantes avaliadas no presente estudo (SOD e CAT – **Gráficos 11 e 12**, respectivamente), uma vez que não diferiram entre os animais alimentados com dieta hipercalórica comparado aos que ingeriram dieta “chow”. Esses dados sugerem que a concentração das espécies reativas alvo destas enzimas (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente) possa não estar elevada o suficiente para alterar a capacidade antioxidante destas, o peróxido de hidrogênio pode também está sofrendo a ação da GPx, ou estas espécies possam estar sendo direcionadas para reações de formação de outras espécies reativas como o peroxinitrito, produto da reação do $\cdot\text{O}_2^-$ com o $\cdot\text{NO}$, sendo possível a participação do peroxinitrito, uma vez que este pode dar início ao processo de peroxidação lipídica (LEOPOLD e LOSCALZO, 2009).

O tratamento farmacológico com o tempol e com a apocinina não interferiu no grau de peroxidação lipídica hepática induzida pela dieta hipercalórica. Esses dados sugerem que o possível aumento da atividade da NADPHox e consequente aumento de ânion superóxido não contribuíram para a indução direta da peroxidação lipídica, uma vez que o tempol é um sequestrador de ânion superóxido e a apocinina um inibidor da NADPHox. Sendo assim, outra fonte e outro tipo de espécie reativa podem estar relacionados com o aparecimento desta. Nesse contexto, outras espécies como o radical tirosil (gerado pela mieloperoxidase) (SAVENKOVA et al.,1994), o peroxinitrito (produto da reação do $\cdot\text{O}_2^-$ com o $\cdot\text{NO}$) e o peróxido de hidrogênio (produto da dismutação de $\cdot\text{O}_2^-$ pela SOD) (LEOPOLD e LOSCALZO, 2009) podem dar início ao processo de peroxidação lipídica. Contudo, outras abordagens precisam ser realizadas para averiguar essas outras fontes. Os produtos gerados no processo de peroxidação lipídica também atuam como agentes reativos e causam reações de dano celular (amplificando, desta forma, os efeitos do estresse oxidativo). Além disso, induzem inflamação, através da indução de citocinas inflamatórias, e fibrose, pela ativação de células estreladas hepáticas, as quais sintetizam colágeno (BROWNING & HORTON, 2004).

Videla e colaboradores (2004) mostraram a correlação do estresse oxidativo plasmático e hepático com achados clínicos e histológicos em pacientes com DHGNA. Os

resultados do estudo demonstraram que o estresse oxidativo está desenvolvido no fígado de pacientes com esteatose e essa situação é agravada ainda mais em pacientes com esteatohepatite, em decorrência da diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidante total no plasma, bem como pelo aumento da concentração de citocromo P-450. Estes dados reafirmam a participação do estresse oxidativo na progressão das DHGNA em humanos e, sob este aspecto, o presente estudo atenta para uma possível participação do estresse oxidativo, advindo do consumo de dieta hipercalórica, no aparecimento de esteatohepatite em camundongos.

A ativação dos caminhos alternativos de oxidação dos ácidos graxos, quando a capacidade de oxidação via mitocondrial se torna prejudicada, resulta na formação adicional de espécies reativas, as quais também contribuem diretamente para o aparecimento da peroxidação lipídica (BROWNING e HORTON, 2004). Assim, o aumento da captação e acúmulo de ácidos graxos no fígado, decorrente da elevada liberação destes pelo tecido adiposo, contribui para o aumento da produção de espécies reativas. Nesse contexto, a elevada adiposidade visceral, observada nos animais alimentados com uma dieta hipercalórica no presente estudo, sugere uma participação direta dos ácidos graxos provenientes desta adiposidade visceral no acúmulo de gordura no fígado e o desencadeamento da peroxidação lipídica hepática, tanto nos jovens quanto nos idosos.

Os dados também indicam que, dependendo do tempo de exposição a dieta hipercalórica, a peroxidação lipídica antecede elevações plasmáticas na atividade de enzimas de avaliação hepática. Uma vez que elevações plasmáticas significativas na atividade destas enzimas são detectadas após lesão e morte celular hepática e os produtos de peroxidação lipídica podem causar danos celulares, contribuindo para a progressão da DHGNA, isto sugere que a avaliação da peroxidação lipídica possa ser um meio de diagnóstico precoce.

A despeito da quantificação do conteúdo lipídico total hepático vinculada à exposição à dieta hipercalórica, utilizada no presente estudo, observa-se, nos animais idosos, mas não nos jovens, um aumento significativo comparado ao grupo CT (**Gráfico 13**). Além disso, elevação significativa dos níveis de TG, COL e VLDL hepático também foi observada (**Gráfico 14**). Os dados sugerem que tais alterações também possam estar relacionadas com a idade de exposição a esta dieta hipercalórica, isto é, quanto mais avançada à idade, maior a probabilidade de aparecimento de alterações no metabolismo lipídico hepático, provavelmente devido a maior susceptibilidade em acumular gordura tanto corporal quanto

visceral, como observado nos animais idosos do presente estudo, e na sequência a maior captação de gordura pelo fígado, qualificada nas fotomicrografias dos cortes histológicos hepáticos destes animais.

Nos cortes histológicos hepáticos dos animais jovens, alimentados com dieta hipercalórica (**Figura 11B-C**), é possível visualizar a presença de micro e macrovacúolos de gordura, apesar do conteúdo lipídico total quantificado não ter sido estatisticamente diferente entre este grupo e o grupo CT. Por outro lado, a dieta hipercalórica, quando consumida por animais em idade avançada, causou um acúmulo mais acentuado de gordura hepática, observado pela intensa presença de micro e macrovacúolos de gordura nos cortes histológicos destes animais (**Figura 12C**) e pelo elevado conteúdo lipídico total, além do elevado nível de TG, COL e VLDL.

Os resultados supracitados sugerem que este acúmulo de gordura hepática tenha participação direta no elevado índice de peroxidação lipídica observado nestes animais. Além disso, o grau de acúmulo de gordura e o comprometimento celular hepático, consequente ao consumo de dieta hipercalórica por 14 semanas, parece estar relacionado com a idade, uma vez que, os animais idosos além de apresentarem um acúmulo de gordura hepática (qualitativamente visualizados pelos cortes histológicos do fígado) mais intenso que os jovens, também apresentaram atividade plasmática elevada da enzima AST, um marcador de lesão hepatocelular mitocondrial. Corroborando com nossos achados histológicos, diversos estudos mostram o acúmulo de gordura hepática pelo consumo de dieta hipercalórica (GUEDES, 2009; FRAULOB et al., 2010; MARQUES et al., 2010; GUPTA et al., 2010).

