

**BÁRBARA MIRANDA LEITE DA COSTA BOCCO**

**O EFEITO DO ÁCIDO CAFÉICO E DO ÁCIDO FERÚLICO SOBRE A SÍNDROME METABÓLICA EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Medicina Translacional da Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

São Paulo

2013

**BÁRBARA MIRANDA LEITE DA COSTA BOCCO**

**O EFEITO DO ÁCIDO CAFÉICO E DO ÁCIDO FERÚLICO SOBRE A SÍNDROME METABÓLICA EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Medicina Translacional da Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Dra. Miriam Oliveira Ribeiro

São Paulo

2013

Bocco, Bárbara Miranda Leite da Costa

**O efeito do ácido caféico e do ácido ferúlico sobre a síndrome metabólica em camundongos.** / Bárbara Miranda Leite da Costa Bocco. -- São Paulo, 2013.

xv, 48f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: The effect of caffeic acid and ferulic acid in metabolic syndrome in mice.

1. Obesidade. 2. Síndrome X Metabólica. 3. Ácido Caféico. 4. Ácido Ferúlico.

BÁRBARA MIRANDA LEITE DA COSTA BOCCO

O EFEITO DO ÁCIDO CAFÉICO E DO ÁCIDO FERÚLICO SOBRE A SÍNDROME  
METABÓLICA EM CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Medicina Translacional da  
Universidade Federal de São Paulo, para obtenção  
do Título de Mestre.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

---

Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira (Titular - USP)

---

Dr. Marcelo Augusto Christoffolete (Titular - UFABC)

---

Dra. Vera de Moura Azevedo Farah (Titular - UNIFESP)

---

Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros (Suplente - MACKENZIE)

Dissertação aprovado em Abril de 2013.

São Paulo

2013

*Dedico esse trabalho aos meus pais e orientadores, exemplos de personalidade e maturidade, que com o passar dos tempos, estiveram sempre ao meu lado me apoiando e inspirando a trabalhar no que eu mais amo.*

## AGRADECIMENTO

A CAPES por ter financiado o meu projeto, desde o início.

A Dra. Miriam Oliveira Ribeiro pela amizade, pelos diversos ensinamentos, por me mostrar como trabalhar com dedicação e entusiasmo, pela força concebida nesta jornada, e por acreditar no meu trabalho.

Ao Dr. Marcelo Augusto Christoffolete pelos ensinamentos, atenção e paciência.

A Dra Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, a Dra Vera de Moura Azevedo Farah e a Dra Roberta Monterazzo Cysneiros pela colaboração deste trabalho.

Aos alunos Gustavo Werpel Fernandes e Fernanda Beraldo Lorena pela participação, pela parceria, e pela disposição que sempre demonstram.

Ao Grupo da Dra Miriam Oliveira Ribeiro, pela força no trabalho.

Aos colegas, Ana Maria, Junior, Natália e Vitor da Universidade Presbiteriana Mackenzie pela amizade.

A minha amada família pelo carinho, incentivo e suporte em todos os momentos.

A minha mãe, Rose, e ao meu pai, Fábio por terem acreditado em mim, me ensinado a ser uma pessoa dedicada, honesta e a sempre correr atrás dos meus objetivos.

A minha irmã, Jéssica, por ter me dado força para continuar com meu sonho.

Aos meus avós, Duzinda, Ruth, Pedro e Homero, por ter me apoiado em todas as decisões da minha vida.

Ao meu Tio Reinaldo que me incentivou e me apoiou em todos os momentos e me ensinou a trabalhar com respeito e dignidade e seguir atrás do que eu sempre quis.

A todas as minhas amigas, Ashila, Laís, Marcela, Natália, Vanessa, Virgínia, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

BOCCO, B.M.L.C. **O efeito do ácido caféico e do ácido ferúlico sobre a síndrome metabólica em camundongos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Medicina Translacional, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

A obesidade é uma epidemia mundial e pode levar ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) que é caracterizada pelo conjunto de diversas alterações, tais como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Muitos estudos mostram que o Ácido Caféico (AC) e o Ácido Ferúlico (AF) apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias além de melhorar as anormalidades relacionadas à SM. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do ácido caféico e ácido ferúlico sobre a síndrome metabólica induzida pela dieta rica em gordura em camundongos. Para tanto, camundongos C57 foram tratados com dieta rica em gordura (40%) e com o AC (0,9 mg/kg/dia e 1,8 mg/kg/dia) e AF (50 mg/kg/dia) combinados por 40 dias. Peso corporal e consumo de ração foram registrados diariamente. Ao final do protocolo foi realizado teste de tolerância à glicose e insulina e determinaram-se os níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos, além da avaliação histológica do tecido hepático e do tecido adiposo branco (TAB). Também medimos a expressão gênica de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo de glicose e metabolismo lipídico através dos métodos de PCR em tempo real. Os resultados mostram que o tratamento de AC combinado com o AF melhorou a obesidade induzida pela dieta hipercalórica, o metabolismo de glicose, reduziu a síntese de colesterol, de ácidos graxos e de triglicérides, assim como preveniu a esteatose hepática. Por outro lado, observou-se a infiltração de neutrófilos e macrófagos no TAB dos animais tratados com o AC e AF. Em conclusão a combinação do AC e do AF melhorou as alterações observadas na SM induzida pela dieta hipercalórica e pode ser utilizada, no futuro, como terapêutica para o tratamento da obesidade, mas mais estudos são necessários para se estabelecer seus efeitos sobre processos inflamatórios no TAB.

**Palavra-chave: Obesidade, Síndrome X Metabólica, Ácido Caféico, Ácido Ferúlico.**

## ABSTRACT

BOCCO, B.M.L.C. **The effect of caffeic acid and ferulic acid in metabolic syndrome in mice.** 2013. Master's Thesis in Science - Medicina Translacional, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

Obesity is a worldwide epidemic and is associated with metabolic syndrome (MS) development and its disorders such as hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and hyperinsulinemia. Several studies have been shown that Caffeic Acid (CA) and Ferulic Acid (FA) present antioxidant and anti-inflammatory properties and improve several abnormalities related to metabolic syndrome. The aim of this study was to analyze the effect of the combined treatment with CA and FA on diet induced obesity in mice. For that, C57 mice were fed with high fat diet (HFD) (40%) and CA (0,9 mg/kg/day e 1,8 mg/kg/day) plus FA (50 mg/kg/day) concomitantly for 40 days. Body weight and feed intake were measure daily. By the end of the protocol, glucose and insulin tolerance test were performed. Serum cholesterol and triglyceride levels were measured and the histology of the liver and white adipose tissue (WAT) was analyzed. The gene expression of transcription factors and enzymes related to glucose and lipid metabolism were evaluated using real time PCR method. Our results showed that CA and FA prevent the body weight gain induced by high fat diet and improved the abnormalities related to diet-induced obesity, such as hyperglycemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia. They reduced cholesterol synthesis, fatty acids and triglycerides synthesis in the liver and also prevented hepatic steatosis. Moreover, infiltration of neutrophils and macrophages was observed in WAT of animals treated with CA and FA. In conclusion the combined treatment of CA and FA improved the alterations related to MS induced by high fat diet and could be used as therapeutic for the treatment of obesity, but more studies are necessary to establish its inflammatory effect on WAT.

**Keywords: Obesity, Metabolic Syndrome X, Caffeic Acid, Ferulic Acid.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Quadro de estatísticas da Organização Mundial de Saúde da obesidade.....	1
<b>Figura 2.</b> Quadro ilustrativo da síndrome metabólica.....	3
<b>Figura 3.</b> Figura ilustrativa das vias de lipídeos e lipoproteínas.....	9
<b>Figura 4.</b> A) Peso Corporal; B) Delta do peso corporal dos camundongos após o início do tratamento com os ácidos.....	22
<b>Figura 5.</b> A) Média do Consumo de ração diário dos animais; B) Média do Consumo de calorias diário dos camundongos.....	23
<b>Figura 6.</b> Histologia do Tecido Adiposo Branco. A) CTRL corado com HE; B) DH corado com HE; C) DH+C0,9+F50 corado com HE; D) DH+C1,8+F50 corado com HE; E) Área estimada do adipócito epididimal individual.....	24
<b>Figura 7.</b> A) Gel de poliácridamida com a expressão da proteína UCP-1. B) Determinação da expressão da proteína UCP-1.....	25
<b>Figura 8.</b> A) Teste de tolerância à glicose (GTT): dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50; B) Área sob a curva do GTT; C) Teste de tolerância à insulina (ITT): dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50; D) Área sob a curva do ITT.....	26
<b>Figura 9.</b> A) Determinação do nível de RNAm do gene ChREBP. B) Determinação do nível de RNAm do gene G6pase.....	27
<b>Figura 10.</b> Determinação do nível de RNAm do gene PPAR- $\alpha$ .....	28
<b>Figura 11.</b> A) Nível de colesterol plasmático dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50. B) Nível de triglicérides plasmático dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50.....	28
<b>Figura 12.</b> Histologia do fígado. A) CTRL corado com HE; B) DH corado com HE; C) DH+C0,9+F50 corado com HE; D) DH+C1,8+F50 corado com HE.....	29
<b>Figura 13.</b> A) Determinação do nível de RNAm do gene ChREBP; B) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-1c; C) Determinação do nível de RNAm do gene FAS; D) Determinação do nível de RNAm do gene DGAT-2; E) Determinação do nível de RNAm do gene ATGL; F) Determinação do nível de RNAm do gene MTTP.....	31
<b>Figura 14.</b> A) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-2; B) Determinação do nível de RNAm do gene LXR- $\alpha$ ; C) Determinação do nível de RNAm do gene LDL-R; D) Determinação do nível de RNAm do gene ACAT-1; E) Determinação do nível de RNAm do gene HMG-CoA reductase.....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Adaptação da classificação internacional do IMC.....	2
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos primers para PCR em tempo real.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT - Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase

Acrp-30 - Adiponectina

ApoB - Apolipoproteínas-B

ApoE - Apolipoproteínas-E

ATGL - Lipase TriacilGlicerol

CETP - Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

ChREBP - Proteína de ligação do elemento de resposta do carboidrato

COX-1 - Ciclooxygenase 1

COX-2 - Ciclooxygenase 2

CRP - Proteína C-reativa

CTRL - Controle

DGAT2 - Diacilglicerol Aciltransferase 2

DH - Dieta Hipercalórica

DH+C0,9+F50 - Dieta Hipercalórica + ácido caféico 0,9 mg/kg/dia + ácido ferúlico 50 mg/kg/dia

DH+C1,8+F50 - Dieta Hipercalórica + ácido caféico 1,8 mg/kg/dia + ácido ferúlico 50 mg/kg/dia

DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica

DNAc - DNA complementar

EP - Erro Padrão

FAS - Ácido Graxo Sintase

G6pase - Glucose-6-fosfatase

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase

GK - Glicoquinase

GLUT-4 - Transportador de glicose

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HDL-C - HDL-colesterol

HE - Hematoxilina/Eosina

HMG-CoA - Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

HRP - Anticorpo Secundário

IDL - Lipoproteína de densidade intermediária

IDOL - Degradação induzida da LDL-R

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1-beta

IL-6 - Interleucina-6

IMC - Índice de Massa Corpórea

IR - Receptor de insulina

IRS-1 e IRS-2 - Substratos do receptor da insulina 1 e 2

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDL-R - Receptor de LDL

LH - Lipase Hepática

LHS - Enzima Lipase Hormônio-Sensível

LPL - Lipases de lipoproteínas

LXR - Receptor X do fígado

MCP-1 - Proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1

MTTP - Proteína Microsomal de Transferência de Triglicerídeos

NF-kB - Fator nuclear k-B

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação de Polimerização em cadeia

PEPCK - Fosfoenolpiruvato Carboxinase

PI3K - Cínase fosfatidilinositol 3quinase

PPAR- $\alpha$  - Receptores ativados por proliferador de peroxissomo alpha

PPAR- $\gamma$  - Receptores ativados por proliferador de peroxissomo gama

qPCR - Reação de Polimerização em cadeia em tempo real

RNAm - RNA mensageiro

RT-PCR - Transcriptase reversa

SCOUT - Sibutramine in Cardiovascular Outcomes Trial

SM - Síndrome Metabólica

sOCs3 - Supressor da Citocina Sinalizadora 3

SREBP-1c - Proteína de ligação do elemento regulado por esterol tipo 1c

SREBP-2 - Proteína de ligação do elemento regulado por esterol tipo 2

TAB - Tecido Adiposo Branco

TAG - Triacilglicerol

TAM - Tecido Adiposo Marrom

TBST - Tampão Fosfato Salino - Tween 20

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral – alpha

TTG - Teste de tolerância à glicose

TTI - Teste de tolerância à insulina

UCP-1 - Proteína Desacopladora

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

$\beta$ -actina – Beta-actina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica .....	1
1.2. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo.....	4
1.3. Metabolismo Lipídico no Fígado .....	8
1.4. Tratamentos Farmacológicos .....	11
1.5. Compostos Fenólicos .....	11
1.6. Ácido Caféico .....	12
1.7. Ácido Ferúlico .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivo Principal .....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Animais .....	16
3.2. Dieta Hipercalórica .....	17
3.3. Teste de tolerância à glicose (TTG).....	17
3.4. Teste de tolerância à insulina (TTI) .....	17
3.5. Medida de colesterol plasmático.....	18
3.6. Medida de triglicérides plasmáticos.....	18
3.7. Análise de RNAm por PCR em tempo real .....	18
3.8. Western Blotting .....	19
3.9. Histologia.....	20
3.10. Análise Estatística .....	21
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
4.1. Peso Corporal e Consumo de Ração .....	22
4.2. Histologia do Tecido Adiposo Branco.....	23
4.3. Dosagem de Proteína Tecido Adiposo Marron.....	25
4.4. Efeito Do ácido caféico e do ácido ferúlico no metabolismo de glicose .....	25
4.4.1. Homeostase de glicose .....	25
4.2. Determinação da expressão gênica no metabolismo de glicose.....	27
4.5. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides .....	28

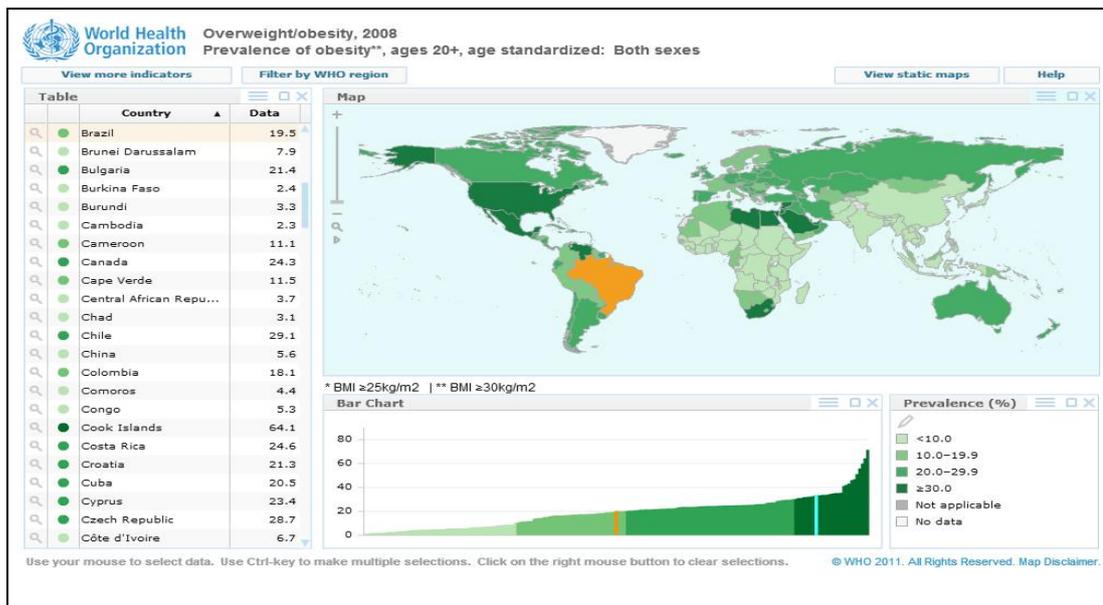
4.6. Alterações no Tecido Hepático .....	29
4.6.1. Histologia do Tecido Hepático .....	29
4.6.2. Determinação da expressão gênica .....	30
4.6.2.1. Metabolismo de Síntese de Triglicérides .....	30
4.6.2.2. Metabolismo de Síntese de Colesterol.....	31
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>48</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Obesidade e Síndrome Metabólica

A obesidade, segundo definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), é o acúmulo excessivo de gordura que é considerado um fator de risco para doenças crônicas, aumentando em 60% a chance de desenvolver *diabetes mellitus* tipo 2, em 20% de desenvolver hipertensão arterial e em 10 a 30% de desenvolver câncer, representando 2/3 das causas de morte da população mundial (ABESO, <<http://www.abeso.org.br>>, acesso em 21/11/2012).