Na análise qualitativa dos cortes histológicos dos animais alimentados com dieta hipercalórica, é possível também observar a presença de aglomerados inflamatórios e provavelmente fibrose, possivelmente pela deposição de matriz entre as células o que aumenta a distância entre elas, caracterizando, desta forma, a indução de esteatohepatite pelo consumo desta dieta por 14 semanas. Sugere-se que é possível que no presente estudo, os produtos de peroxidação lipídica e o estresse oxidativo local tenham induzido esta inflamação pela indução de citocinas inflamatórias e ação direta destes sobre as células.

Nos animais jovens e idosos tratados com o tempol e com a apocinina, a análise qualitativa dos cortes histológicos indica uma presença menos acentuada de microvacúolos e macrovacúolos de gordura. Estes dados sugerem que a inibição da atividade da NADPHox

pela apocinina e a captação das partículas de ânions superóxidos pelo tempol, de alguma forma diminuíram a captação de ácidos graxos pelo fígado durante o tratamento crônico concomitante com o consumo de dieta hipercalórica. É possível que a melhora da tolerância à glicose nos animais jovens, bem como da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina nos animais idosos, causada pelo tratamento com os fármacos supracitados, tenha causado a diminuição da liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, provavelmente pela supressão da lipólise mediada pela insulina, e, conseqüentemente, diminuído a captação hepática destes.

Os dados histológicos obtidos também indicam que o estado redox normal hepático possa estar alterado, possivelmente pelo aumento na atividade da NADPH oxidase e elevada produção de ânions superóxidos, e na sequência está contribuindo com o acúmulo de gordura hepática. Uchiyama e colaboradores (2006) sugerem, em seus estudos, que o estresse oxidativo acentua o acúmulo de gordura hepática pela secreção de lipoproteína prejudicada devido à degradação de apolipoproteína B no fígado. E esse processo de degradação é causado pela peroxidação lipídica (PAN et al., 2004; BROWNING & HORTON, 2004).

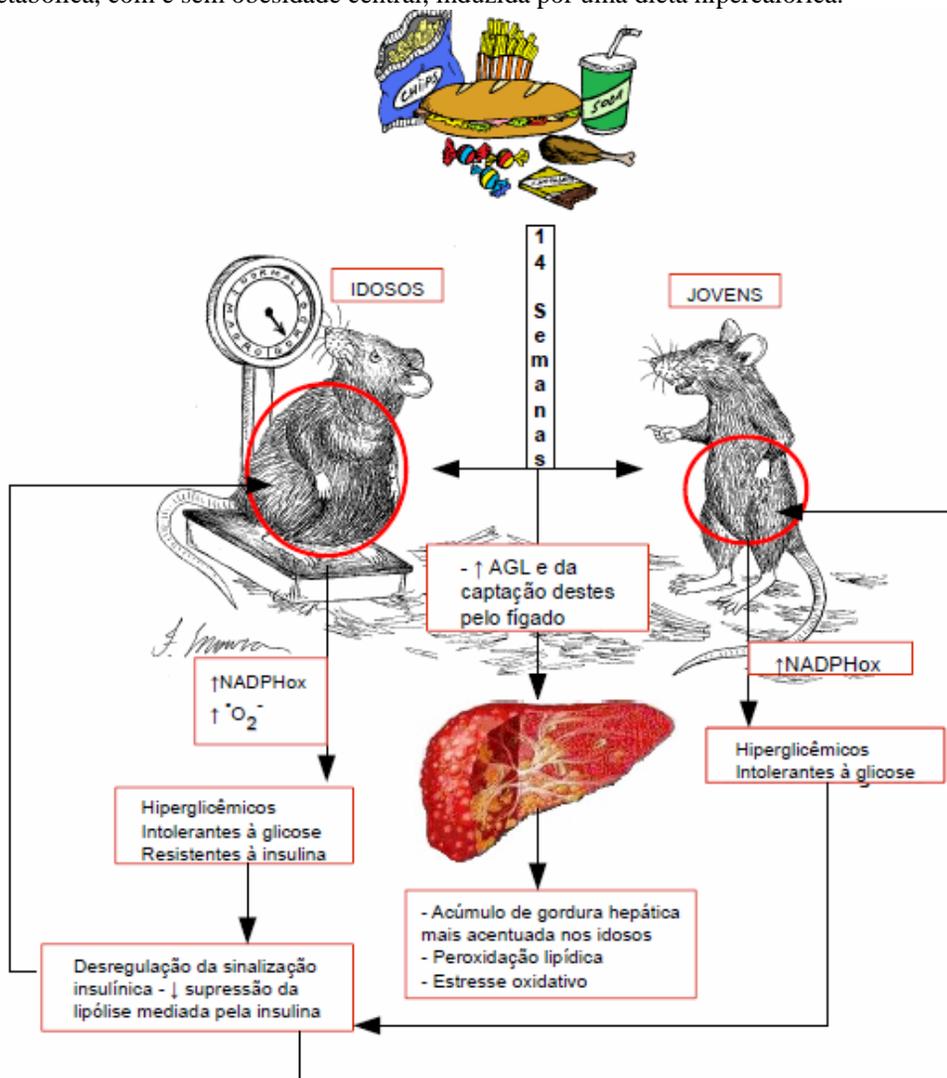
Nesse sentido, a elevada peroxidação lipídica hepática, observada no presente estudo, pode ter contribuído diretamente para a inibição da liberação hepática de lipoproteína para o meio sistêmico, corroborando com os resultados encontrados para a concentração de VLDL sistêmica, a qual não diferiu significativamente entre o grupo DHC e CT, tanto jovem quanto idoso. Somando-se, Furukawa e colaboradores (2004) demonstraram que, em camundongos obesos, o tratamento com apocinina melhorou o diabetes, a hiperlipidemia e a esteatose hepática, sugerindo que a apocinina possa desenvolver um papel protetor na progressão das DHGNA.

Os aglomerados inflamatórios ainda foram visualizados histologicamente no grupo jovem tratado com o tempol e nos grupos idosos tratado com este agente e com a apocinina. Essa inflamação pode ser consequência direta tanto dos produtos da peroxidação lipídica e/ou outros tipos de espécies reativas que não o ânion superóxido, quanto pela indução de citocinas inflamatórias (BROWNING & HORTON, 2004).

Tomados em conjunto, os dados encontrados no presente estudo demonstram que a ingestão de dieta hipercalórica, por 14 semanas, induz alterações metabólicas e DHGNA, tanto em animais jovens quanto em animais idosos, obtendo-se assim um modelo animal que

possibilita a investigação dos diferentes fenótipos para a SMet encontrados em humanos, ou seja, aqueles que apresentam obesidade corporal e aqueles que apresentam apenas a obesidade visceral como ponto central para o aparecimento das demais alterações relacionadas à SMet. Sob este aspecto, os dados atentam para uma possível relação da idade que esta dieta hipercalórica é exposta, com o grau de obesidade e a deposição de gordura visceral. Além disso, esta última pode ter participado de forma especial no aparecimento da hiperglicemia e também no acúmulo de gordura hepática, uma vez que os ácidos graxos livres são captados pelo fígado, culminando no aparecimento de DHGNA. Os dados obtidos também indicam para o fato de que é possível que a dieta hipercalórica tenha induzido o estresse oxidativo, tanto sistêmico quanto hepático, e, juntos, podem ter contribuído para o aparecimento e manutenção da DHGNA via desregulação da sinalização insulínica, tanto nos jovens quanto nos idosos. Nesse sentido, o estresse oxidativo configura-se como um alvo merecedor, assim como a obesidade e a RI, de atenção especial dentro dos mecanismos implicados na SMet e na DHGNA. A **Figura 13** mostra um esquema dos possíveis mecanismos a partir dos resultados obtidos neste estudo.

Figura 13 – Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações observadas no modelo de síndrome metabólica, com e sem obesidade central, induzida por uma dieta hipercalórica.



A ingestão de dieta hipercalórica por 14 semanas induz obesidade corporal em animais idosos, mas não em animais jovens. Entretanto, independente da idade, a dieta induz obesidade visceral, mais acentuada nos animais idosos. A dieta hipercalórica induz alterações metabólicas glicêmicas e na sinalização insulínica, provavelmente desencadeada pelo aumento na atividade da NADPHox e O_2^- , bem como pelo aumento da liberação dos ácidos graxos livres (AGL) pelo tecido adiposo. A desregulação da sinalização insulínica, por sua vez, leva a menor supressão da lipólise no tecido adiposo mediada pela insulina, favorecendo a maior liberação de AGL para a corrente sistêmica. Os AGL são então captados pelo fígado culminando, desta forma, no aparecimento de DHGNA, caracterizada pelo acúmulo de gordura e inflamação, conseqüente da peroxidação lipídica e possivelmente do estresse oxidativo local. **Fonte:** Flávio Moura Rezende (ilustrador) e Valéria Nunes de Souza (diagramação).

7 CONCLUSÕES

- O ganho de peso corporal observado nos animais idosos, mas não nos animais jovens, após consumo de dieta hipercalórica por 14 semanas, indica que o envelhecimento acentua os efeitos metabólicos associados à dieta hipercalórica;
- A hiperglicemia de jejum e a intolerância à glicose dos animais jovens com SMet não foi modificada após tratamento com o tempol, indicando que outras espécies reativas, que não o $\cdot\text{O}_2^-$, possam estar envolvidas mais diretamente. Entretanto, a apocinina foi capaz de atenuar a intolerância à glicose, indicando que possivelmente o aumento na atividade da NADPH oxidase possa estar envolvido e o estresse oxidativo sistêmico possivelmente esteja presente neste modelo animal;
- O tempol e a apocinina atenuaram a intolerância à glicose e a resistência à insulina dos animais idosos, sugerindo que possivelmente o aumento na atividade da NADPH oxidase e na concentração de ânions superóxidos possam estar envolvidos nos mecanismos associados ao perfil glicêmico patogênico, bem como o estresse oxidativo possivelmente esteja presente neste modelo dietético para a SMet;
- O nível de alterações lipídicas plasmáticas induzidas pela dieta hipercalórica indica uma possível associação com o tempo de exposição a esta. Assim como as alterações lipídicas hepáticas podem estar associadas tanto ao tempo de exposição quanto a idade em que se é exposto a esta;
- Os dados de acúmulo de gordura visceral e de perda tecidual observada nos animais, após ingestão de dieta hipercalórica por 14 semanas, apontam ser mais intensos nos idosos, indicando que, de fato, a idade intensifica os efeitos da ingestão de dieta hipercalórica e que a adiposidade visceral é um ponto central para o aparecimento das demais alterações como a hiperglicemia e o infiltrado gorduroso hepático no modelo dietético utilizado;
- O elevado grau de peroxidação lipídica hepática, mas não plasmática, observado nos animais jovens e idosos expostos à dieta hipercalórica por 14 semanas indica,

provavelmente, primeiro uma alteração redox local. Contudo, este evento não envolve modificação na atividade das enzimas SOD e CAT;

- O consumo de dieta hipercalórica por 14 semanas não alterou parâmetros plasmáticos de avaliação hepática nos animais jovens. No entanto, alterações foram observadas nos animais idosos, indicando que a dieta hipercalórica induz lesão hepática de grau mais elevado nos idosos;
- A esteatohepatite observada nos animais jovens e idosos com SMet foi, qualitativamente e quantitativamente, mais intensa nos idosos. O tempol e a apocinina diminuíram o acúmulo de gordura hepática qualitativa em ambos, mas não quantitativamente, indicando que o estado redox normal hepático possa estar alterado e participe contribuindo para o acúmulo de gordura hepática;
- Os dados apontam que é possível que a melhora do perfil glicêmico, causada pelo tratamento com a apocinina nos animais jovens e com o tempol e a apocinina nos animais idosos, tenha causado a diminuição da liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, via supressão da lipólise mediada pela melhora da sinalização insulínica, levando, conseqüentemente, a diminuição da captação e acúmulo hepático destes;
- O estresse oxidativo configura-se como um possível marcador precoce no modelo indicado. Além disso, pode ser um dos mecanismos implicados no aparecimento da SMet e da DHGNA.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, L.A.; ANGULO, P.; LINDOR, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease: **CMAJ**, 2005. 172-7p.