Com base em avaliação realizada em 194 países, a OMS (2008) considera que 12% da população mundial é obesa (ABESO, <<http://www.abeso.org.br>>, acesso em 21/11/2012). No Brasil, a estatística de sobrepeso e obesidade chega a 19,5% entre ambos os sexos (WHO <<http://www.who.int/>>, acesso em 21/11/2012) (Figura1).



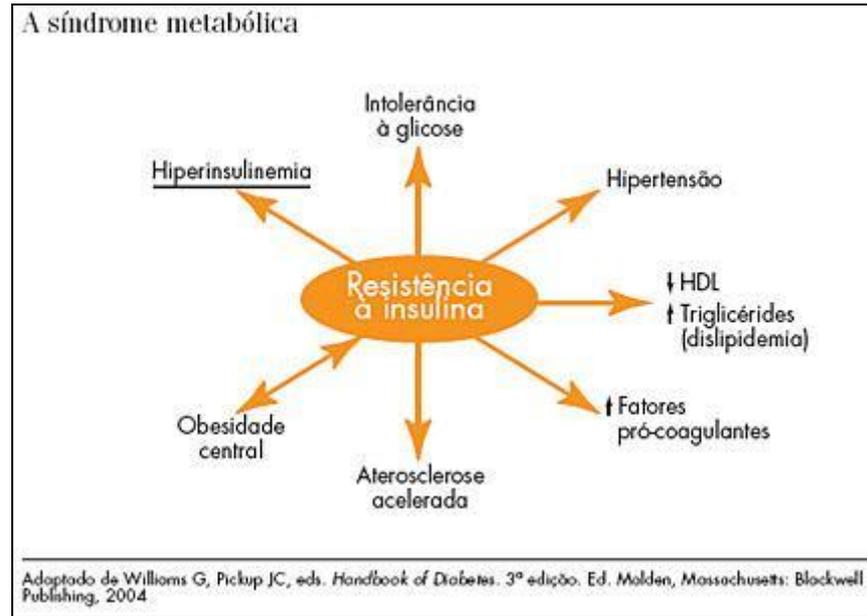
**Figura 1:** Quadro de estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 2008 da obesidade e do sobrepeso da população mundial e do Brasil (<[http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/overweight\\_obesity/atlas.html?indicator=i1&date=Both%20sexes](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight_obesity/atlas.html?indicator=i1&date=Both%20sexes)>, acesso em 21/11/2012).

Devido ao grande número de pessoas obesas a OMS fez uma classificação internacional caracterizando a obesidade de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC), que é calculado pelo PESO/(ALTURAxALTURA), como podemos observar na Tabela 1 (IASO, <<http://www.iaso.org/>>, acesso em 21/11/2012).

**Tabela 1:** Adaptação da classificação internacional de adultos abaixo do peso, acima do peso e obesos de acordo com o IMC (MEDICONE, <<http://www.medicone.com.br>>, acesso em 12/03/12).

<b>Tabela de IMC</b>	
<b>Resultado</b>	<b>Situação</b>
<b>Abaixo de 17</b>	<b>Muito abaixo do peso</b>
<b>Entre 17 e 18,49</b>	<b>Abaixo do peso</b>
<b>Entre 18,5 e 24,99</b>	<b>Peso Normal</b>
<b>Entre 25 e 29,99</b>	<b>Acima do Peso</b>
<b>Entre 30e 34,99</b>	<b>Obesidade I</b>
<b>Entre 35 e 39,99</b>	<b>Obesidade II (severa)</b>
<b>Acima de 40</b>	<b>Obesidade III (mórbida)</b>

A obesidade está relacionada ao desenvolvimento de diversas anormalidades, tais como a resistência a insulina, hiperinsulemia, aumento nos níveis plasmáticos de triglicérides, diminuição dos níveis plasmáticos de HDL-colesterol (HDL-C), valores elevados de LDL e VLDL plasmáticos, intolerância à glicose, obesidade abdominal e hipertensão arterial sistêmica, além dos estados pró-trombótico e pró-inflamatório observados (SANTOS, *et al.*, 2006; ALBERTI, *et al.*, 2006; HELLERSTEIN, *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, *et al.*, 2010; DODSON, *et al.*, 2011). Tomadas em conjunto, essas alterações configuram um quadro classificado como Síndrome Metabólica (SM) (figura 2) (SANTOS, *et al.*, 2006; ALBERTI, *et al.*, 2006; HELLERSTEIN, *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, *et al.*, 2010; DODSON, *et al.*, 2011).



**Figura 2:** Adaptado de Willians G, Pickup JC, eds. Handbook of diabetes. 3ª edição. Ed. Molden, Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004. Quadro ilustrativo da síndrome metabólica retirado do site <http://www.endocardio.med.br/sindrome-metabolica/>.

Muitos autores consideram que a resistência à insulina seja a principal disfunção da síndrome metabólica. Essa alteração significa que a insulina circulante não tem função normal nos tecidos sensíveis à sua ação (REAVEN, 1988).

A resistência à insulina caracteriza-se pela dessensibilização dos receptores de insulina (IR), com conseqüente redução na resposta dos tecidos alvo à ação deste hormônio. Observa-se assim diminuição no transporte de glicose para dentro da célula devido à redução da expressão do transportador de glicose (GLUT-4). Também se observa a menor expressão de outros genes responsivos a insulina, tais como substratos do receptor da insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) e a cínase do fosfatidilinositol 3 (PI3K) (KAHN, *et al.*, 2000; CARNEIRO, *et al.*, 2011).

Nesse quadro, a diminuição da expressão do GLUT-4 leva à inibição da supressão da produção da glicose hepática (KAHN, *et al.*, 2000; CARNEIRO, *et al.*, 2011). Essa falha na sinalização da insulina resulta, portanto em hiperglicemia, levando ao aumento compensatório da secreção de insulina pelo pâncreas na tentativa de manter a homeostase glicêmica levando à hiperinsulinemia (BERGMAN, *et al.*, 2003).

É possível observar também que no quadro de resistência à insulina está envolvida com o aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios. Em obesos, há um aumento nos

níveis de ácidos graxos livres, fator de necrose tumoral – alpha (TNF- $\alpha$ ), interleucina – 6 (IL-6) e interleucina -1 beta (IL-1 $\beta$ ), e também uma diminuição nos níveis de adiponectina, fator anti-inflamatório com função de inibir os fatores pró-inflamatórios. Por conta disso, é possível explicar diversas alterações relacionadas à resistência à insulina. O TNF- $\alpha$  aumenta a fosforilação da IRS-1 com consequente inibição da tirosina quinase prejudicando a sinalização na insulina, o que leva a menor expressão do mRNA para o GLUT-4. A IL-6 pode reduzir a sensibilidade à insulina além de induzir a produção da Proteína C Reativa que também está relacionado à inflamação. Por sua vez a IL-1 $\beta$  é ativada por altas concentrações de glicose e ácidos graxos livres e parece estar envolvida na degradação das células  $\beta$  do pâncreas, que são responsáveis pela produção e secreção deste hormônio (CARNEIRO, *et al.*, 2011).

## 1.2. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma. Trata-se de um tecido que possui todas as enzimas e proteínas reguladoras fundamentais para sintetizar ácidos graxos, estocar TAG em períodos em que a oferta de energia é abundante e mobilizá-los pela lipólise quando há um déficit calórico (GALIC, *et al.*, 2010).

A quantidade de gordura armazenada nos adipócitos é regulada pelo sistema nervoso autônomo através dos seus componentes parassimpático e simpático. O sistema nervoso parassimpático está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os adipócitos, tais como a captação de glicose e de ácidos graxos estimulados pela insulina (KREIER, *et al.*, 2002). Já a inervação simpática relaciona-se principalmente com ações catabólicas, como a lipólise mediada pelos receptores adrenérgicos e dependentes da atividade da enzima lipase hormônio-sensível (LHS) (PÉNICAUD, *et al.*, 2000).

Existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O TAB estoca os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa cerca de 85% a 90% do citoplasma e empurra o núcleo para a periferia da célula, sendo o restante da massa representado por água e proteínas (POND, 2001). O TAM é especializado em realizar a termogênese, processo fundamental na regulação da temperatura corporal. Até recentemente, considerava-se o TAM ausente em humanos adultos e presente em fetos e recém-nascidos (CANNON, *et al.*, 2004). No entanto, em 2007 Nedergaard e colaboradores mostraram que

este tecido é encontrado em humanos adultos, estando presente na região supraclavicular, pescoço, paravertebral, para-aórtica e suprarenais (CINTI, 2006; NEDERGAARD, *et al.*, 2007). O adipócito marrom apresenta um grande número de mitocôndrias que utilizam parte da energia liberada pela oxidação de metabólitos para liberar calor (CANNON, *et al.*, 2004). Tal processo ocorre através de uma proteína desacopladora (UCP-1), que atua como um canal de prótons e descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intramembranoso das mitocôndrias, desacoplando o gradiente de energia da síntese de ATP, dissipando a energia estocada na mitocôndria na forma de calor (CANNON, *et al.*, 2004).

Ao contrário do TAM, o TAB apresenta funções mais abrangentes oferecendo uma proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, por estar infiltrado em órgãos e estruturas internas. Além disso, o TAB apresenta uma maior distribuição estando presente na derme e no tecido subcutâneo, sendo um ótimo isolante térmico (PRINS, 2002).

Em decorrência de estudos recentes relacionados à propriedade do TAB em secretar uma ampla gama de adipocinas, um novo conceito sobre a função biológica deste tecido vem crescendo, consolidando a idéia de este tecido ser um órgão dinâmico envolvido em uma variedade de desordens metabólicas como a SM e a resistência à insulina.

As adipocinas são proteínas secretadas pelo TAB relacionadas a uma variedade de processos metabólicos. Suas funções biológicas são altamente variadas e compreendem proteínas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Compreendem as adipocinas pró-inflamatórias o Fator de necrose tumoral – alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-6 (IL-6), Fator nuclear k-B (NF-kB), Interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), Receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR), Proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1 (MCP-1) e Resistina. Por outro lado, há também a classe de adipocinas anti-inflamatórias como, por exemplo, a adiponectina, relacionado à homeostase glicêmica e a inibição de fatores pró-inflamatórios citados acima (FRUHBECK, *et al.*, 2001).

A resistina é uma proteína encontrada na zona de inflamação secretada por adipócitos em camundongos e por monócitos e macrófagos em humanos (REA, *et al.*, 2004; WOLF, 2004; BOKAREWA, *et al.*, 2005). Diversos estudos descrevem a resistina como um hormônio secretado pelo TAB durante a adipogênese (WOLF, 2004). A resistina ganhou esse nome pela sua capacidade em promover resistência à insulina (STEPPAN, *et al.*, 2001). De fato, observa-se um aumento nos níveis de resistina em modelos de obesidade induzida por

dieta (WOLF, 2004). A resistina modula o metabolismo de glicose por estar associada à ativação do Supressor da Citocina Sinalizadora 3 (sOCs3), que tem função de inibir a sinalização da insulina no adipócito (WOLF, 2004; STEPPAN, *et al.*, 2005). Além disso, a resistina potencializa a indução a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e MCP-1 (KASER, *et al.* 2003; NAGAEV, *et al.* 2006) e também regula a diferenciação do adipócito (WOLF, 2004).

Assim como a resistina, o TNF- $\alpha$  é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória que aumenta o acúmulo de gordura e interfere em diversos processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica (SETHI, *et al.*, 1999). Em animais obesos observa-se um aumento na expressão do TNF- $\alpha$  que se correlaciona positivamente com o aumento do volume de adipócitos (MONTAGUE, *et al.*, 1998). Em ratos obesos, a neutralização do TNF- $\alpha$  melhorou significativamente a captação de glicose em resposta à insulina, demonstrando a relação entre resistência à insulina e obesidade (HOTAMISLIĞLI, *et al.*, 1993). Em humanos obesos também se verificou uma relação inversa entre o metabolismo de glicose e TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  prejudica a sinalização da insulina por reduzir a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), com conseqüente redução da síntese do transportador de glicose (GLUT-4), diminuindo a captação de glicose mediada pela insulina (ARNER, 1995).

O TNF- $\alpha$  e a resistina também estão envolvidos no processo de inflamação, participando da migração de monócitos que serão convertidos em macrófagos na parede endotelial pelo fator nuclear k-B (NF-kB) (LYON, *et al.*, 2003). O NF-kB é responsável pela ação imune-inflamatória à nível transcricional e também um potencial indutor para a resistência à insulina (BEZERRA, *et al.*, 2012).

Estudos recentes mostraram que o tecido adiposo em obesos é caracterizado pelo aumento de infiltração de macrófagos, que produzem diversas proteínas inflamatórias (BOULOUMIÉ, *et al.*, 2005; HEILBRONN, *et al.*, 2008). O processo de inflamação está associado com a ativação de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e a proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1 (MCP -1) (ZEYDA, *et al.*, 2007; XIE, *et al.*, 2010). Diversos estudos sugerem que a expressão de MCP-1 tem o papel na resposta inflamatória do tecido adiposo induzindo a infiltração de macrófagos, causando a progressão da obesidade (TAKANASHI, *et al.*, 2003; CHEN, *et al.*, 2005). Já a IL-6 é

conhecida como uma “citocina endócrina”. Ela apresenta um efeito pró-inflamatória, ativando a via da AMP-proteína quinase no tecido adiposo e no músculo esquelético, onde está relacionada com o aumento de oxidação de gordura. Em alta concentração em obesos, o IL-6 também está envolvido na indução da resistência a insulina e também por aumentar as proteínas da fase aguda como os níveis de proteína C-reativa (CRP) (FANTUZZI, 2005; CARVALHO, *et al.*, 2006; TILG, *et al.*, 2008; GREGOR, *et al.*, 2011).

Sabendo que o aumento da obesidade visceral correlaciona-se positivamente com processos inflamatórios e aumento da adipogênese, o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- $\gamma$ ) recebe destaque desempenhando papel chave na cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese. Esse fator de transcrição é ativado pelas células de gordura e exercem um efeito na sensibilidade à insulina no tecido adiposo, no músculo esquelético (TONTONOZ, *et al.*, 1995; TILG, *et al.*, 2008).

O PPAR- $\gamma$  faz parte de uma superfamília de receptores nucleares apresentando um papel crítico na regulação da diferenciação do adipócito (TONTONOZ, *et al.*, 1995; TILG, *et al.*, 2008) e também é chave no aumento do TNF- $\alpha$  que induz a resistência à insulina.