ADIELS, M.; OLOFSSON, S.O.; TASKINEN, M.R.; BORÉN, J. Diabetic dyslipidaemia. Current Opinion: **Lipidology**, 2006. 17:238-246p.

ADIELS, M.; OLOFSSON, S.; TASKINEN, M.; BORÉN, J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome: **Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology**, 2008. 28:1225-1236p.

AGUILAR-SALINAS, C.A; ROJAS, R.; GÓMEZ-PÉREZ, F.J.; VALLES, V.; RÍOS-TORRES, J.M.; FRANCO, A.; OLAIZ, G.; RULL, J.A.; SEPÚLVEDA, J. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico: **Arch Med Res.**, 2004. Jan-Feb;35(1):76-81p.

AIZAWA-ABE, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; EBIHARA, K.; SATOH, N.; IWAI, H.; MATSUOKA, N.; HAYASHI, T.; HOSODA, K.; INOUE, G.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension: **J Clin Invest.**, 2000. 105:1243-52p.

ALVAREZ, G.E.; BESKE, S.D.; BALLARD, T.P.; DAVY, K.P. Sympathetic neural activation in visceral obesity: **Circulation**, 2002. 106:2533-6p.

ARAYA, A.V. VALERA, J.M.; CONTRERAS, J.; CSENDES, A.; DÍAZ, J.C.; BURDILES, P.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; SMOK, G.; PONIACHIK, J. Alteraciones de la tolerância a la glucosa y frecuencia de síndrome metabólico em pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico: **Revista Médica de Chile**. 2006; 134:1092-1098p.

ATP III. Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III): **JAMA**, 2001. 285:2486-97p.

AVOGARO P, CREPALDI G, ENZI G, TIENGO A. Metabolic aspects of essential obesity. **Epatologia**. 1965; 11:226-238.

BANDAY, A.A.; MARWAHA, A.; TALLAM, L.S.; LOKHANDWALA, M.F. Tempol Reduces Oxidative Stress, Improves Insulin Sensitivity, Decreases Renal Dopamine D1 Receptor Hyperphosphorylation, and Restores D1 Receptor–G-Protein Coupling and Function in Obese Zucker Rats: **Diabetes**, 2005. 54:2219–2226p.

BARNES, L.A.; OPITZ, J.M.; GILBERT-BARNES, E. Obesity: genetic, molecular and environmental aspects: American Journal of Medical. **Genetics Part A**, 2007. 143:3016-3034p.

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V.V.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P.J.; POOSALA, S.; BECKER, K.G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K.W.; SPENCER, R.G.; LAKATTA, E.G.; LE COUTEUR, D.; SHAW, R.J.; NAVAS, P.N.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D.K.; CABO, R.; SINCLAIR, D.A.

Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet: **Nature**, 2006. 444:337-42p.

BELTOWSKI, J.; MÓJCICKA, G.; GORNY, D.; MARCINIAK, A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity: **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2000. 51(4): 883-896p.

BERTOLAMI, M.C. Alterações do metabolismo lipídico no paciente com síndrome metabólica: **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 2004. 14(4): 551-556p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: **Analytical Biochemistry**, 1976. 72:248-254p.

BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury: **The Journal of Clinical Investigation**, 2004. 114(2):147-152p.

CAI, H.; GRIENGLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases: **Trends in Pharmacological Sciences**, 2003. 24(9): 471-478p.

CERIELLO, A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: Is it time to treat? **Diabetes**, 2005; 54:1-7p.

CHATTERJEE, T.K.; STOLL, L.L.; DENNING, G.M.; HARRELSON, A.; BLOMKALNS, A.L.; IDELMAN, G.; ROTHENBERG, F.G.; NELTNER, B.; MARTIN, S.A.R.; DICKSON, E.W.; RUDICH, S.; WEINTRAUB, N.L. Proinflammatory Phenotype of Perivascular Adipocytes Influence of High-Fat Feeding: **Circ Res.**, 2009. 104:541-549p.

CHOI, K.; KIM, Y.B. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes: **Korean J Intern Med.**, 2010. 25:119-129p.

COBBOLD, J.F.L.; ANSTEE, Q.M.; TAYLOR-ROBINSON, S.D. Symposium 5 (Joint Nutrition Society and BAPEN Symposium): Too many pies: metabolic competencies in obesity. The importance of fatty liver disease in clinical practice: **Proceedings of the Nutrition Society**, 2010. 1-10p.

COLLINS, S.; MARTIN, T.L.; SURWIT, R.S.; ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics: **Physiology & Behavior**, 2004. 81: 243-248p.

COLLINS, A.R.; LYON, C.J.; XIA, X.; LIU, J.Z.; TANGIRALA, R.K.; YIN, F.; BOYADJIAN, R.; BIKINEYEVA, A.; PRATICO, D.; HARRISON, D.G.; HSUEH, W.A. Age-Accelerated Atherosclerosis Correlates With Failure to Upregulate Antioxidant Genes: **Circ Res.**, 2009. 104:42-54p.

CONSITT, L.A.; BELL, J.A.; HOUMARD, J.A. Intramuscular Lipid Metabolism, Insulin Action and Obesity: **IUBMB Life**, 2009. 61(1): 47-55p.

COTRIM, H.P.; PARISE, E.R.; OLIVEIRA, C.P.; LEITE, N.; MARTINELLI, A.; GALIZZI, J.; SILVA, R.C.; MATTOS, A.; PEREIRA, L.; AMORIM, W.; IVANTE, C.; SOUZA, F.; COSTA, M.; MAIA, L.; PESSOA, M.; OLIVEIR, F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile: **Ann Hepatol.**, 2011. 10(1):33-37p.

DAI, D.F.; RABINOVITCH, P.S. Cardiac Aging in Mice and Humans: the Role of Mitochondrial Oxidative Stress: **Trends Cardiovasc Med.**, 2009.19(7): 213-220p.

DAY, C.P.; JAMES, O. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, 1998.114:842–845p.

DEFRONZO, R.A. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin: **Diabetes**, 1979. 28:1095-101p.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: **Med. Clin. North Am.**, 2004. 88: 787-835p.