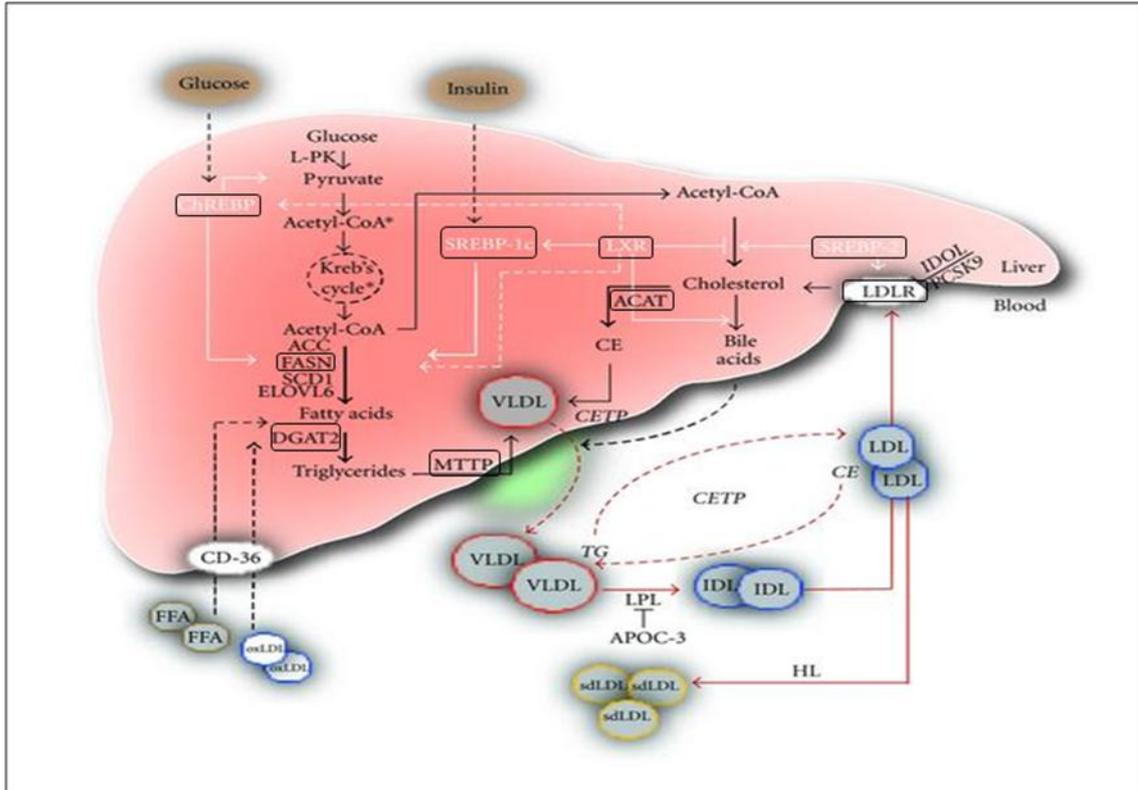
Em contrapartida, o PPAR- $\alpha$  apresenta uma ação anti-inflamatória induzindo a beta-oxidação de ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina e regulando a homeostase energética por atuar diretamente no TAB e no fígado (VAN RAALTE, *et al.*, 2004).

Outra adipocina anti-inflamatória é a adiponectina, que é responsável por aumentar a sensibilidade tecidual à insulina e secretada exclusivamente pelo adipócito (RYO, *et al.*, 2004). Também conhecida como Acrp-30, a adiponectina age como fator protetor de doenças cardiovasculares (BERG, *et al.*, 2002). O seu efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico é promovido a partir da inibição dos fatores pró-inflamatórios na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP e resistina (OUCHI, *et al.*, 2003; BERG, *et al.*, 2005; ARONNE *et al.*, 2007). Em obesos observa-se baixa secreção de adiponectina levando a uma estimulação exagerada do sistema imune resultando em um quadro inflamatório crônico no paciente. Esse quadro inflamatório correlaciona-se com a resistência à insulina encontrada nesses indivíduos (OUCHI, *et al.*, 2003; BERG, *et al.*, 2005; ARONNE *et al.*, 2007).

### 1.3. Metabolismo Lipídico no Fígado

Na Síndrome Metabólica observam-se alterações importantes no metabolismo lipídico. Tem sido proposto que componentes individuais da SM influenciem o metabolismo lipídico, aumentando o risco da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A resistência à insulina parece ser o principal fator envolvido na patogênese da DHGNA (LONARDO, *et al.*, 2005).

O fígado exerce um papel fundamental no metabolismo de lipídios, promovendo a síntese de triglicérides e colesterol e a oxidação dos ácidos graxos para o fornecimento de energia aos diversos sistemas corporais (GUYTON & HALL, 2006). Um papel importante do fígado é manter a glicose do plasma dentro dos limites fisiológicos, independente do estado nutricional do animal. Desta forma, caso haja ingestão de carboidratos em quantidade superior ao necessário para suprir as necessidades energéticas, ocorre conversão destes em ácidos graxos, processo conhecido como lipogênese *de novo*, e posteriormente em triglicérides, os quais podem ser armazenados como gotículas lipídicas no interior dos hepatócitos ou incorporados dentro das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e secretadas no sangue (Figura 3) (TULENKO, *et al.*, 2002).



**Figura 3:** Adaptado de Fon Tacer e Rozman, *Journal of Lipids*, publicado em 2011. Figura ilustrativa das vias de lipídeos e lipoproteínas na patogênese da DHGNA. DHGNA é considerado uma manifestação no fígado da obesidade e da síndrome metabólica. Em resposta a insulina e glicose, fatores de transcrição SREBPs e ChREBP são ativadas e induzidas na expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e de colesterol no fígado. Lipogênese melhora à produção de VLDL, sendo a grande perturbação metabólica em DHGNA. O aumento da secreção de VLDL no plasma resulta no aumento nos níveis de LDL através de CETP mediada por troca de ésteres de colesterol e triglicérides entre LDL e VLDL, seguido por remoção de triglicérides de LDL pela lipase hepática (LH). O fígado remove LDL da circulação por endocitose mediada LDL-R. LDL oxidada e ácidos graxos livres são transportados para o fígado, por CD-36, ácido graxo translocase, e receptor de captura. Em Itálico: genes metabólicos, linhas pretas: vias metabólicas, linhas tracejadas pretas: saindo ou entrando no fígado, linhas brancas: regulação da transcrição, processo \* na mitocôndria. Contornadas em preto genes estudados na tese.

Os fatores de transcrição SREBP-1c (Proteína de Ligação Reguladora de Esteróis) e ChREBP (Elemento de Ligação Responsivo a Carboidratos) se destacam nessa via, sendo eles responsivos à insulina e glicose, respectivamente. (HORTON, *et al.*, 2002; POLACOW, *et al.*, 2007). Ambos os fatores de transcrição ativam genes lipogênicos tais como o Ácido Graxo Sintetase (FAS), responsável por catalisar a última etapa da biossíntese de ácidos graxos no fígado (FON TACER, *et al.*, 2011).

Após a formação dos ácidos graxos pela via da lipogênese *de novo*, ocorre à síntese de triglicérides pela ação da enzima Diacilglicerol Aciltransferase 2 (DGAT 2), responsável por catalisar a etapa final da biossíntese de triglicérides. Ao mesmo tempo o fígado sofre ação da lipase TriacilGlicerol (ATGL), que atua na primeira etapa da lise de triacilglicerol,

favorecendo o controle intracelular de triglicérides no fígado, conferindo resistência à formação de esteatose hepática (FON TACER, *et al.*, 2011).

Além dos mecanismos relacionados à síntese de ácidos graxos e triglicérides no fígado, o metabolismo hepático de lipoproteínas exerce papel fundamental na manutenção da homeostase lipídica. Dentre os elementos relacionados à produção e exportação dos triglicérides destaca-se a proteína de transferência de triglicérides microsomal (MTTP), responsável pela formação da lipoproteína VLDL e pela exportação do fígado (FON TACER, *et al.*, 2011).

Após a lipoproteína VLDL ser secretada para o plasma, ela sofre ação de enzimas denominadas lipases de lipoproteínas (LPL) que são responsáveis por remover os triglicérides nos tecidos, promovendo a formação de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e, posteriormente, das moléculas de LDL (TULENKO, *et al.*, 2002). Os níveis plasmáticos de LDL, a maior lipoproteína carreadora de colesterol em humanos, é determinado pela taxa relativa de produção e remoção pelos receptores de LDL (LDL-R), através de um *feedback* negativo transcricional mediado pelos níveis de colesterol intracelular (GOLDSTEIN, *et al.*, 2009). O receptor de LDL reconhecem dois ligantes: a apoB e a apoE, que fazem com que este receptor consiga remover da circulação as LDL, VLDL e IDL (GOLDSTEIN, *et al.*, 1995).

A formação de colesterol é regulada pela concentração de colesterol nos hepatócitos. Em quantidades excessivas de colesterol intracelular, mecanismos reguladores da produção de colesterol são ativados, tais como a inibição da HMG-Coa reductase, enzima chave da via de síntese de colesterol. Além disso, ocorre um aumento da taxa de esterificação de colesterol intracelular pela enzima ACAT (acyl-CoA: cholesterol acyltransferase) com consequente aumento da incorporação do colesterol na molécula de VLDL que é exportada para o plasma (BROWN, *et al.*, 1997; RIFAI *et al.*, 1999).

Dois grandes reguladores da via de colesterol são: SREBP-2 (Proteína de Ligação Reguladora de Esteróis) e LXR (receptor X do fígado). O SREBP-2 está relacionado à indução da biossíntese e captura de colesterol (BROWN, *et al.*, 1997; PEET, *et al.*, 1998a). Por outro lado, o LXR é ativado quando há um excesso de colesterol intracelular inibindo o SREBP-2, assim promovendo a exportação e a eliminação do colesterol no fígado, regulando a homeostase de colesterol (BROWN, *et al.*, 1997; PEET, *et al.*, 1998b).

O LXR exerce também um controle negativo sobre a LDL-R mediando à captura de colesterol pela indução da expressão da proteína IDOL (degradação induzida da LDL-R), Onde o IDOL cataliza os pontos chaves para a degradação da LDL-R (ZELCER, *et al.*, 2009).

#### **1.4. Tratamentos Farmacológicos**

A perda de peso e exercícios físicos pode contribuir de maneira importante para reduzir a obesidade e a resistência à insulina, porém, em alguns casos, são necessárias intervenções severas com drogas farmacológicas. Alguns medicamentos são considerados coadjuvantes no emagrecimento, mas também podem provocar efeitos colaterais, como dependência química e irritabilidade (JAMES, *et al.*, 2002). As drogas mais antigas para a perda de peso são as anfetaminas que agem nos neurônios que estimulam a fome, bloqueando-os. No entanto, é difícil a manutenção do peso corporal quando se interrompe o tratamento. Já os sacietógenos, como a sibutramina, atuam interferindo no volume de comida necessário para a pessoa se sentir saciada, sendo assim, mais indicado no tratamento da obesidade uma vez que não leva a dependência e nem ilude o paciente a perder peso sem esforço (JUHÁSZ *et al.*, 2006). Em contrapartida, a sibutramina pode apresentar efeitos colaterais desde prisão de ventre, dor de cabeça e insônia até doenças cardiovasculares como hipertensão, taquicardia e arritmias (KANG, *et al.*, 2012; ARAÚJO, *et al.*, 2012). Em 2010 foi reportado pela SCOUT (Sibutramine in Cardiovascular Outcomes Trial) em relatório preliminar de um estudo de pacientes obesos com doença cardiovascular, hipertensos e com *diabete mellitus 2*, um aumento nos riscos não fatais de doenças cardiovasculares tais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (KANG, *et al.*, 2012).

Como no tratamento da síndrome metabólica é uma questão de saúde pública e tendo em vista que as drogas disponíveis apresentam efeitos colaterais, tem se buscado novas substâncias que levem à perda de peso e a melhora das alterações observadas na síndrome metabólica.

#### **1.5. Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas nos vegetais de forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, assim com grande distribuição na natureza, onde fazemos uso na alimentação e de sua ação antioxidante (CROFT, 98). Os

compostos fenólicos são os flavonoides e derivados, e os ácidos fenólicos (ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e as cumarinas) (SEIFRIZ, 2004).

Os ácidos fenólicos são compostos por um anel benzênico, um agrupamento carboxílico e uma ou mais unidades de hidroxila e/ou metoxila, assim conferindo a propriedade de efeito antioxidante para alimento ou para o organismo em si. (KERRY, *et al.*, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON, *et al.*, 1999).

O ácido caféico apresenta ação antioxidante aumentada por conta da segunda hidroxila na posição orto ou para, enquanto o ácido ferúlico apresenta uma hidroxila na posição orto ligado ao grupo metoxila (CUVELIER, *et al.*, 1992; CHEN, *et al.*, 1997).

Essas substâncias são capazes de inibir a oxidação de substratos, desde moléculas simples até polímeros e biosistemas complexos. O biosistema complexo apresenta duas fases, sendo a primeira a etapa de iniciação que envolve a inibição e formação de radicais livres, e a segunda é a etapa de propagação que relaciona a eliminação de radicais livres, assim interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SHAHIDI, *et al.*, 1992; SIMIC, *et al.*, 1994).

Segundo Yanishlieva & Marinova (1995), utilizando triglicerídeos em estudos cinéticos, verifica que os ácidos fenólicos participam mais efetivamente na fase de iniciação da oxidação e os ácidos ferúlico, caféico e sinápico atuam também na reação de propagação, assim esclarecendo a ação deles no processo oxidativo.

A indústria farmacêutica tem dado especial atenção devido a esses compostos pelos seus efeitos benéficos nos sistemas biológicos (SEIFRIZ, 2004).

## **1.6. Ácido Caféico**

O ácido caféico, como já dito anteriormente, é um ácido hidroxicinâmico, que faz parte da classe de ácidos fenólicos encontrados na natureza em sementes, frutas e vegetais (CHO, *et al.* 2010).

Este ácido apresenta diversos efeitos biológicos atuando como antioxidante e anti-inflamatório, além de demonstrar uma melhora na hipercolesterolemia e na diabetes tipo 2 (KIM, *et al.*, 2003; LEE, *et al.*, 2003; JUNG, *et al.*, 2006; PARK, *et al.*, 2006).

A sua ação anti-inflamatória ocorre por meio da inibição da atividade da ciclooxigenase 1 (COX-1). Além disso, reduz a atividade e a expressão gênica da ciclooxigenase 2 (COX-2), que está envolvida no desenvolvimento da obesidade associado com a resistência à insulina e esteatose hepática em modelos de obesidade (LEE, *et al.* 2004; JUG, *et al.*, 2008; HSEIH, *et al.* 2009). Além disso, o ácido caféico bloqueia a expressão genética das citocinas pró-inflamatórias envolvidos na resistência à insulina tais como, o NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e na hipertrofia dos adipócitos (MARQUÉZ, *et al.* 2004; ZEYDA, *et al.*, 2007; XIE, *et al.*, 2010). Alguns trabalhos sugerem que o ácido caféico inibe a via de sinalização molecular inflamatória pela redução da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e da expressão da COX-2, restaurando parcialmente a sinalização à insulina (HSEIH, *et al.*, 2009; BEZERRA, *et al.*, 2012).

O efeito do ácido caféico sobre a redução do peso corporal não é claro. Alguns estudos reportam que há melhora no metabolismo de glicose sem redução no peso corporal (BEZERRA, *et al.*, 2012), enquanto outros mostram proteção na obesidade induzida pela dieta (CHO, *et al.*, 2010).

O ácido caféico também apresenta efeito importante no metabolismo de gorduras. O tratamento desse ácido em camundongos com obesidade induzida pela dieta leva à redução nos níveis de FAS, HMG-CoA reductase e ACAT no fígado, levando à inibição da síntese de colesterol e dos ácidos graxos, assim melhorando a hipercolesterolemia (CHO, *et al.*, 2010). O ácido caféico também estimula o PPAR- $\alpha$ , responsável pelo aumento na oxidação de ácidos graxos no fígado (WILSON, *et al.*, 1997). O PPAR- $\alpha$  também reduzindo a adiposidade e melhora a ação da insulina melhorando (GUERRE-MILLO, *et al.*, 2000; KIM, *et al.*, 2003), o que pode justificar os efeitos benéficos do ácido caféico.