DEMIGNÉ, C.; BLOCH-FAURE, M.; PICARD, N.; SABBOH, H.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; GEOFFROY, V.; GASTON, A.T.; NICOLETTI, A.; HAGÈGE, A.; MÉNARD, J.; MENETON, P. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis: **European Journal of Nutrition**, 2006. 45(5):298-306p.

DENG-BRYANT, Y.; SINGH, I.N.; CARRICO, K.M.; HALL, E.D. Neuroprotective effects of tempol, a catalytic scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, in a mouse traumatic brain injury model: **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.**, 2008. 28:1114–1126p.

DIEDERICH, D.; SKOPEC, J.; DIEDERICH, A.; FU-XIANG, D. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals: **American Journal of Physiology**, 1994. 35:1153-1161p.

DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2007. 58-62p.

I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNOSTICO E TRATAMENTO DA SINDROME METABÓLICA. **Arq Bras Cardiol**, 2005. 84(1):1-27p.

DOBRIAN, A.D.; DAVIES, M. J.; PREWITT, R.L.; LAUTERIO, T.J. Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity: **Hypertension**, 2000. 35:1009-1015p.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function: **Physiology Reviews**, 2002. 82:47-95p.

DUNCAN, E. R.; WALKER, S. J.; EZZAT, V.A.; WHEATCROFT, S.B.; LI, J.M.; SHAH, A.M.; EARNEY, M.T. Accelerated endothelial dysfunction in mild pre-diabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species: **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 2007. 293(5): 1311-1319p.

DUSTING, G.J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for Suppressing NADPH Oxidase in the Vascular Wall: **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2005. 100(Suppl.I): 97-103p.

ELIAS, C.F.; BITTENCOURT, J.C. Controle neuroendócrino do comportamento alimentar. In: Aires MM. Fisiologia. 3.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008; 361-374p.

FAZIO, S.; BABAIEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol 94: 4647-4652, 1997.

FELDSTEIN, A.E.; WERNEBURG, N.W.; CANBAY, A.; GUICCIARDI, M.E.; BRONK, S.F.; RYDZEWSKI, R.; BURGART, L.J.; GORES, G.J. Free Fatty Acids Promote Hepatic Lipotoxicity by Stimulating TNF- Expression via a Lysosomal Pathway: **Hepatology**, 2004. 40:185-194p.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M.; BROCH, M.; RICART, W.; CASAMITJANA, R.; GUTIERREZ, C.; VENDRELL, J.; RICHART, C. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance: **Diabetes**, 1998. 47:1757-62p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, 1957. 226:497-509p.

FONSECA, F.A.H. Síndrome metabólica sem obesidade central: mito ou realidade? **Rev Bras Hipertens.**, 2008. 15(3):168-169p.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; DIETZ, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey: **JAMA**, 2002. 287:356-9p.

FORD, E.S.; GILES, W.H. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions: **Diabetes Care**, 2003. 26: 575-581p.

FORSTERMANN, U.; NAKANE, M.; TRACEY, W.R.; POLLOCK, J.S. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system: **European Heart Journal**, 1993. 14 (Suppl D):10-15p.

FRAULOB, J.C.; OGG-DIAMANTINO, R.; SANTOS, C.F.; AGUILA, M.B.; LACERDA, C.A.M. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet: **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 2010. 46: 212-223p.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVI, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge: **Clinical Chemistry**, 1972. 18:499-502p.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome: **J Clin Invest** 2004; 114:1752-1761p.

GADJA, A.; PELLIZZON. M.A.; RICCI, M.R; ULMAN, E.A. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models: **Animal Lab News**, 2007.

GANG, H.; QIAO, Q.; TUOMILEHTO, J.; BALKAU, B.; BORCHJOHNSEN, K.; PYORALA, K. for the DECODE Study Group. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men in women: **Arch Intern Med.**, 2004. 164:1066-1076p.

GARCÍA, E.G.; ROMERO, M.L.; HORWITZ, M.K.; LUNA, M.T.T.; LEÓN, R.C.; VELÁZQUEZ, V.V.; CERVERA, S.B.; ROMO, A.J.C.; OROZCO, L.; FERNÁNDEZ, D.V.; PERALTA, M. R.; MELÉNDEZ, A.B.; CASTILLO, R.Z.; MORALES, J.S. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión: **Salud pública de México**, 2008. 50 (6):530-47p.

GASTALDELLI, A.; MIYAZAKI, Y.; PETTITI, M.; MATSUDA, M.; MAHANKALI, S.; SANTINI, E.; DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, A. Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes: **J Clin Endocrinol Metab.**, 2002. 87:5098-5103p.

GENTILE, C.L. E PAGLIASSOTTI, M.J. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: **J Nutr Biochem**, 2008. 19(9): 567-576p.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease: **Circ Res.**, 2000. 86:494-501p.

GRIFFIN, K. A.; KRAMER, H.; BIDANI, A. K. Adverse renal consequences of obesity.: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2008. 294: 685-696p.

GRUNDY, S.M.; BREWER JR, H.B.; CLEEMAN, J.I.; SMITH JR, S.C.; LENFANT, C. for the Conference Participants. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition: **Circulation**, 2004.109:433-438p.

GUEDES, G.S. **Estudo hepático de um modelo murino dietético para síndrome metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço redox.** [Dissertação de Mestrado] Maceió. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Alagoas; 2009.

GUICCIARDI, M.E.; DEUSSING, J.; MIYOSHI, H.; BRONK, S.F.; SVINGEN, P.A.; PETERS, C.; KAUFMANN, S.H.; GORES, G.J. Cathepsin B contributes to TNF- mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c: **J. Clin. Invest.**, 2000.106:1127-1137p.

GUPTA, A.A.; LIU, J.Z.; REN, Y.; MINZE, L.J.; WILES, J.R.; COLLINS, A.R.; LYON, C.J.; PRATICO, D.; FINEGOLD, M.J.; WONG, S.T.; WEBB, P.; BAXTER, J.D.; MOORE, D.D.; HSUEH, W.A. Rosiglitazone Attenuates Age- and Diet-Associated Nonalcoholic Steatohepatitis in Male Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice: **Hepatology**, 2010.1-11p.