Assim, fica claro que o ácido caféico exibe propriedades de anti-obesidade, reduz a síntese de colesterol e de ácidos graxos e melhora a sensibilidade à insulina.

### **1.7. Ácido Ferúlico**

Assim como o ácido caféico, o ácido ferúlico é um ácido hidroxicinâmico e é encontrado de forma abundante, como em banana, brócolis, e frutas cítricas (ADISAKWATTANA, *et al.*, 2008).

Este ácido possui diversos efeitos terapêuticos tais como anti-inflamatório anti-aterogênico, anti-diabético, hepatoprotetor, entre outros (SRINIVASAN, *et al.*, 2007).

O ácido ferúlico está diretamente relacionado com o metabolismo de glicose. O ácido ferúlico protege da obesidade induzida pela dieta hipercalórica e melhora o metabolismo da glicose. Nesses animais o tratamento com o ácido ferúlico aumenta a atividade da glicocinase (GK), enzima envolvida na fosforilação inicial da glicose. Por outro lado, a atividade da Glucose-6-fosfatase (G6pase) e da Fosfoenolpiruvato Carboxinase (PEPCK) é diminuída pelo ácido ferúlico, resultando na menor exportação de glicose do hepatócito e na redução da neoglicogênese (SON, *et al.*, 2011).

Além disso, outros estudos demonstraram que suplementação de ácido ferúlico na dieta experimental em ratos espontaneamente hipertensos não altera o consumo de ração nem o nível de glicose plasmático, mas reduz a pressão sanguínea (ARDIANSYAH, *et al.*, 2007).

Já o seu potencial antioxidante se deve pela oxidação de moléculas de LDL pela facilitação de captura e degradação pelo fígado. Assim, é possível que o ácido ferúlico apresente efeitos benéficos na melhora de parâmetros da obesidade e da Síndrome Metabólica (SRINIVASAN, *et al.*, 2007).

O ácido caféico e o ácido ferúlico são os compostos mais abundantes encontrados na planta *Baccharis sp.* Em estudos anteriores do nosso laboratório com ácido caféico e com o ácido ferúlico administrados isoladamente foi observado que o ácido caféico apresentou uma redução no peso corporal dos animais e uma melhora na tolerância a glicose nas doses de 0,9 mg/kg/dia e 1,8 mg/kg/dia. Os triglicérides plasmáticos também foram corrigidos, mas com o tratamento com ácido caféico, mas nenhuma das doses corrigiu a hipercolesterolemia induzida pela dieta. Os animais tratados com ácido caféico na dose 3,6 mg/kg/dia não apresentaram nenhuma melhora nas anormalidades que constituem a SM. Por outro lado, ácido ferúlico 50 mg/kg/dia não preveniu o ganho de peso nos animais, mas reduziu os níveis de colesterol e o triglicérides plasmáticos. Também apresentou efeito importante na correção da intolerância à glicose induzida pela dieta rica em gordura.

Assim, baseados nos dados anteriores, decidimos avaliar o efeito do tratamento concomitante dos dois ácidos sobre os parâmetros da SM. As doses de ácido caféico e ferúlico utilizadas também se basearam nesses dados anteriores.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Principal**

Analisar os efeitos do ácido caféico e ferúlico administrados em conjunto em camundongos submetidos ao modelo de síndrome metabólica induzida pela dieta rica em gordura.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar o papel do ácido caféico e do ácido ferúlico na melhora das anormalidades associadas com a síndrome metabólica.
- 2) Determinar os mecanismos envolvidos na melhora no metabolismo lipídico e de glicose induzidos pelos ácidos caféico e ferúlico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram usados camundongos machos C57/B6, com 2 meses de idade, pesando entre 20 e 25 g, obtidos da colônia da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de claro e escuro, a 24°C e em gaiolas coletivas com não mais que 5 animais por gaiola, tendo comida e água *ad libitum*. Esse tratamento foi realizado no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (CEAU/UPM nº 086/08/2011).

Os grupos estudados foram subdivididos da seguinte forma:

**Controle (CTRL) (n=10):** animais que receberam dieta padrão (1,8 Cal/g);

**Dieta Hipercalórica (DH) (n=10):** animais que receberam dieta hiperlipídica rica em gordura (7,52 Cal/g);

**Dieta Hiper + ácido caféico 0,9 + ácido ferúlico 50 (DH+C0,9+F50) (n=10):** animais que receberam a dieta hiperlipídica rica em gordura (7,52 Cal/g) e o extrato de ácido caféico na dose de 0,9mg/kg/dia por injeção i.p. + o extrato de ácido ferúlico 50mg/kg/dia por injeção i.p.

**Dieta Hiper + ácido caféico 1,8 + ácido ferúlico 50 (DH+C1,8+F50) (n=10):** animais que receberam a dieta hiperlipídica rica em gordura (7,52 Cal/g) e o extrato de ácido caféico na dose de 1,8mg/kg/dia por injeção i.p. + o extrato de ácido ferúlico 50mg/kg/dia por injeção i.p.

Os animais foram alimentados com ração hipercalórica durante 60 dias, tempo necessário para desenvolverem síndrome metabólica. Com 20 dias, foi observado que os animais que consumiam a dieta hipercalórica já apresentavam um quadro de SM, com hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipetrigliceridemia quando comparados aos animais controle. Assim, foi iniciado o tratamento com ácido caféico e ácido ferúlico (SIGMA-ALDRICH, Co, USA), concomitantemente com a dieta hipercalórica. Durante esse período, foi medido diariamente o peso corporal e o consumo de ração.

Ao final do protocolo foram realizados novamente os testes de tolerância à glicose e à insulina para traçar o perfil metabólico. Os animais foram levemente anestesiados com uretana (560mg/kg) e então decapitados e mortos. Foram coletadas amostras de sangue para medidas de colesterol e triglicérides plasmáticos. Amostras do tecido hepático, tecido adiposo branco epididimal e tecido adiposo marrom (TAM) foram retiradas e imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise de RNAm (RNA mensageiro) por PCR em tempo real e Western Blotting. Foram também fixadas em formol tamponado (10%) amostras do tecido hepático e tecido adiposo branco para análise histológica.

### **3.2. Dieta hipercalórica**

A dieta hipercalórica rica em gordura é produzida pela Rhostrer Ind. E Com. Ltda. e é constituída por 19,9% de proteína, 40% de gordura e 19% de carboidratos, totalizando 7,52Cal/g. A dieta padrão produzida pela Nuvilab apresenta 22% de proteína, 4% de gordura e 7% de fibra, resultando em 1,8 Cal/g.

### **3.3. Teste de tolerância à glicose (TTG)**

Os animais foram submetidos a jejum de 12h no dia anterior ao experimento e receberam glicose (2g/Kg de peso corporal) intraperitonealmente na manhã do experimento. Os níveis de glicose sanguíneos foram medidos em amostras do sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (antes da injeção de glicose, sendo conhecido como basal), 30, 60, 90 e 120 minutos depois da injeção de glicose, utilizando-se glicosímetro (One touch Ultra, Johnson&Johnson, São Paulo, SP) (ASENSIO, *et al*, 2005).

### **3.4. Teste de tolerância à insulina (TTI)**

Os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas na manhã do experimento, receberam uma dose de insulina (0,5U/g de peso corporal) intraperitonealmente às 14h. Mediram-se os níveis de glicose sanguíneos em amostras do sangue da cauda retiradas nos tempos 0 (antes da injeção de insulina, sendo conhecido como basal), 30 e 60, 90 e 120 minutos depois da injeção de insulina, utilizando-se glicosímetro (One Touch Ultra, Johnson&Johnson, São Paulo, SP) (ASENSIO *et al.*, 2005).

### **3.5. Medida de Colesterol Plasmático**

O colesterol plasmático foi determinado por colorimetria utilizando-se um kit comercial (COLESTEROL liquiform, Labtest, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante. O teste foi realizado em duplicata utilizando 2µl de plasma de cada amostra ou do padrão e adicionaram-se 200µl do reagente. Posteriormente, foi medida a absorbância das amostras com auxílio do Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA), num comprimento de onda de 500nm.

### **3.6. Medida de Triglicérides Plasmático**

O triglicérides plasmático foi determinado por colorimetria, utilizando-se um kit comercial (TRIGLICÉRIDES Liquiform, Labtest, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante. O teste foi realizado em duplicata utilizando 2µl de plasma de cada amostra ou do padrão e acrescentaram-se 200µl do reagente. Posteriormente, mediu-se a absorbância das amostras com auxílio do Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA), num comprimento de onda de 505nm.

### **3.7. Análise de RNAm por PCR em tempo real**

O RNA total foi extraído do fígado e do TAB com o auxílio da solução de TRizol (Life Technologies Inc.), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA). A sua integridade foi determinada pela corrida em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando as bandas 28S e 18S, e purificação e quantificação do RNA foi determinada pelo cálculo das absorbâncias de 260nm e 280nm.

O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (3,0µg), utilizando-se o kit comercial SuperScrit™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR com o auxílio do termociclador Mastercycler, Eppendorf.

Com o DNAc pronto foi possível realizar o PCR em tempo real, também conhecido por qPCR. Para auxiliar no processo foi utilizado o kit comercial QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia CA) e os primers dos genes alvos para avaliar a expressão do RNAm. Os ciclos foram determinados pelo fabricante do QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia CA) que foram 15 min à 94°C (Hot Start); 15s à 94°C, 30s à 60°C e 30s à

72°C por 50 ciclos seguidos pelo protocolo de melting curve para verificar a especificidade da geração do fragmento amplificado. A expressão do gene foi determinada pelo método de  $\Delta\Delta C_t$ , como descrita por LIVAK e SCHMITTGEN (2001).

Para a avaliação dos genes alvos foi utilizado dois controles internos GAPDH e  $\beta$ -actina. Os genes alvos foram relacionados ao metabolismo de colesterol (LDL-R, SREBP 2, LXR, ACAT-1, HMG-CoA,) triglicerídeos (SREBP-1c, ChREBP, FAS, DGAT 2, MTTP, ATGL) e glicose (G6pase, PPAR- $\alpha$ ). As seqüências dos primers utilizados são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Seqüência dos primers para PCR em tempo real.

Nome do oligonucleotídeo	Seqüência
LDL-R - Sense	5'-TCCAATCAATTCAGCTGTGG-3'
LDL-R - Antisense	5'-GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'
SREBP2 - Sense	5'-CCGCTCTCGAATCCTTAT-3'
SREBP2 - Antisense	5'-CAGCACCTGACTCCAGTGAC-3'
LXRalpha- Sense	5' TGGGCTCCGAATCCTCTTAGA 3'
LXRalpha - Antisense	5' TGGTCTCAAATAAGATCCTTGG 3'
ACAT-1 - Sense	5' CAGGAAGTAAGATGCCTGGAAC 3'
ACAT-1 - Antisense	5' TGCAGCAGTACCAAGTTTAGTG 3'
HMG-CoA - Sense	5' AGCTTGCCCGAATTGTATGTG 3'
HMG-CoA - Antisense	5' TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC 3'
SREBP1-C - Sense	5' AAGCAAATCACTGAAGGACCTGG 3'
SREBP1-C - Antisense	5' AAAGACAAGGGGCTACTCTGGGAG 3'
ChREBP - Sense	5' CCTCACTTCACTGTGCCTCA 3'
ChREBP - Antisense	5' ACAGGGGTTGTTGTCTCTGG 3'
FAS - Sense	5' AAGTTGCCCGAGTCAGAGAACC 3'
FAS - Antisense	5' ATCCATAGAGCCCAGCCTTCCATC 3'
DGAT2 - Sense	5' TTCCTGGCATAAGGCCCTATT 3'
DGAT2 - Antisense	5' CGGAAGTTACCAGCCAACG 3'
MTTP - Sense	5' CTCTTGGCAGTGCTTTTTCTCT 3'
MTTP - Antisense	5' GAGCTTGTATAGCCGCTCATT 3'
ATGL - Sense	5' ATGTTCCCGAGGGAGACCAA 3'
ATGL - Antisense	5' GCAGCCAGCGAATGAGATGT 3'
G6pase - Sense	5' CCGGATCTACCTTGCTGCTCACTTT 3'
G6pase - Antisense	5' TAGCAGGTAGAATCCAAGCGCAAAC 3'
PPAR- $\alpha$ - Sense	5' ACGATGCTGTCTCCTTGATG 3'
PPAR- $\alpha$ - AntiSense	5'GGGGTCAGAGGAAGAGATAAA 3'
$\beta$ -actina - Sense	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3'
$\beta$ -actina - Antisense	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'
GAPDH - Sense	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
GAPDH - Antisense	5' -ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

### 3.8. Western Blotting

Para a identificação de determinada proteína pelo método de Western Blotting, do TAM foi adequadamente processado e submetido à dosagem de proteína total pelo método de Bradford, com o auxílio do equipamento de espectrofotometria Nanodrop 2000c (Thermo

Scientific, USA), em comprimento de onda de 560 nm. Em seguida, as amostras foram preparadas a partir da solubilização em Tampão de Amostra (SDS 2%; glicerol 10%; TRIS Base 0,0625 M pH 6,8; bromofenol blue 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%) e submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Ao término da corrida eletroforética, com o auxílio de um equipamento de transferência em sistema semi-seco, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon, Millipore Co, Bedford MA) em um campo elétrico. Após a etapa de transferência, realizou-se a incubação da membrana com a solução bloqueadora composta de 5% de Albumina Bovina diluída em TBST (Tris-Buffered Saline - Tween 20), por cerca de 1 hora seguido de incubação com o anticorpo primário, correspondente à proteína de interesse, diluído de acordo com as instruções apresentadas pelo fabricante e submetido à refrigeração por aproximadamente 12 horas. A proteína analisada foi a UCP1 (Santa Cruz Biotechnology) e o controle interno  $\beta$ -actina (ABCAM).

Após tal período, a membrana foi submetida a sucessivas lavagens com TBST e, posteriormente, incubada com uma solução do anticorpo secundário por aproximadamente 1 hora. Em seguida, iniciou-se o processo de detecção da proteína de interesse por meio do processo de revelação, o qual foi realizado em câmara escura e envolveu a incubação da membrana em soluções contendo reagentes de quimioluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific), os quais reagem com a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário (HRP) e promovem a produção de luminescência proporcionalmente à quantidade da proteína de interesse, possibilitando a detecção desta.

### **3.9. Histologia**

Depois da dissecação cuidadosa, amostras de fígado e TAB foram imersos em uma solução de formol 10% e fixados por 24 horas, após esse período foram armazenados em água destilada. Os tecidos incorporados na parafina foram seccionados e processados. As amostras foram coradas por Hematoxilina/Eosina (HE). A área do adipócito branco foi estimada por análise de imagens fotografadas em amplificação de 100X no microscópio óptico (Axioskop 2 plus, Zeiss). As imagens foram analisadas pelo programa AxionVision Rel. 4.6. calculando a área de 40 adipócitos por animal.