HADDAD, Y.; VALLERAND, D.; BRAULT, A.; HADDAD, P.S. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis: **Oxford University Press**, 2009.

HAMILTON, C.A.; BROSNAN, M.J.; MCINTYRE, M.; GRAHAM, DOMINICZAK, A.F. Superoxide Excess in Hypertension and Aging A Common Cause of Endothelial Dysfunction: **Hypertension**, 2001. 37[part 2]:529-534p.

HARPER, J.M. Wild-derived mouse stocks: an underappreciated tool for aging research: **American Aging Association**, 2008. 30:135-145p.

HASEGAWA, G.; YAMASAKI, M.; KADONO, M.; TANAKA, M.; ASANO, M.; SENMARU, T.; KONDO, Y.; FUKUI, M.; OBAYASHI, H.; MARUYAMA, N.; NAKAMURA, N.; ISHIGAMI, A. Senescence Marker Protein-30/Gluconolactonase Deletion Worsens Glucose Tolerance through Impairment of Acute Insulin Secretion: **Endocrinology**, 2010.151: 529-536p.

HIGASHI, Y.; NOMA, K.; YOSHIZUMI, M.; KIHARA, Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: **Japanese Circulation Society**, 2009. 73(3): 411-418p.

HOROZ, M.; BOLUKBAS, C.; BOLUKBAS, F.F.; SABUNCU, T.; ASLAN, M.; SARIFAKIOGULLARI,S.; GUNAYDIN, N.; EREL, O. Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis: **BMC Gastroenterology**, 2005. 5(35):1-6p.

IDF. Alberti, K.G.; Zimmet, P.; Shaw, J. IDF Epidemiology task force consensus group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition: **Lancet.**, 2005. 366:1059-1062p.

JIMÉNEZ, M.V.; ESTEPA1, R.M.; CAMACHO, R.M.M.; ESTRADA, R.C.; LUNA, F.G.; GUITARTE, F.B. Endothelial dysfunction is related to insulin resistance and inflammatory biomarker levels in obese prepubertal children: **European Journal of Endocrinology**, 2007. 156497–502p.

KELLEY, D.E.; MCKOLANIS, T.M.; HEGAZI, R.A.F.; KULLER, L.H.; KALHAN, S.C. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance: **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2003. 285:906-916p.

KERN, P.A; DI GREGORIO, G.B.; LU, T.; RASSOULI, N.; RANGANATHAN, G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance and tumor necrosis factor-alpha expression: **Diabetes**, 2003 52:1779-1785p.

KOTRONEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome: **Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology**, 2007. 27:27-38p.

KOTRONEN, A.; WESTERBACKA, J.; BERGHOLM, R.; PIETILAINEN, K.H.; JARVINEN, H.Y. Liver Fat in the Metabolic Syndrome: **J Clin Endocrinol Metab.**, 2007. 92: 3490-3497p.

LAMON-FAVA, S.; WILSON, P.W.; SCHAEFER, E.J. Impact of Body Mass Index on Coronary Heart Disease Risk Factors in Men and Women. The Framingham Offspring Study: **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1996.16:1509-1515p.

LECLERCQ, I.A.; MORAIS, A.S.; SCHROYEN, B.; HUL, N.V.; GEERTS, A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences: **Journal of Hepatology**, 2007. 47:142-156p.

LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Oxidative Risk for Atherothrombotic Cardiovascular Disease: **Free Radic Biol Med.**, 2009. 47(12): 1673-1706p.

LI, W.; SHI, Y.H.; YANG, R.L.; CUI, J.; XIAO, Y.; WANG, B.; LE, G.W. Effect of somatostatin analog on high-fat diet-induced metabolic syndrome: Involvement of reactive oxygen species: **Peptides**, 2010. 3:625-629p.

LOPES, H.F. Síndrome Metabólica: Aspectos Históricos, prevalência, e morbidade e mortalidade: **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, 2004. 14:539-543p.

MANTENA, S.K.; KING, A.L.; ANDRINGA, K.K.; ECCLESTON, H.B.; BAILEY, S.M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases: **Free Radical Biology & Medicine**, 2008. 44:1259-1272p.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome: **Hepatology**, 2003. 37:917-923p.

MARIAPPAN, N.; ELKS, C.M.; FINK, B.; FRANCIS, J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction: **Free Radic Biol Med.**, 2009. 46(4):462-470p.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review: **J Biochemmolecular Toxicology**, 2003. 17(1): 24-38p.

MARQUES, C.M.M.; MOTTA, V.F.; TORRES, T.S. AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice: **Braz J Med Biol Res.**, 2010. 43(5):467-475p.

MARTINS, M.A.; CATTAPRETA, M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; ÁGUILA, M.B.; BRUNINI, T.C.M.; MENDES-RIBEIRO, A.C. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice: **Archives of Biochemistry and Biophysics** 2010.499:56-61p.

MATHIEU P, POIRIER P, PIBAROT P, LEMIEUX I, DESPRÉS JP. Visceral obesity: The link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension** 2009; 53: 577-584.

MEIJER, V.E.; LE, H.D.; MEISEL, J.A.; SHARIF, M.R.A.; PAN, A.; NOSÉ, V.; PUDER, M. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model: **Metabolism Clinical and Experimental**, 2010. 59:1092-1105p.

MOFRAD, P.; CONTOS, M.J.; HAQUE, M.; SARGEANT, C.; FISHER, R.A.; LUKETIC, V.A.; STERLING, R.K.; SHIFFMAN, M.L.; STRAVITZ, R.T.; SANYAL, A.J. Clinical and Histologic Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated With Normal ALT Values: **Hepatology**, 2003. 37:1286-1292p.

MOLNAR, J.; YU, S.; MZHAVIA, N.; PAU, C.; CHERESHNEV, I.; DANSKY, H.M. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice: **Circ. Res.**, 2005. 96:1178-1184p.

MUOIO, D.M.; NEWGARD, C.B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes: **Nature**, 2008. 9:193-205p.

MURAYAMA, H.; IKEMOTO, M.; HAMAOKI, M. Serum ornithine carbamyltransferase reflects hepatic damage in diabetic obese mice: **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2009. 25:413-419p.

NADRUZ JR., W.; FRANCHINI, K.G. Implicações cardiovasculares da síndrome metabólica importância da hiperinsulinemia na hipertrofia cardíaca e do vaso: **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 2004. 4:596-603p.

OH, J.Y.; HONG, Y.S.; SUNG, Y.A.; BARRETT-CONNOR E. Prevalence and factor analysis of metabolic syndrome in an urban Korean population: **Diabetes Care.**, 2004. Aug. 27(8):2027-32p.

OMS. Alberti, K.G.; Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation: **Diabetic Medicine**, 1998. 15:539-553p.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature**, 2011. 11:85-97p.

PAGANO, G.; PACINI, G.; MUSSO, G.; GAMBINO, R.; MECCA, F.; DEPETRIS, N.; CASSADER, M.; DAVID, E.; CAVALLO-PERIN, P.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. **Hepatology**, 2002. 35:367-372p.

PALETAS, K.; ALHANASIADOU, E.; SARIGIANNI, M.; PASCHOS, P.; KALOGIROU, A.; HASSAPIDOU, M.; TSAPAS, A. The Protective Role of the Mediterranean Diet on the Prevalence of Metabolic Syndrome in a Population of Greek Obese Subjects: **Journal of the American College of Nutrition**, 2010. 29(1).

PALMER, R.M.; MONCADA, S. Novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells: **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1989. 158(1):348-352p.

PAN, M.; CEDERBAUM, A.I.; ZHANG, Y.; GINSBERG, H.N.; WILLIAMS, K.J.; FISHER, E.A. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production: **The Journal of Clinical Investigation**, 2004. 113(9):1277-1287p.

PARADIS, V.; PERLEMUTER, G.; BONVOUST, F.; DARGERER, D.; PARFAIT, B.; VIDAUD, M.; CONTI, M.; HUET, S.; BA, N.; BUFFET, C.; BEDOSSA, P. High Glucose and Hyperinsulinemia Stimulate Connective Tissue Growth Factor Expression: A Potential Mechanism Involved in Progression to Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: **Hepatology**, 2001. 34:738-744p.

PARK, L.; ANRATHER, J.; GIROUARD, H.; ZHOU, P.; IADECOLA, C. Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain: **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.**, 2007. 27:1908-1918p.

PATEL, K.; CHEN, Y.; DENNEHY, K.; et al. Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat: **Am J Physiol Regul Integr Comp Physio.**, 2006. 1290:37-43p.

PELEGRINI, A.; SANTOS-SILVA, D.A.; PETROSKI, E.L.; GLANER, M.F. Prevalência de síndrome metabólica em homens: **Rev. salud pública**, 2010. 12 (4): 635-646p.

QURESHI, K.; ABRAMS, G.A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: **World J Gastroenterol.**, 2007.13(26):3540-3553p.

RABÊLO, L.A. **Disfunção endotelial na aterosclerose: papel do peróxido de hidrogênio e tratamento preventivo com o flavonóide diocleína.** [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte. UFMG. 2004.

RABÊLO, L.A.; SOUZA, V.N.; FONSECA, L.J.S.; SAMPAIO, W.O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular: **Arq Bras Cardiol.**, 2010. 94(5):684-693p.

RAMADORI, G.; MORICONI, F.; MALIK, I.; DUDAS, J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair: **Journal of physiol and pharmacol**, 2008. 59(suppl 1): 107-17p.

RATZIU, V.; MASSARD, J.; CHARLOTTE, F.; MESSOUS, D.; IMBERT-BISMUT, F.; BONYHAY, L.; TAHIRI, M.; MUNTEANU, M.; THABUT, D.; CADRANEL, J.F.; BAIL, B.L.; LEDINGHEN, V.; POYNARD, T.; and for the LIDO Study Group and the CYTOL study group. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: **BMC Gastroenterology**, 2006. 6(6): 1-13p.

REAVEN, G.M. Resistance to insulin-stimulated glucose uptake and hyperinsulinemia: role in non-insulin- dependent diabetes, high blood pressure, dyslipidemia and coronary heart disease: **Diabet Metab.**, 1991A. 17:78-86p.

REAVEN, G.M. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease: **Am Heart J.**, 1991B. 121:1283-8p.

REAVEN, G.M. The role of insulin resistance and hyperinsulinemia in coronary heart disease: **Metabolism**, 1992. 41:16-9p.

REDDY, J.K. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis: **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 2001.281:1333-1339p.

REDON, J.; CIFKOVA, R.; LAURENT, S.; NILSSON, P.; NARKIEWICZ, K.; ERDINE, S.; MANCIA, G. Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome: **Journal of Hypertension**, 2009. 27(3):441-51p.

ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; SINDHU, R.K.; JURCZAK, M.; EHDAIE, A.; VAZIRI, N.D. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome: **Metabolism Clinical and Experimental**, 2006. 55:928-934p.

ROCHA, A.K.S.; BÓIS, A.J.G.; HUTTNER, E.; MACHADO, D.C. Prevalência da síndrome metabólica em indígenas com mais de 40 anos no Rio Grande do Sul, Brasil: **Rev Panam Salud Publica**, 2011. :29(1):41-45p.

SALMON, A.B.; RICHARDSON, A.; PÉREZ, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?: **Free Radical Biology & Medicine**, 2010. 1-14p.

SAVENKOVA, M.I.; MUELLER, D.M.; HEINECKE, J.W. Tyrosyl Radical Generated by Myeloperoxidase Is a Physiological Catalyst for the Initiation of Lipid Peroxidation in Low Density Lipoprotein: **The Journal of Biological Chemistry**, 1994. 269(32): 20394-20400p.

SHINOZAKI, K.; NISHIO, Y.; OKAMURA, T.; YOSHIDA, Y.; MAEGAWA, H.; KOJIMA, H.; MASADA, M.; TODA, N.; KIKKAWA, R.; KASHIWAGI, A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats: **Circ Res.**, 2000. 87:566-73p.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance: **J Clin Invest.**, 2000.106(2): 171-6p.

SINCLAIR, D. A. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation: **Mech. Ageing Dev.**, 2005.126: 987-1002p.

SONE, H.; KAGAWA, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice: **Diabetologia**, 2005. 48: 58-67p.

SONTA, T.; INOBUCHI, T.; TSUBOUCHI, H.; SEKIGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. Evidence for contribution of vascular nad(p)h oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity: **Free Radical Biology & Medicine**, 2004. 37(1):115-123p.