### **3.10. Análise Estatística**

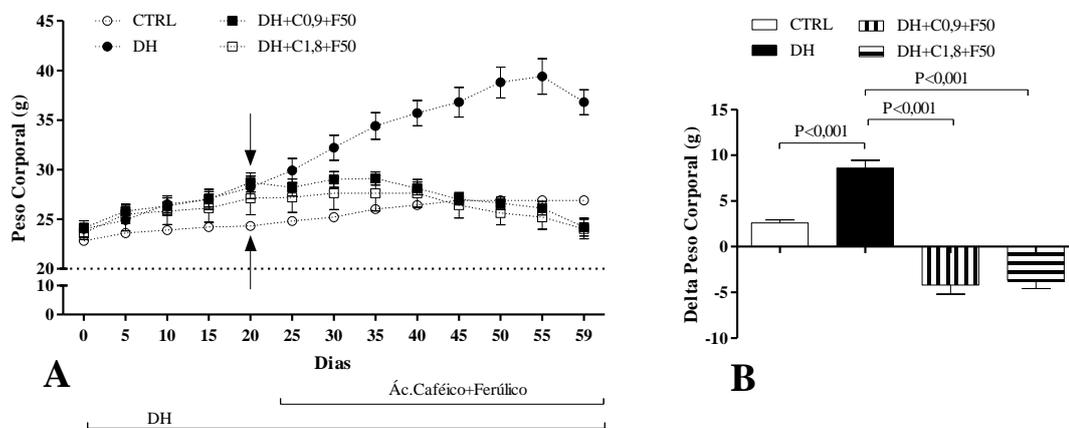
A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos foi testada pela Anova One-way, seguido do teste Student-Newman-Keuls para detectar diferenças entre os grupos. Para a realização dos testes estatísticos e construção dos gráficos foi utilizado o software Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todos os testes  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todos os resultados foram expressos como média e erro padrão (EP).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso corporal e Consumo de Ração

Com objetivo de determinar a ação do ácido caféico e do ácido ferúlico na obesidade induzida pela dieta, os animais foram tratados com dieta hipercalórica por 20 dias e então foi iniciada a administração dos ácidos.

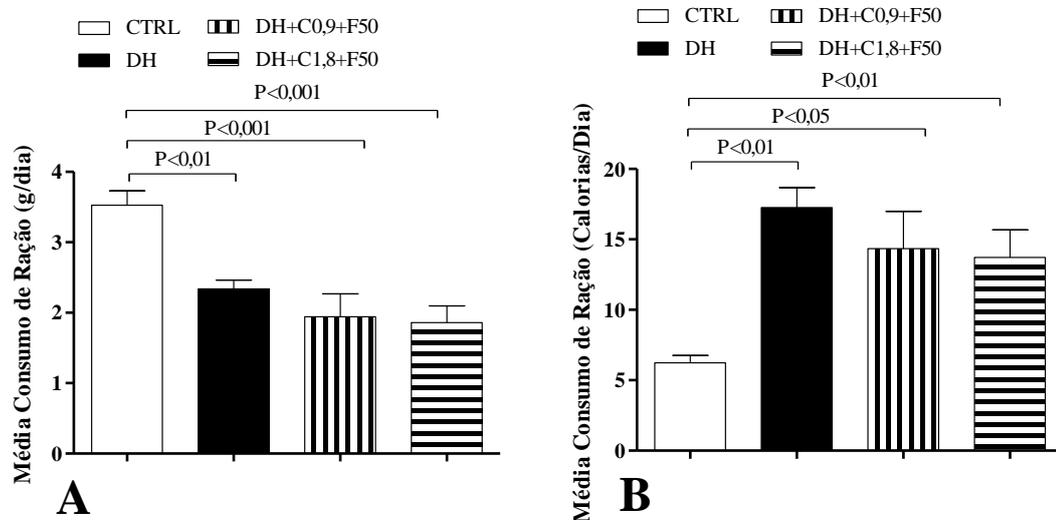
Ao início do estudo os grupos apresentavam peso corporal similar e a dieta hipercalórica induziu ao aumento significativo do peso quando comparados com os animais tratados com dieta padrão (Figura 4A). Após o início do tratamento podemos observar que os ácidos levaram a perda de peso significativa destes animais, corrigindo totalmente a obesidade induzida pela dieta hipercalórica (Figura 4B).



**Figura 4:** A) Peso Corporal, a seta indica o início do tratamento dos animais tratados com ácido caféico e ácido ferúlico; B) Delta do peso corporal dos camundongos após o início do tratamento com os ácidos. CTRL tratados com dieta padrão, DH tratados com dieta hipercalórica, do grupo tratado DH+C0,9+F50 e do grupo tratado com DH+C1,8+F50 durante 60 dias. Os valores estão expressos com média  $\pm$  EP.

Para confirmar que os animais tratados com dieta hipercalórica estavam realmente ingerindo mais calorias e que o efeito em reduzir o peso corporal não foi devido a alterações na ingestão calóricas, nós mensuramos a ingestão alimentar. Os camundongos tratados com dieta hipercalórica apresentaram um consumo de ração em gramas menor do que os animais tratados com a dieta padrão (Figura 5A), mas os animais tratados com a ração hipercalórica consumiram três vezes mais calorias do que os animais controle (Figura 5B). Além disso, os

animais tratados com os ácidos caféico e ferúlico ingeriram quantidades de ração em gramas e em calorias semelhantes.

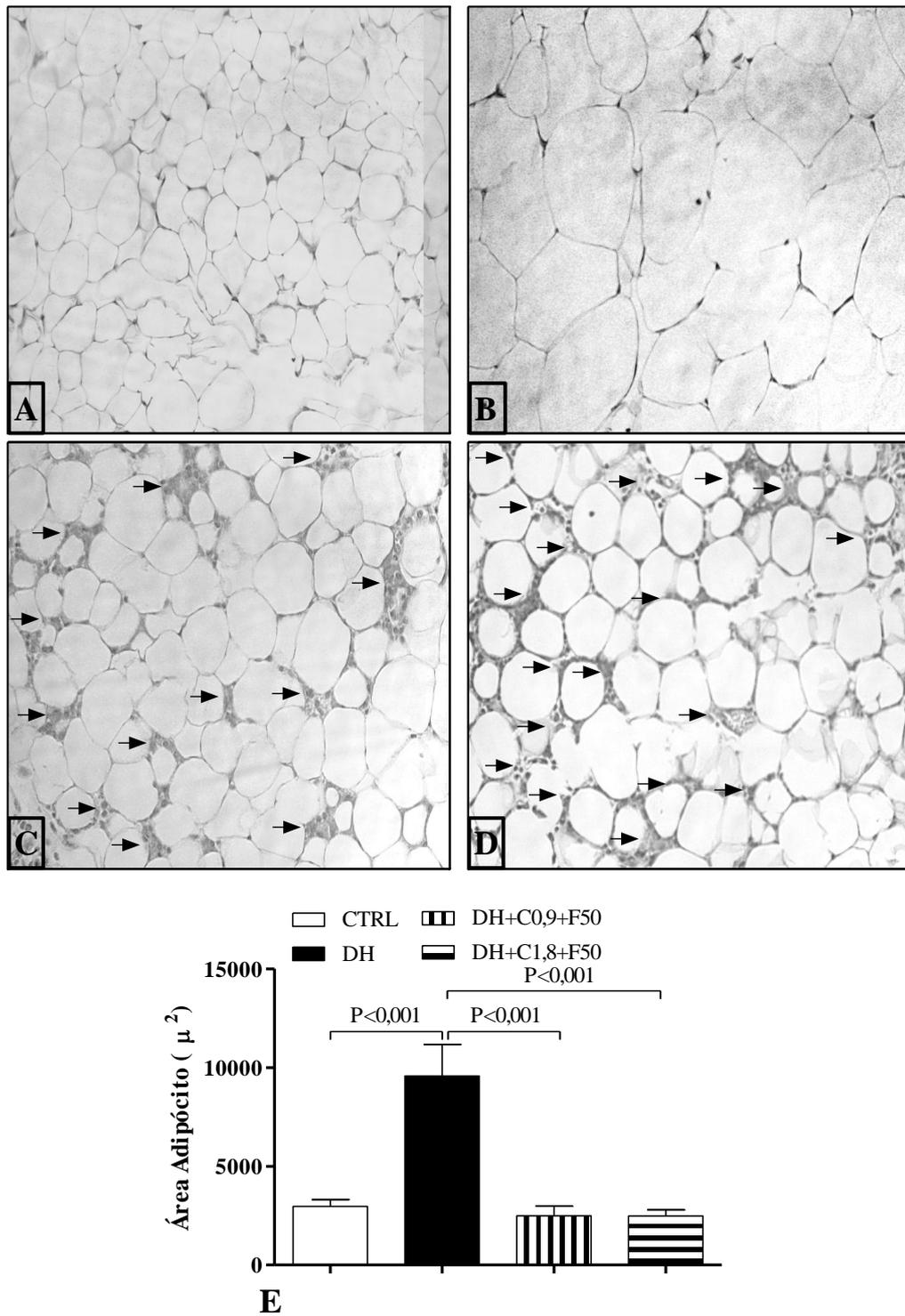


**Figura 5:** A) Média do Consumo de ração diária animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50, DH+C1,8+F50 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica; B) Média do Consumo de calorias diária dos camundongos CTRL, DH, DH+C0,9+F50, DH+C1,8+F50 durante tratamento com dieta padrão ou hipercalórica. Os valores estão expressos como média ± EP.

#### 4.2. Histologia do Tecido Adiposo Branco

A fim de confirmar que a redução no peso corporal foi devido à diminuição da massa gorda, nós avaliamos os adipócitos do tecido adiposo branco epididimal. Como podemos observar nas figuras 6A, 6B, 6C, 6D e 6E, o tratamento com a dieta hipercalórica leva a um aumento significativo dos adipócitos em relação aos animais controles. O tratamento com os ácidos reduz o tamanho dos adipócitos sendo similar ao dos animais controles.

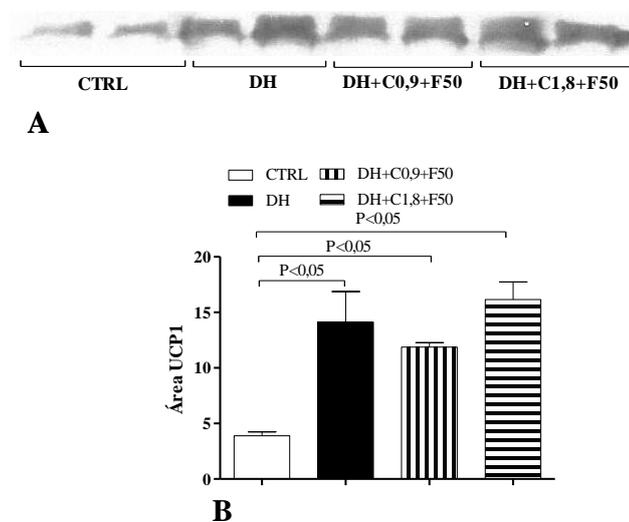
No entanto, observou-se infiltração importante de células de defesa no conjuntivo do tecido adiposo branco, sugerindo inflamação deste tecido. Esse processo inflamatório só foi observado nos animais tratados com ácido ferúlico e do ácido caféico (Figura 6C e 6D). Os animais tratados com DH+C1,8+F50, apresentaram inflamação maior que a dos animais tratados com DH+C0,9+F50, sugerindo que o ácido caféico seja o ácido responsável pela inflamação.



**Figura 6:** Histologia do Tecido adiposo Branco. A) CTRL corado com HE; B) DH corado com HE; C) DH+C0,9+F50 corado com HE; D) DH+C1,8+F50 corado com HE e E) Área estimada do adipócito epididimal individual; 40 células de cada grupo foram analisadas. As setas nas figuras 6C e 6D indicam infiltração de macrófagos no Tecido Adiposo Branco. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP. Amplificação 200X.

### 4.3. Dosagem de Proteína no Tecido Adiposo Marrom

O Tecido Adiposo Marrom é especializado em realizar a termogênese, sendo fundamental na regulação da temperatura e do peso corporal (CANNON, *et al.*, 2004). Uma possível explicação para a redução do peso corporal induzida pelo ácido caféico e ferúlico seria a indução da ativação do TAM. Para inferir se esse tecido de fato estava ativado, foi medida a expressão da UCP-1. Como podemos ver nas Figuras 7A e 7B, a UCP1 está aumentada nos animais alimentados com dieta rica em gordura, mas os ácidos não levaram a maior expressão dessa proteína.



**Figura 7:** A) Gel de poliacrilamida com a expressão da proteína UCP-1. B) Determinação da expressão da proteína UCP-1 de animais tratados com ácido caféico e ácido ferúlico mais a dieta hipercalórica e com dieta padrão, por Western Blotting.

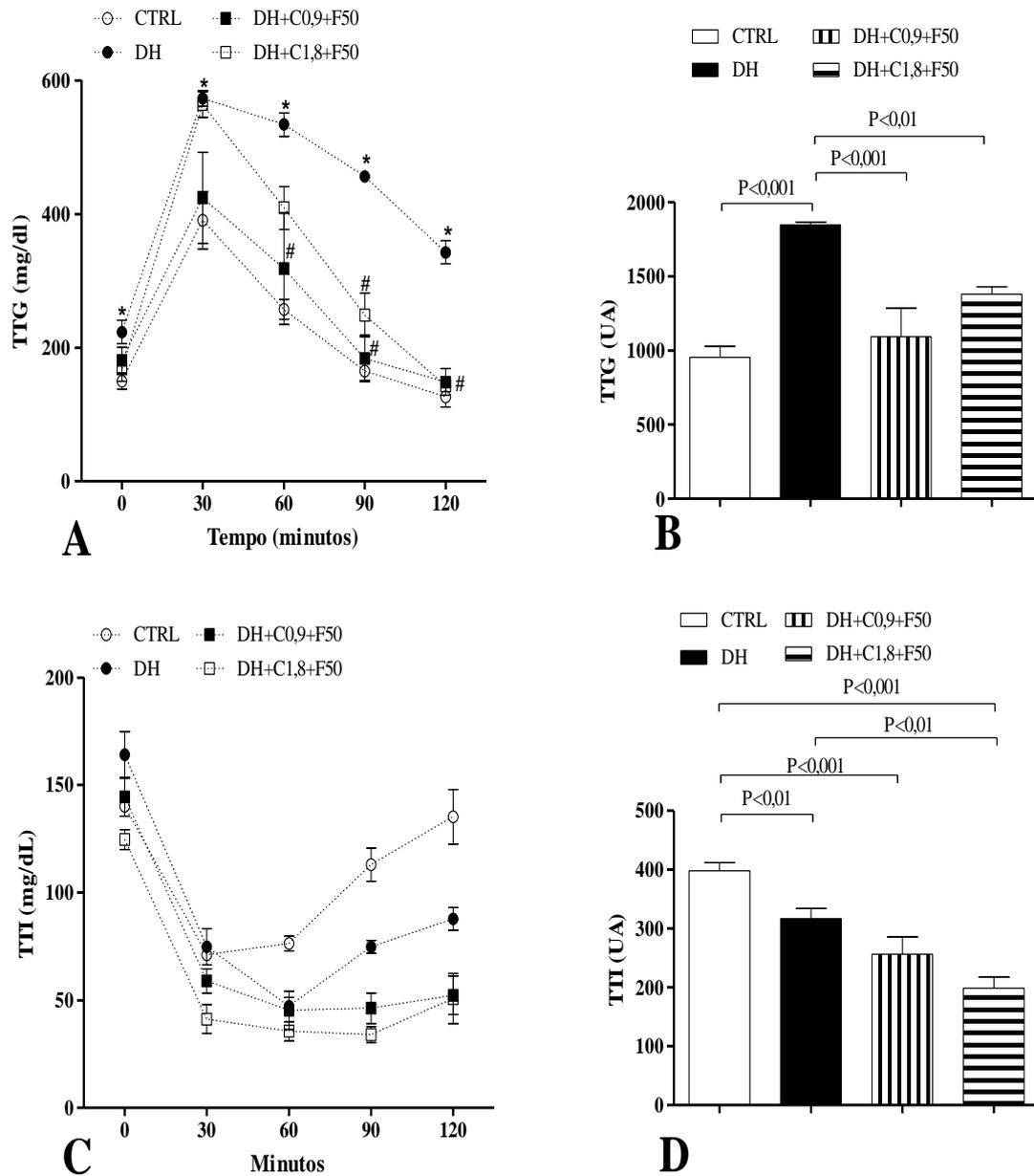
### 4.4. Efeito do ácido caféico e do ácido ferúlico no metabolismo de glicose

#### 4.4.1. Homeostase de glicose

A fim de compreender melhor os efeitos do ácido caféico e ácido ferúlico sobre o metabolismo de glicose dos animais tratados com dieta hipercalórica, foi medida a resposta glicêmica pelo teste de tolerância à glicose (TTG) e pelo teste de tolerância à insulina (TTI).

O tratamento com dieta hipercalórica levou à hiperglicemia de jejum e à menor tolerância à glicose e insulina. O tratamento com os ácidos caféico e ferúlico nas duas doses

estudadas melhorou significativamente o metabolismo de glicose, como podemos observar nas Figuras 8A, 8B, 8C e 8D.

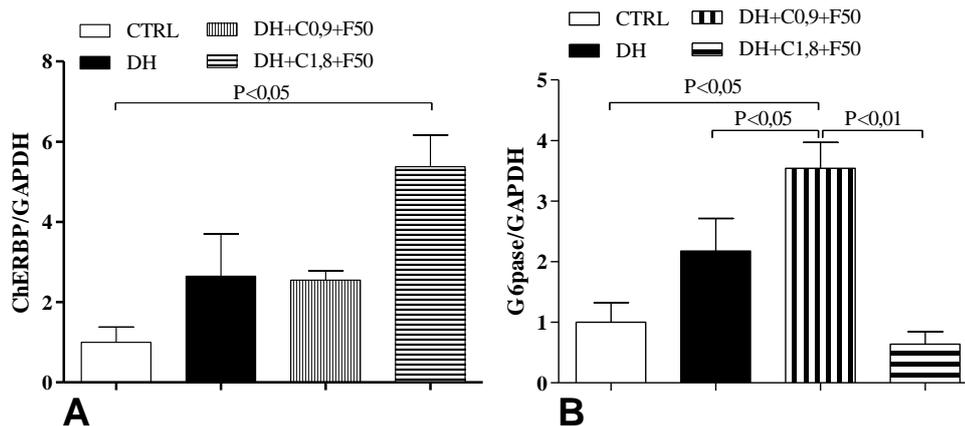


**Figura 8:** A) Teste de tolerância à glicose (GTT): dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, foi medida a glicemia no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. \* vs CTRL  $p < 0,05$ ; # vs DH  $p < 0,05$ . B) Área sob a curva do GTT dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50 por Unidade Arbitrária. C) Teste de tolerância à insulina (ITT): dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, foi medida a glicemia no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. D) Área sob a curva do ITT dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50 por Unidade Arbitrária. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP.

#### 4.4.2. Determinação da expressão gênica no metabolismo de glicose

O tratamento com ácido caféico e ferúlico melhora o metabolismo de glicose, reduzindo a intolerância à glicose.

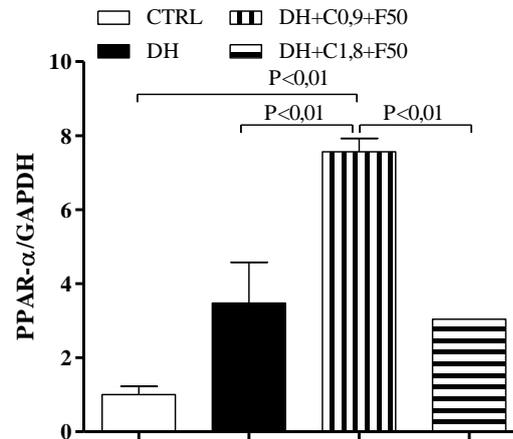
Contrariando a literatura, a expressão gênica da enzima G6pase não aumentou significativamente em resposta ao tratamento com dieta hipercalórica, embora apresente tendência de aumento, sugerindo que a exportação de glicose esteja aumentada nesses animais justificando sua hiperglicemia (Figura 9). Surpreendentemente, apesar dos ácidos caféico e ferúlico na dose DH+C0,9+F50, respectivamente, melhorarem o metabolismo de glicose, a expressão gênica do G6pase encontra-se muito aumentada quando comparada aos animais controle e tratados com dieta hipercalórica. No entanto, na figura 9, podemos observar que o mesmo tratamento levou a um aumento importante na expressão gênica do ChREBP, fator de transcrição que ativa a enzima piruvato quinase, envolvida na fase final da glicólise, transformando fosfoenol piruvato em piruvato (IIZUKA, *et al.*, 2008). Assim, é possível que a glicose esteja sendo liberada para a via glicolítica e não exportada para o plasma.



**Figura 9:** Determinação do nível de RNAm do gene G6pase dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. Comparado com o controle interno GAPDH. Os valores estão representados com Média ± EP.

O PPAR- $\alpha$  apresenta uma ação anti-inflamatória melhorando a sensibilidade à insulina (VAN RAALTE, *et al.*, 2004). Além disso, induz a beta-oxidação de ácidos graxos regulando a homeostase energética por atuar diretamente no TAB e no fígado (VAN RAALTE, *et al.*, 2004). Como podemos ver na Figura 10, o tratamento com o ácido caféico na menor dose induziu ao aumento na expressão gênica do PPAR- $\alpha$ , o que sugere que há

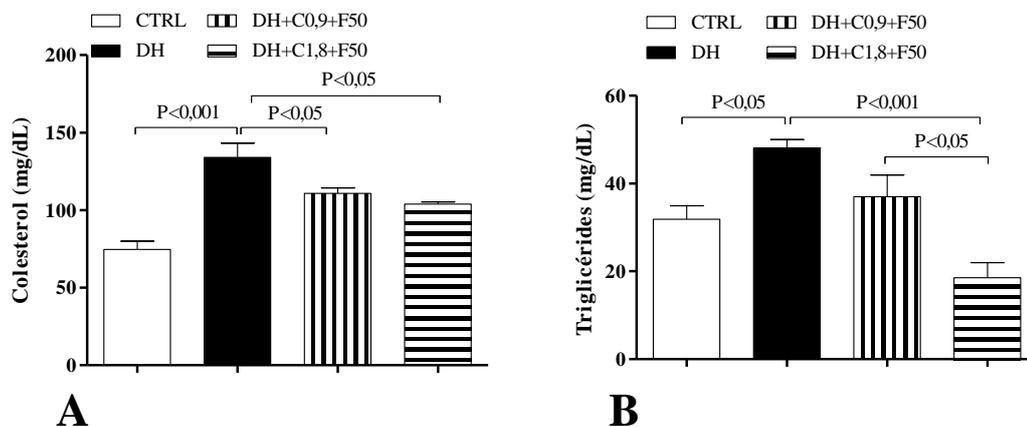
oxidação de ácidos graxos no fígado esteja aumentada assim como a ação da insulina esteja melhorada, por meio desse fator de transcrição.



**Figura 10:** Determinação do nível de RNAm do gene PPAR- $\alpha$  dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. Comparado com o controle interno GAPDH. Os valores estão representados com Média  $\pm$  EP.

#### 4.5. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides

Os níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos foram mensurados a fim de avaliar a influência dos ácidos no metabolismo lipídico (Figura 11A e 11B). Os animais com dieta hipercalórica exibiram aumento nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides quando comparados com os animais com dieta padrão. O tratamento com os ácidos corrigiu as alterações nos lípides plasmáticos induzidos pela dieta hipercalórica.

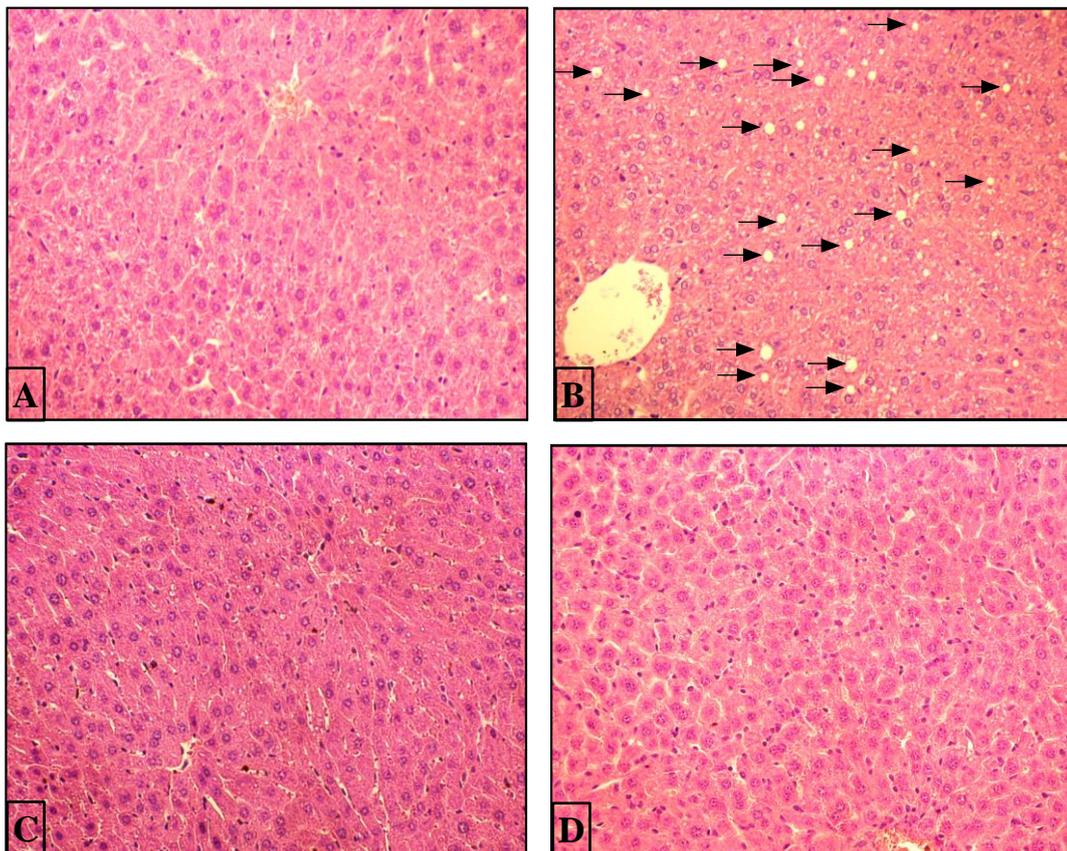


**Figura 11:** A) Nível de colesterol plasmático dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50. B) Nível de triglicérides plasmático dos animais CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP.

## 4.6. Alterações no Tecido Hepático

### 4.6.1 Histologia do Tecido Hepático

A análise histológica do tecido hepático mostrou que o uso da ração hipercalórica induziu esteatose nos camundongos (Figura 12B). Quando os animais foram tratados com os ácidos caféico e ferúlico, observou-se que esse tratamento reverteu inteiramente a esteatose induzida pela dieta resultando em um fígado histologicamente saudável semelhante ao dos animais controle (figura 12A, 12C e 12D).



**Figura 12:** Histologia do fígado. A) CTRL corado com HE; B) DH corado com HE; C) DH+C0,9+F50 corado com HE; D) DH+C1,8+F50 corado com HE. As setas na figura B indicam a esteatose Hepática encontrada nos animais tratados apenas com dieta hipercalórica. Amplificação 200 X.

Para compreender os mecanismos pelos quais os ácidos caféico e ferúlico melhoraram a hiperglicemia e as dislipidemias alteradas pela obesidade induzida pela dieta, foi medida a expressão gênica de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de glicose e no metabolismo lipídico no fígado.

## 4.6.2. Determinação da expressão gênica

### 4.6.2.1. Metabolismo de Síntese de Triglicérides

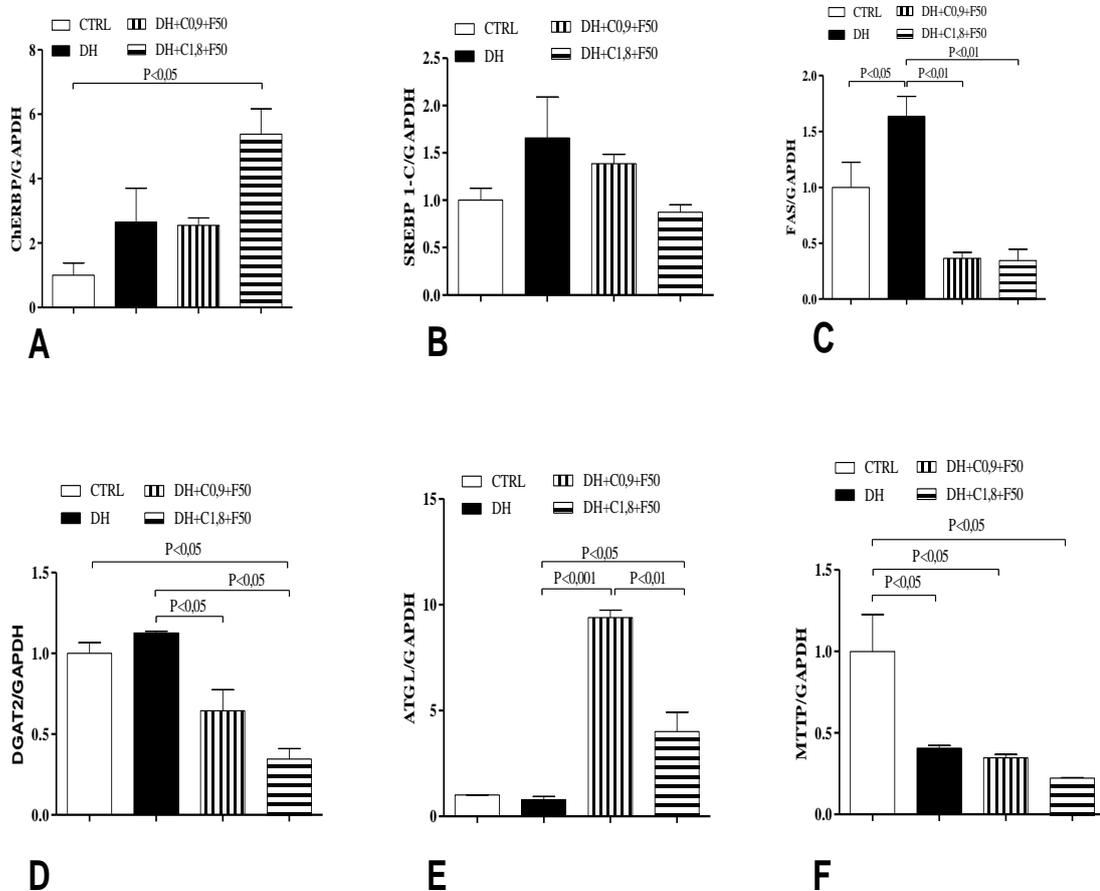
A fim de compreender os efeitos dos ácidos caféico e ferúlico na lipogênese hepática, foram medidos os níveis de RNAm para os genes da SREBP-1c e ChREBP, fatores de transcrição ativados pela insulina e glicose, respectivamente. Esses fatores estão envolvidos na síntese de ácidos graxos por estimularem a enzima ácido graxo sintetase (FAS). O tratamento com a dieta não aumentou significativamente o RNAm para o ChREBP, embora haja uma tendência de aumento. Já o tratamento com DH+C1,8+F50, aumentou significativamente a expressão gênica desse fator de transcrição (Figura 13A), mas não houve diferença significativa nos níveis de RNAm para o SREBP-1c (Figura 13B).

Analizamos a enzima FAS, pois ela participa da síntese final de ácidos graxos. Como podemos observar na Figura 13C, essa enzima está aumentada nos animais tratados com dieta hipercalórica em comparação aos animais tratados com dieta padrão. Apesar do tratamento com os ácidos ter aumentado a expressão gênica do ChREBP, fator de transcrição que estimula a FAS, a expressão gênica dessa enzima está reduzida nesses mesmos animais até mesmo quando comparados aos animais controles, sugerindo que a síntese de ácidos graxos seja inibida pelos ácidos estudados. Assim, o tratamento ácido ferúlico e com o ácido caféico, parecem reduzir a síntese de ácidos graxos no fígado (Figura 13C).