SOUZA, V.N. **Desenvolvimento de um novo modelo murino dietético para a síndrome metabólica sem obesidade central: papel do balanço redox.** [Dissertação de Mestrado] Maceió. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Alagoas; 2009.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular Aptitudes: **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, 2008.10p.

STEINBERG, H.O.; CHAKER, H. LEAMING, R.; JOHNSON, A.; BRECHTEL, G.; BARON, A.D. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance: **J Clin Invest.**, 1996. 97:2601-2610p.

STEWART, B.J.; ROEDE, J.R.; DOORN, J.A.; PETERSEN, D.R. Lipid aldehyde mediated cross-linking of apolipoprotein b-100 inhibits secretion from hepg2 cells: **Biochim Biophys Acta.**, 2009.1791(8):772-780p.

UCHIYAMA, S.; SHIMIZU, T.; SHIRASAWA, T. CuZn-SOD Deficiency Causes ApoB Degradation and Induces Hepatic Lipid Accumulation by Impaired Lipoprotein Secretion in Mice: **The journal of biological chemistry**, 2006. 281(42): 31713-31719p.

VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better: **The Journal of Clinical Investigation**, 2001. 107(1): 23-25p.

VAZ, S.M.; AUGUSTO, O. Inhibition of myeloperoxidase-mediated protein nitration by tempol: kinetics, mechanism, and implications: **PNAS**, 2008. 105(24): 8191-8196p.

VERLOHREN, S.; DUBROVSKA, G.; TSANG, S.Y.; ESSIN, K.; LUFT, F.C.; HUANG, Y.; GOLLASCH, M. Visceral Periadventitial Adipose Tissue Regulates Arterial Tone of Mesenteric Arteries: **Hypertension**, 2004. 44:271-276p.

VIDELA, L.A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUINONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; BURDILES, P.; DIAZ, J. C.; SMOK, G.; THIELEMANN, L.; PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients: **Clinical Science**, 2004.106:261-268p.

VINAIXA, M.; RODRÍGUEZ, M.A.; RULL, A.; BELTRÁN, R.; BLADÉ, C.; BREZMES, J.; CANELLAS, N.; JOVEN, J.; CORREIG, X. Metabolomic Assessment of the Effect of Dietary Cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease: **Journal of Proteome Research**, 2010. 9:2527-2538p.

VONCKEN, J.W. **Genetic Modification of the Mouse: General Technology; Pronuclear and Blastocyst Injection**. From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 209: *Transgenic Mouse Methods and Protocols*. Edited by: M. H. Hofker and J. van Deursen © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 9-34, 2003.

XU, P.; GONCALVES, A.C.C.; TODIRAS, M.; RABELO, L.A.; SAMPAIO, W.O.; MOURA, M.M.; SANTOS, S.S.; LUFT, F.C.; BADER, M.; GROSS, V.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.S. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in *Mas* Gene-Deleted Mice: **Hypertension**, 2008. 51(part 2):574-580p.

WADA, T.; KENMOCHI, H.; MIYASHITA, Y.; SASAKI, M.; OJIMA, M.; SASAHARA, M.; KOYA, D.; TSUNEKI, H.; SASAOKA, T. Spironolactone Improves Glucose and Lipid Metabolism by Ameliorating Hepatic Steatosis and Inflammation and Suppressing Enhanced Gluconeogenesis Induced by High-Fat and High-Fructose Diet: **Endocrinology**, 2010.151: 2040-2049p.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2: **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 2002. (5):514-519p.

WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurements of thiobarbituric acid reacting substances formation in single micrititer plate: its use of evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, 1993. 208:10-15p.

WASSMANN, S.; STUMPF, M.; STREHLOW, K.; SCHMID, A.; SCHIEFFER, B.; BOHM, M.; NICKENING, G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. **Circ Res.**, 2004. 94:534-541p.

WEI, Y.; WANG, D.; TOPCZEWSKI, F.; PAGLIASSOTTI, M.J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells: **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 2006. 291:275-281p.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE JR., A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue: **The Journal of Clinical Investigation**, 2003. 112(12):1796-1808p.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue: **National Institutes of Health**, 2009. 5(1): 51-66p.

WIECKOWSKA, A.; MCCULLOUGH, A.J.; FELDSTEIN, A.E. Noninvasive Diagnosis and Monitoring of Nonalcoholic Steatohepatitis: Present and Future: **Hepatology**, 2007.46:582-589p.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance: **Clin Biochem Rev.**, 2005. 26:19-39p.

WILCOX, C.S.; PEARLMAN, A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides: **Pharmacol Rev.**, 2008. 60:418-469p.

WILCOX, C.S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress: **Pharmacology & Therapeutics**, 2010. 126:119-145.p.

WILLET, W.; MANSON, J.; LIU, S. Glycaemic index, glycemic load, and risk of type2 diabetes: **Am J Clin Nut.**, 2002. 76:274-80p.

WINZELL, M.S. E AHRÉN, B. The High-Fat Diet–Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes: **Diabetes**, 2004. 53(Suppl. 3):215-219p.

WIRTZ, P.H.; EHLERT, U.; BÄRTSCHI, C.; REDWINE, L.S.; KÄNEL, R. Changes in plasma lipids with psychosocial stress are related to hypertension status and the norepinephrine stress response: **Metabolism Clinical and Experimental**, 2009. 58:30-37p.

WISSE, B.E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. **J Am Soc Nephrol.**, 2004. 15:2792-2800p.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of oxidative glycosilation in diabetes: **Biochemical Journal**, 1987. 245:243-250p.

WOLIN, M. Interaction of oxidants with vascular signaling systems. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, 2000. 20:1430-1442p.

YAN, S.F.; RAMASAMY, R.; NAKA, Y.; SCHMIDT, A.M. Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. **Circ Res.**, 2003. 93:1159-69p.

ZALBA, G.; JOSÉ, G.S.; MORENO, M.U.; FORTUÑO, M.A.; FORTUÑO, A.; BEAUMONT, F.J.; DÍEZ, J. Oxidative Stress in Arterial Hypertension: Role of NAD(P)H Oxidase: **Hypertension**, 2001. 38:1395-1399p.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica: **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 2004. 14(4):574-89p.