Além disso, a via final de biossíntese de triglicérides também está inibida, uma vez que o RNAm para a DGAT-2, enzima que cataliza a síntese de triglicérides a partir de ácidos graxos, está significativamente diminuída nos animais tratados com os ácidos caféico e ferúlico (Figura 13D).

Além dos ácidos ferúlico e caféico reduzirem a síntese de lipídeos, eles também aumentam a via lipolítica nos hepatócitos. A expressão gênica da ATGL, enzima que quebra o triglicérides, está aumentada no fígado dos animais tratados com ácido ferúlico e ácido caféico (Figura 13E). A transferência de triglicérides para formação da VLDL está diminuída, pois a expressão gênica da MTTP, enzima que participa de forma importante desse processo, está reduzida nos animais tratados com os ácidos (Figura 13F).

Em resumo, o tratamento com ácido caféico e ferúlico em animais alimentados com dieta hipercalórica reduziu a síntese de triglicérides e aumentou a lipólise no fígado, prevenindo a esteatose hepática induzida pela dieta.



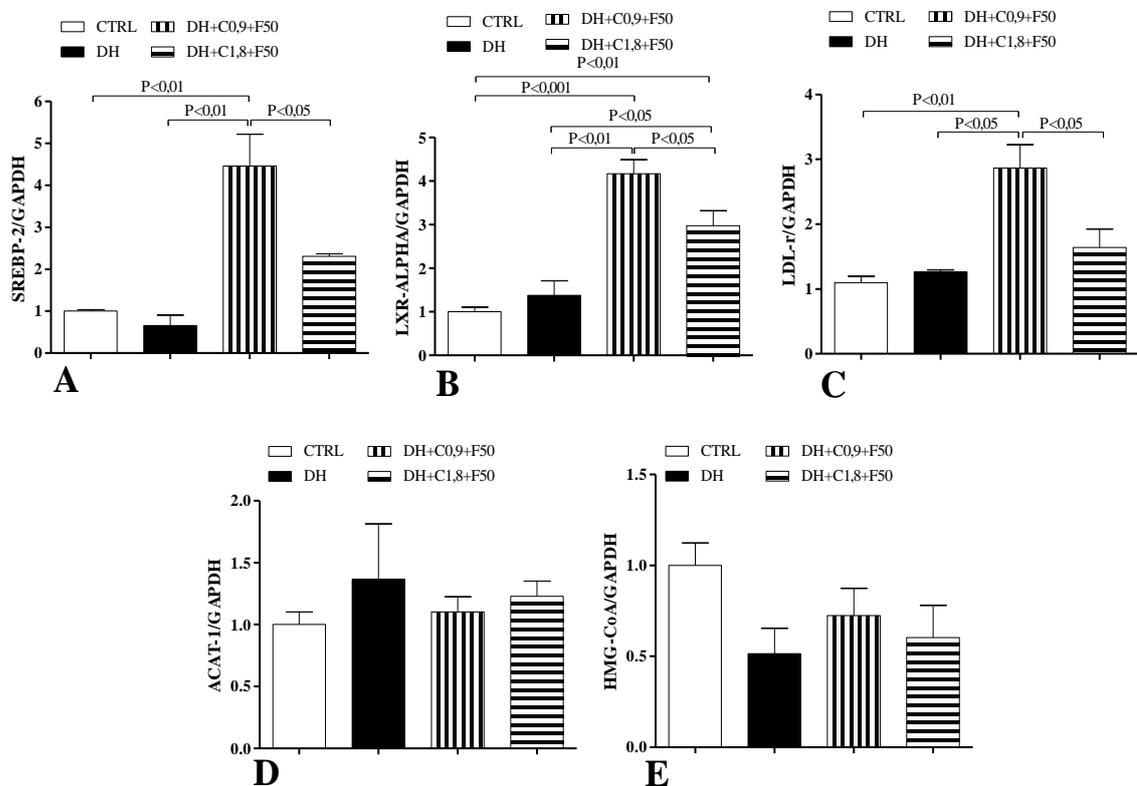
**Figura 13:** A) Determinação do nível de RNAm do gene ChREBP dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-1c dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene FAS dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. D) Determinação do nível de RNAm do gene DGAT-2 dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. E) Determinação do nível de RNAm do gene ATGL dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. F) Determinação do nível de RNAm do gene MTTP dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. Todos em comparação com o controle interno GAPDH. Os valores estão representados com Média  $\pm$  EP.

#### 4.6.2.2. Metabolismo de Síntese de Colesterol

O tratamento com os ácidos caféico e ferúlico reduziu o colesterol de forma significativa (Figura 14A). A fim de compreender melhor os mecanismos envolvidos nesse processo, nós estudamos diversos reguladores da via de síntese e degradação do colesterol.

A expressão gênica do fator de transcrição SREBP-2 (Figura 14A), do LXR (Figura 14B) e o do LDL-R (Figura 14C) foram aumentadas pelo tratamento com os ácidos. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a síntese e a captura de colesterol no hepatócito estão aumentadas por ação da SREBP-2 e do LDL-R, respectivamente. Em contrapartida, a degradação do colesterol pela via de síntese de sais biliares está também estimulada pela ação do LXR. O resultado da interação entre esses reguladores é a diminuição significativa do colesterol plasmático.

Surpreendentemente, a expressão gênica da enzima ACAT não apresentou diferença entre os grupos estudados (Figura 14D). Da mesma forma, a expressão gênica da HMG-CoA reductase não foi alterada pelo tratamento com os ácidos, embora esteja descrito na literatura que essa enzima chave na síntese de colesterol seja inibida pelo ácido caféico (Figura 14E).



**Figura 14:** A) Determinação do nível de RNAm do gene SREBP-2 dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. B) Determinação do nível de RNAm do gene LXR- $\alpha$  dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. C) Determinação do nível de RNAm do gene LDL-r dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. D) Determinação do nível de RNAm do gene ACAT-1 dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. E) Determinação do nível de RNAm do gene HMG-CoA reductase dos grupos CTRL, DH, DH+C0,9+F50 e DH+C1,8+F50, por PCR em tempo real. Todos em comparação com o controle interno GAPDH. Os valores estão representados com Média  $\pm$  EP.

## 5. DISCUSSÃO

A Síndrome Metabólica foi caracterizada pela primeira vez em 1988, por Gerald Reaven e ficou conhecida também como Síndrome da resistência a insulina (REAVEN, 1988). A SM apresenta diversas alterações no metabolismo energético e lipídico tais como, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia (SANTOS, *et al.*, 2006; ALBERTI, *et al.*, 2006; HELLERSTEIN, *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, *et al.*, 2010; DODSON, *et al.*, 2011).

Os nossos resultados mostraram que o tratamento simultâneo com os ácidos caféico e ferúlico foi capaz de prevenir a obesidade induzida pela dieta, assim como todas as anormalidades relacionadas à SM.

Nesse estudo avaliamos o efeito do ácido caféico em duas doses diferentes, 0,9 e 1,8 mg/kg de peso corporal, e uma dose de ácido ferúlico. Essa escolha se baseou em estudo piloto realizado em nosso laboratório utilizando os ácidos separadamente em camundongos em diversas doses crescentes. Esse estudo mostrou que as doses utilizadas foram as mais eficientes em corrigir o peso corporal, a tolerância à glicose e as dislipidemias induzidas pela dieta rica em gordura. Embora os efeitos biológicos tenham sido muito semelhantes em ambas às doses, a expressão gênica sugere que a melhor dose de ácido caféico a ser utilizada é a de 0,9 mg/Kg de peso corporal.

Os ácidos caféico e ferúlico reduziram significativamente o peso corporal, mesmo ingerindo uma quantidade maior de calorias quando comparados com aos animais tratados com dieta padrão. Foi possível confirmar este resultado pela histologia do TAB, uma vez que os adipócitos dos animais tratados com os ácidos apresentaram tamanho semelhante aos dos animais alimentados com dieta padrão.

O mecanismo pelo qual o tratamento com os ácidos preveniu o ganho de peso corporal permanece a ser esclarecido, pois não houve diferença na expressão da UCP-1 no TAM dos animais que receberam ácido caféico e ferúlico. O TAM é o principal sítio de termogênese facultativa e é fundamental para a regulação do peso corporal e (CANNON, *et al.*, 2004). Esses resultados indicam que o TAM não é ativado pelos ácidos caféico e ferúlico.

Nossos resultados mostram que o tratamento com ácido caféico e ferúlico corrigiu a hiperglicemia de jejum e melhora o metabolismo de glicose nos animais. Esse efeito parece ser devido ao aumento na expressão gênica do ChREBP nos animais tratados com DH+C0,9+F50, fator de transcrição que ativa a enzima piruvato quinase, envolvida na fase final da glicólise, transformando fosfoenol piruvato em piruvato (IIZUKA, *et al.*, 2008). Assim, é possível que a glicose esteja sendo direcionada para a via glicolítica e não exportada para o plasma. Surpreendentemente, a expressão gênica da G6pase, enzima que transforma a glicose-6P em glicose e que normalmente está associada à liberação de glicose para o plasma, está aumentada em animais tratados com os ácidos estudados. É possível imaginar que a glicose livre está sendo levada para a via glicolítica e não exportada para o plasma se levarmos em conta o aumento na expressão da ChREBP.

Além dos efeitos diretos sobre a via de metabolismo da glicose, os ácidos caféico e ferúlico também aumentam a expressão gênica do PPAR- $\alpha$  nos hepatócitos. O aumento desse fator anti-inflamatório pode resultar em aumento na oxidação de ácidos graxos no fígado assim como na melhora da ação periférica da insulina. Além disso, o PPAR- $\alpha$  apresenta efeito benéfico sobre as células pancreáticas  $\beta$  (WILSON, *et al.*, 1997; GUERRE-MILLO, *et al.*, 2000; KIM, *et al.*, 2003).

Um dos resultados mais impactantes do presente estudo foi o efeito do tratamento com ácido ferúlico e caféico sobre a correção das alterações no metabolismo de lipídeos induzido pela obesidade. Os ácidos reduziram significativamente os níveis plasmáticos de triglicérides e de colesterol, além de proteger o fígado da esteatose hepática, apesar da dieta ingerida pelos animais conter alta quantidade de gordura. Os mecanismos envolvidos parecem ser a redução da síntese de ácidos graxos e triglicérides e o aumento da lipólise nos hepatócitos.

É conhecido que em animais tratados com dieta hipercalórica observa-se aumento na expressão de fatores de transcrição envolvidos na síntese de gorduras, tais como o SREBP-1c e o ChREBP, responsivos à insulinemia e à glicemia, respectivamente (HORTON, *et al.*, 2002; POLACOW, *et al.*, 2007). O tratamento com DH+C1,8+F50, aumentou significativamente a expressão gênica do ChREBP, fator de transcrição que ativa a Ácido Graxo Sintetase (FAS), responsável por catalisar a última etapa da biossíntese de ácidos graxos no fígado (FON, *et al.*, 2011). De fato, a expressão gênica da FAS aumentou

significativamente no fígado de animais tratados com dieta hipercalórica apenas. No entanto, os animais tratados com os ácidos apresentaram uma redução nesta enzima, sugerindo que a síntese de ácidos graxos hepática esteja sendo inibida pelos ácidos estudados, reduzindo a síntese de ácidos graxos no fígado, confirmando os resultados presentes na literatura (CHO, *et al.*, 2010).

O ácido caféico e o ácido ferúlico também parecem inibir a síntese de triglicérides pelos hepatócitos, uma vez que a DGAT-2, enzima que cataliza a síntese final de triglicérides a partir de ácidos graxos, está significativamente diminuída nos animais tratados com os ácidos. Além de os ácidos caféico e ferúlico reduzirem a síntese de lipídeos, eles também parecem aumentar a via lipolítica nos hepatócitos. A expressão gênica da ATGL, enzima que quebra o triacilglicerol, favorece o controle intracelular de triglicérides no fígado e confere resistência à formação de esteatose hepática (FON, *et al.*, 2011). A expressão gênica da ATGL está significativamente aumentada nos animais tratados com os ácidos ferúlico e caféico. Assim, tomados em conjunto, nossos dados sugerem fortemente que o tratamento com os ácidos caféico e ferúlico reduziu a quantidade de gordura armazenada no fígado, revertendo inteiramente a esteatose induzida pela dieta, resultando em um fígado histologicamente saudável.

Além dos mecanismos relacionados à síntese de ácidos graxos e triglicérides, o fígado está envolvido no metabolismo de lipoproteínas que apresentam papel fundamental na manutenção da homeostase lipídica plasmática (FON, *et al.*, 2011). A expressão gênica da MTTP, enzima que participa de forma importante desse processo, está reduzida nos animais tratados com dieta hipercalórica apenas. É possível que do RNAm tenha sofrido metilação para MTTP pela dieta hipercalórica como descrito na literatura, o que explica o acúmulo de triglicérides e de esteatose no fígado (CHANG, *et al.*, 2010). Nos animais tratados com os ácidos caféico e ferúlico também observamos que a expressão gênica dessa proteína também está reduzida quando comparada aos animais controle, mas não aos animais tratados com a dieta. Como a síntese de ácidos graxos e síntese de triglicérides nos hepatócitos encontra-se bastante diminuída, a redução da expressão da MTTP não leva ao acúmulo de gordura no fígado. Nossos resultados, portanto, sugerem que a transferência de triglicérides para formação da molécula de VLDL nesses animais tratados com os ácidos está significativamente reduzida.

O ácido caféico e ferúlico atuam também na via de síntese de colesterol. Como já mencionado anteriormente, o SREBP-2 e LXR participam da regulação do colesterol hepático. O SREBP-2 aumenta a captura e a síntese de colesterol, enquanto o LXR estimula a transporte de colesterol para a molécula de VLDL que é secretada pelo fígado (BROWN, *et al.*, 1997; PEET, *et al.*, 1998). Além disso, estimula a utilização do colesterol na via de síntese dos ácidos biliares (BROWN, *et al.*, 1997; PEET, *et al.*, 1998). É importante ressaltar que quando a via do SREBP-2 está ativada a via do LXR esta inibida e vice-versa (BROWN, *et al.*, 1997).

Assim, os resultados dos animais tratados com os ácidos foram surpreendentes, principalmente no grupo com a menor dose de ácido caféico (DH+C0,9+F50), pois apresentaram um aumento na expressão gênica de ambos os genes, em contraste com os animais do grupo controle e do grupo tratado com ração hipercalórica apenas. Assim, tanto a captura e síntese, quanto a degradação e exportação de colesterol estão aumentadas por ação do ácido caféico e ferúlico, resultando em aumento do fluxo de colesterol hepático, sem causar esteatose hepática ou hipercolesterolemia. Esses dados são relevantes, uma vez que drogas que estimulam o LXR reduzem o colesterol plasmático, mas levam à esteatose hepática (BROWN, *et al.*, 1997; PEET, *et al.*, 1998).

Confirmando esses resultados a expressão gênica do LDL-R, receptor para LDL envolvido na captura hepática de colesterol e estimulado pela SREBP-2, também aumentou em resposta ao tratamento com os ácidos caféico e ferúlico. Esses resultados confirmam dados da literatura que mostram que o ácido ferúlico facilita a captura de moléculas de LDL e a degradação do colesterol pelo fígado (SRINIVASAN, *et al.*, 2007).

Segundo CHO (*et al.*, 2010), o ácido caféico atua na redução da HMG-CoA reductase, enzima chave da via de síntese de colesterol, e na redução da enzima ACAT, que é responsável pela esterificação de colesterol intracelular e pela incorporação do colesterol na molécula de VLDL que é exportada para o plasma (BROWN, *et al.*, 1997; RIFAI *et al.*, 1999). Em nossos estudos não foi possível confirmar estes dados da literatura, pois não houve diferença na expressão gênica da enzima ACAT e HMG-CoA reductase entre os grupos estudados.

Portanto, nossos dados mostram que o tratamento com ácido caféico e ácido ferúlico reverte a hipertrigliceridemia e a esteatose hepática induzida pela dieta rica em gordura por

reduzir a síntese e aumentar a degradação hepática de gorduras. Seu efeito na redução do colesterol plasmático parece ser devido ao aumento na captação e degradação hepática de colesterol.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que o tratamento combinado de ácido caféico com ácido ferúlico exibem propriedades de anti-obesidade, reduzindo o peso corporal. Além disso, melhoram o metabolismo de glicose e o metabolismo lipídico reduzindo a síntese de colesterol e triglicérides, prevenindo o aparecimento de esteatose hepática induzida pela dieta rica em gordura. É possível sugerir que o ácido caféico e ácido ferúlico podem ser utilizados de forma terapêutica contra a obesidade. No entanto, mais estudos têm que ser realizados para avaliar seu efeito inflamatório no tecido adiposo branco.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica [homepage da internet]. São Paulo. [Acesso em 21/11/2012]. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/lenoticia/876/oms:-obesidade-mata-28-milh%C3%B5es-por-ano.shtml>

ADISAKWATTANA, S.; MOONSAN, P.; YIBCHOK-ANUN, S. Insulin-releasing properties of a series of cinnamic acid derivatives in vitro and in vivo. **J Agric Food Chem.** V. 56, p. 7838-7844, 2008.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. **Diabe Med.** V. 23, p. 469-480, 2006.

ASENSIO, C.; JIMENEZ, M.; KUHNE, F.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; MUZZIN, P. The lack of  $\beta$ -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. **Diabetes.** V. 54, n. 12, p. 3490-3495, 2005.

ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F. Sibutramine Effects on Central Mechanisms Regulating Energy Homeostasis. **Curr Neuropharmacol.** V. 10, p. 49-52, 2012.

ARDIANSYAH; SHIRAKAWA, H.; KOSEKI, T.; *et al.* The Driselase-treated fraction of rice bran is a more effective dietary factor to improve hypertension, glucose and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats compared to ferulic acid. **Br J Nutr.** V. 97, p. 67-76, 2007.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann Med.** V. 27, p. 435-438, 1995.

ARONNE, L. J.; ISOLD, K. K. Overweight and Obesity: Key Components of Cardiometabolic Risk. **Clin Cornerstone.** V. 8, p. 29-37, 2007.

BERG, A. H.; COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trend Endocrinol Metab.** V. 13, p. 84-89, 2002.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ. Res.** V. 96, p. 939-949, 2005.

- BERGMAN, R. N.; ZACCARO, D. J.; WATANABE, R. M.; *et al.* Minimal model-base insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. **Diabetes**. V. 52, p. 2168-2174, 2003.
- BEZERRA, R. M. N.; VEIGA, L. F.; CAETANO, A. C.; *et al.* Caffeic acid phenethyl Ester reduces the activation of the nuclear factor kB pathway by high-fat diet-induced obesity in mice. **Metabolism**. V. 61, p. 1606-1614, 2012.
- BOKAREWA, M.; NAGAEV, I.; DAHLBERG, L.; *et al.* A Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. **J Immunol**. V. 174, p. 5789–5795, 2005.
- BOULOUMIÉ, A.; CURAT, C.A.; SENGENÈS, C.; *et al.* Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. V. 8, p. 347–354, 2005.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutr Rev**. V. 56, p. 317-333, 1998.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**. V. 89, p. 331-340, 1997.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**. V. 84, p. 277-359, 2004.
- CARNEIRO, J.; CASIMIRO, L. G.; MIRANDA, M.; *et al.* Insulino-Resistência e Síndrome Metabólica: perspectiva imunológica. **Rev Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**. V. 2, p. 91-100, 2011.
- CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**. V. 50, p. 304-312, 2006.
- CHANG, X.; YAN, H.; FEI, J.; *et al.* Berberine reduces methylation of the MTTP promoter and alleviates fatty liver induced by a high-fat diet in rats. **Journal of Lipid Research**. V. 51, p. 2504–2515, 2010.
- CHEN, A.; MUMICK, S.; ZHANG, C.; *et al.* Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. **Obes Res**. V. 13, p. 1311–1320, 2005.
- CHEN, J. H.; HO, C. T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **J Agric Food Chem**. V. 45, p. 2374-2378, 1997.

- CHO, A.; JEON, S.; KIM, M.; *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food Chem Toxicol.** V. 48, p. 937-943, 2010.
- CINTI, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr Metab Cardiovas Dis.** V. 16, p. 569-574, 2006.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Ann N Y Acad Sci.** V. 854, p. 435-442, 1998.
- CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; Berset, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure activity relationship. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** V. 56, p. 324-235, 1992.
- DODSON, M. V.; MIR, P.; HAUSMAN, G. J.; *et al.* Obesity, metabolic syndromes and adipocytes. **J Lipids.** V. 2011, p. 1-5, 2011.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** V. 115, p. 911-919, 2005.
- FERGUSON, L.R.; HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **Eur J Cancer Prev.** Oxford. V. 8, p. 17-25, 1999.
- FON TACER, K.; ROZMAN, D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. **J Lipids,** V. 2011, p. 1-14, 2011.
- FRUBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, F. J.; *et al.* The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** V. 280, p. 827-847, 2001.
- GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Endocrinol Metab.** V. 11, p. 327-332, 2000.
- GOLDSTEIN, J. L.; HOBBS, H.; BROWN, M. S. Familial Hypercholesterolemia. The metabolic and molecular bases of inherited disease. V. 7, p. 1981-2030, 1995.
- GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** V. 29, p. 431-438, 2009.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol.** V. 29, p. 415-45, 2011.

- GUERRE-MILLO, M.; GERVOIS, P.; RASPÉ, E.; *et al.* Peroxisome proliferators-activated receptor an activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. **J. Biol. Chem.** V. 275, p. 16638–16642, 2000.
- GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Metabolismo e Termorregulação. **In: Tratado de Fisiologia Médica. Elsevier.** 11<sup>a</sup> ed., p. 842-888, 2006.
- HEILBRONN, L.K.; CAMPBELL, L.V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Curr Pharm Des.** V. 14, p. 1225–1230, 2008.
- HELLERSTEIN, M. K. & PARKS, E. J. Obesity & Overweight. **In: Basic and Clinical Endocrinology 6th Ed. New York.** Cap. 21, p. 796-816, 2007.
- HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest.** V. 109, p. 1125–1131, 2002.
- HOTAMISLIĞLI, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science.** V. 259, p. 27-91, 1993.
- HSIEH, P. S.; JIN, J. S.; CHIANG, C. F.; *et al.* COX-2 mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. **Obesity.** V. 17 p. 1150–1157, 2009.
- IASO - Internacional Association for the Study of Obesity [homepage da internet]. Londres. [Acesso em 21/11/2012]. Disponível em: <http://www.iaso.org/>.
- IIZUKA, K.; HORIKAWA, Y. ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. **Endocrine J.** V. 55, p.617-624, 2008.
- JAMES, B.; MEIGS, M. D. Epidemiology of the Metabolic Syndrome. **Am J Managed Care.** V. 8, p. 283-292, 2002.
- JUG, W.K.; CHOI, I.; LEE, D.Y.; *et al.* Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. **Int J Biochem Cell Biol.** V. 40, p. 2572-2582, 2008.

- JUHÁSZ, A.; KATONA, E.; CSONGRÁDI, E.; *et al.* A practicing physician's view on obesity. **Orv Hetil.** V. 147, p. 579-590, 2006.
- JUNG, U. J.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; *et al.* Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice. **J Pharmacol Exp Ther.** V. 318, p. 476-83, 2006.
- KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.** V. 106, p. 473-481, 2000.
- KANG, J. G.; PARK, C. Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. **Diabetes Metab J.** V. 36, p. 13-25, 2012.
- KASER, S.; KASER, A; SANDHOFER, A.; *et al.* Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. **Biochem Biophys Res Commun.** V. 309, p. 286–290, 2003.
- KERRY, N.L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **Atherosclerosis.** V. 135, p. 93-102, 1997.
- KIM, H. K.; JEONG, T. S.; LEE, M. K.; *et al.* Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rat. **Clin Chim Acta.** V. 327, p. 129-37, 2003.
- KREIR, F.; FLIERS, E.; VOSHOL, P. J.; *et al.* Selective parasympathetic innervations of subcutaneous and intra-abdominal fat – functional implications. **J Clin Invest.** V. 110, p. 1243-1250, 2002.
- LEE, K. W.; CHUN, K. S.; LEE, J. S.; *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. **Ann N Y Acad Sci.** V. 1030, p. 501-507, 2004.
- LEE, M. K., PARK, E. M., BOK, S. H., *et al.* Two cinnamate derivatives produce similar alteration in mRNA expression and activity of antioxidant enzymes in rats. **J Biochem Mol Toxicol.** V. 17, p. 255–262, 2003.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. **Methods.** V. 25, p. 402-408, 2001.
- LONARDO, A.; LOMBARDINI, S.; RICCHI, M.; *et al.* Review article: hepatic steatosis and insulin resistance. **Aliment Pharmacol Ther.** V. 2, p. 64-70, 2005.

- LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. Mini-review: adiposity, inflammation and atherogenesis. **Endocrinology**. V. 144, p. 2195-2200, 2003.
- MÁRQUEZ, N.; SANCHO, R.; MACHO, A.; *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcription factors. **J Pharmacol Exp Ther**. V. 308, p. 993-1001, 2004.
- MEDICONE [homepage da internet]. Rio Grande do Sul. [Acesso em 12/03/2012]. Disponível em: <http://www.medicone.com.br/>.
- MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; *et al.* Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocyte. **Diabetes**. V. 47, p. 1384-1390, 1998.
- NAGAEV, I.; BOKAREWA, M.; TARKOWSKI, A.; *et al.* Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. **PLoS ONE** 1, 2006.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **J Nutr**. V. 29, p. 273-300, 1990.
- NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. V. 293, p. 444-452, 2007.
- OUCHI, N.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; *et al.* Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Curr Opin Lipidol**. V. 14, p. 561-566, 2003.
- PARK, S. H.; MIN, T. S. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates changes in IGFs secretion and gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**. V. 78, p. 1741-1747, 2006.
- PÉNICAUD, L.; COUSIN, B.; LELOUP, C.; *et al.* The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity and energy balance. **Nutrition**. V. 16, p. 903-908, 2000.
- PEET, D. J.; JANOWSKI, B. A.; MANGELSGORF, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. **Curr Opin Genet Dev**. V. 8, p. 571-575, 1998a.
- PEET, D. J.; TURKLEY, W. A.; MA.; *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR $\alpha$ . **Cell**. V. 93, p. 693-704, 1998b.
- POLACOW, V. O.; LANCHÁ JUNIOR, A. H. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade

- corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. **Arq Bras de Endocrinol e Metabol.** V. 51, p. 389-400, 2007.
- POND, C. Ecology of Storage and Allocation of Recourses: Animals. **Encyclopedia of Sciences.** 2001.
- PRINS, J. B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** V. 16, p. 639-561, 2002.
- REA, R.; DONNELLY, R. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? **Diabetes Obes Metab.** V. 6, p. 163-170, 2004.
- REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes.** V. 37, p. 1595-1607, 1988.
- RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERS, J. J. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. **Text Book of Clinical Chemistry.** 3<sup>a</sup> ed., p. 809-61, 1999.
- RODRÍGUEZ-SUÁREZ, E.; DUCE, A. M.; CABALLERÍA, J.; *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. **Proteomics Clin Appl.** V. 4, p. 362–371, 2010.
- RYO, M.; NAKAMURA, T.; KIHARA, S.; *et al.* Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. **Circ. J.** V. 68, p. 975–981, 2004.
- SANTOS, C. R. B.; PORTELLA, E. S.; AVILA, S. S.; *et al.* Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Rev. nutr.** V. 19, p. 389-401, 2006.
- SEIFRIZ, I. Propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal: Proteção da ação de espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio sobre membranas lipídicas e ação como sequestradores de Radicais livres. [Tese Doutorado]. **Universidade Federal de Santa Catarina.** Programa de Pós-Graduação em Química 2004.
- SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. **Semin Cell Dev Biol.** V. 10, p. 19-29, 1999.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Rev Food Sci Nutr.** V. 32, p. 67-103, 1992.
- SIMIC, M. G., JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. **Am Chem Soc.** p.20-33, 1994.

- SON, J. M.; RICO, C. W.; NAM, S. H.; *et al.* Effect of Oryzanol and Ferulic Acid on the Glucose Metabolism of Mice Fed with High-Fat Diet. **J Food Science**. V. 76, p. 7-10, 2011.
- SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; PILLAI, K. R.; *et al.* Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. **Toxicology**. V. 228, p. 249-58, 2007.
- STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**. V. 409, p. 307–312, 2001.
- STEPPAN, C. M.; WANG, J.; WHITEMAN, E. L.; *et al.* Activation of SOCS-3 by resistin. **Mol Cell Biol**. V. 25, p. 1569–1575, 2005.
- TAKAHASHI, K.; MIZUARAI, S.; ARAKI, H.; *et al.* Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. **J Biol Chem**. V. 278, p. 46654–46660, 2003.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory Mechanism in the Regulation of Insulin Resistance. **Mol Med**. V. 14, p. 222-231, 2008.
- TONTONOZ, O.; HU, E.; SPIELGMAN, B. M. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. **Curr Opin Genet Dev**. V. 5, p. 571-576, 1995.
- TULENKO, T. N.; SUMNER, A. E. The physiology of lipoproteins. **Journal of Nuclear Cardiology**. V. 9, p. 638–649, 2002.
- VAN RAALTE, D. H.; LI, M.; PRITCHARD, P. H.; *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. **Pharm Res**. V. 21, p. 1531-1538, 2004.
- WILLSON, T. M.; WAHLI, W. Peroxisome proliferators-activated receptor agonists. **Curr Opin Chem Biol**. V. 1, p. 235-241, 1997.
- WHO – World Health Organization [homepage da internet]. [Atualizado em 03/2013; Acesso em 21/11/2012]. Disponível em: <http://www.who.int/>.
- WHO – World Health Organization [homepage da internet]. [Acesso em 21/11/2012] Disponível em: [http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/overweight\\_obesity/atlas.html?indicator=i1&date=Both%20sexes](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight_obesity/atlas.html?indicator=i1&date=Both%20sexes)

WOLF, G. Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue. **Nutr Rev.** V. 62, p. 389-394, 2004.

XIE, L.; ORTEGA, M. T.; MORA, S.; *et al.* Interactive changes between macrophages and adipocytes. **Clin Vaccine Immunol.** V. 17, p. 651–659, 2010.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.** V. 54, p. 377-382, 1995.

ZELCER, N.; HONG, R.; BOYADJIAN, R.; *et al.* LXR regulates cholesterol uptake through idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. **Science.** V. 325, p. 100-104, 2009

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages (review). **Immunol Lett.** V. 112, p. 61–67, 2007.

## APÊNDICE



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE  
Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação  
Coordenadoria de Pesquisa - Comitê de Ética no Uso de Animais



São Paulo, 23 de setembro de 2011.

À Acadêmica

***Bárbara Miranda Leite da Costa Bocco***

Após a análise do projeto de pesquisa ***Efeito do ácido caféico e do ácido ferúlico sobre a Síndrome Metabólica em camundongos***, Processo CEUA/UPM Nº 086/08/2011, o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie ***aprovou*** os procedimentos éticos do referido projeto.

Solicitamos, por gentileza, que após a conclusão do citado projeto seja encaminhada uma cópia digital, do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo neste Comitê.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo

*Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais*

*Projeto analisado na Reunião Mensal de setembro.*