



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



**Efeitos da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) sobre
fatores relacionados à patogenia da doença hepática
gordurosa não alcoólica em ratos.**

Nara Nunes Lage

Ouro Preto – Minas Gerais

2018

NARA NUNES LAGE

**Efeitos da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)
sobre fatores relacionados à patogenia da doença
hepática gordurosa não alcoólica em ratos.**

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Pedrosa

Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Joyce Ferreira da Costa Guerra

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto – Minas Gerais

2018

L135e Lage, Nara Nunes.
Efeitos da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) sobre fatores relacionados à patogenia da doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos [manuscrito] / Nara Nunes Lage. - 2018.
104f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Lúcia Pedrosa.
Coorientadora: Profª. Drª. Joyce Ferreira da Costa Guerra.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Jabuticaba. 2. Compostos bioativos. 3. Esteatose hepática. I. Pedrosa, Maria Lúcia. II. Guerra, Joyce Ferreira da Costa. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.36

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 25 dias do mês de outubro do ano de 2018, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Nara Nunes Lage, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Maria Lucia Pedrosa (Presidente - UFOP), pela Profa. Cintia Lopes de Brito Magalhaes (Membro - UFOP), pela Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (Membro - Externo), pelo Prof. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP), pela Profa. Suely Gomes Figueiredo (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Nara Nunes Lage 50 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeitos da Casca de Jabuticaba (Myrciaria Cauliflora) Sobre Fatores Relacionados à Patogenia da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica em Ratos", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 30 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 25 de outubro de 2018.

Presidente: M. Pedrosa

Membro: Cintia Lopes de Brito Magalhaes

Membro: Mauro Cesar Isoldi

Membro: Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Membro: M.

Doutorando: Nara Nunes Lage

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica e no Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais **Rita Maria** e **Renato Luíz** (*in memoriam*) pela educação, dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha querida professora e mentora **Maria Lúcia Pedrosa** por ter me acolhido com tanto carinho no Laboratório de Bioquímica Metabólica e por ter acreditado em mim sempre, mesmo diante de tantas dificuldades. Agradeço por todo o conhecimento científico compartilhado durante esses seis anos de uma convivência grandiosa que fez de mim uma pessoa profissionalmente pronta para encarar os desafios da vida acadêmica e, além disso, fez de mim um ser humano melhor. Você é meu exemplo de profissional e de pessoa, pois seus princípios são pautados no respeito, humildade e no caráter. Muito obrigada!

Ao querido professor **Marcelo Eustáquio Silva** por desde a graduação acreditar no meu potencial e por me introduzir na pesquisa. Agradeço pela oportunidade, incentivo, às discussões e reflexões que foram fundamentais na construção desse trabalho. Obrigada por sempre me acolher!

À minha querida coorientadora e amiga **Joyce Ferreira da Costa Guerra** por toda sua dedicação incansável ao longo dessa minha trajetória. Agradeço por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e pelos grandes ensinamentos científicos. Você é exemplo de dedicação e profissionalismo; admiro-te muito!

À querida técnica e amiga **Renata Rebeca Pereira** por dividir comigo experiências, aprendizados e aflições durante os experimentos realizados no laboratório. Obrigada pela sua amizade e companheirismo!

A todos os colegas dos Laboratórios de Bioquímica Metabólica e Nutrição Experimental, em especial às queridas amigas **Juliana, Mayara, Alice, Ana Maria, Mariana e Sabrina** por compartilhar comigo as conquistas, as angústias e os desafios durante todos esses anos de convivência. Obrigada por todo apoio e carinho!

Ao professor **Wanderson Geraldo de Lima** pela colaboração, dedicação e carinho.

Ao **Jair Pastor Mota** e **Clodoaldo Pereira dos Santos** por toda a ajuda disponibilizada durante os experimentos realizados com os animais.

À querida professora **Giuliana Noratto** pelos grandes ensinamentos durante o meu doutorado sanduíche na *Texas A&M University* que foram fundamentais no meu amadurecimento como profissional.

Aos laboratórios do **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP** por gentilmente cederem o uso dos equipamentos.

Aos professores do **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas** pelos ensinamentos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas** pela oportunidade em concluir a pós-graduação em um curso de excelência.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por me guiar e me dar forças durante todo o caminho.

À minha mãe **Rita Maria**, minha melhor companhia, por estar sempre ao meu lado e por não medir esforços em me ajudar. Você fez de mim uma pessoa sem medos de arriscar, e tenho a certeza de que sempre terei um lindo lar para voltar.

Aos meus queridos irmãos **Nádia** e **Vinícius** pelo companheirismo, incentivos e por estimularem sempre o meu melhor lado. Vocês foram essenciais nessa minha trajetória.

À minha sobrinha **Lulu** por trazer luz e amor aos meus dias.

Ao meu cunhado **Daniel** por todo apoio.

À **Lorena Torres de Castro** e **família** pelo carinho e incentivos constantes.

Às **famílias Nunes Lage** por mesmo de longe me apoiarem de alguma forma.

Às minhas afilhadas **Raíssa** e **Liginha** pelos incentivos e por estarem sempre ao meu lado.

Às queridas amigas de Ouro Preto, em especial **Aninha, Simone, Paolla, Marcela, Marina e Greiza** por sempre acreditarem em mim e por tornarem os meus dias mais leves.

Ao companheiro **Ítalo e sua família** pelo apoio, paciência e carinho.

Aos queridos colegas que tive o prazer de conhecer durante o meu doutorado sanduíche, em especial **Renata, Thalita, Queli, Cecília e Diane** por dividirem comigo um dos momentos mais incríveis da minha vida. E agradeço à família **Lyerly** por me receberem com tanto carinho em sua casa e me fazer parte dela.

Muito Obrigada!

“O essencial é invisível para os olhos”
(Antoine de Saint-Exupéry, O Pequeno Príncipe)

RESUMO

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (NAFLD) consiste em uma doença crônica do fígado, multifatorial, e o aumento no consumo de dietas hiperlipídicas, com maiores conteúdos de gordura saturada e colesterol, desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da NAFLD. Diversos alimentos contendo compostos antioxidantes e anti-inflamatórios, capazes de prevenir ou reduzir a doença, têm sido descritos. Neste contexto, a casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) contém compostos bioativos, tais como fibras e compostos fenólicos, com potencial para interferir nos diversos *hits* envolvidos na patogênese da NAFLD. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do consumo da casca de jabuticaba na forma de farinha (FCJ) sobre a NAFLD e os diversos fatores envolvidos na sua gênese em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Para isso, foram utilizados 32 ratos Fischer fêmeas divididas em quatro grupos de acordo com o tratamento: grupo controle (C), recebendo dieta padrão (AIN-93M); grupo controle jabuticaba (CJ), recebendo dieta padrão acrescida de 4% de FCJ; grupo hiperlipídico (HF) recebendo dieta contendo 32% de banha de porco e 1% de colesterol; grupo hiperlipídico jabuticaba (HFJ), recebendo dieta hiperlipídica acrescida de 4% de FCJ. O experimento teve duração de 8 semanas e, ao final deste período, os animais foram anestesiados e eutanasiados. A análise da composição fitoquímica da FCJ revelou que esta possui baixo teor de lipídios; elevado teor de fibras dietéticas e compostos fenólicos, principalmente antocianinas, e apresentou significativa capacidade antioxidante *in vitro*. Já com relação ao experimento *in vivo*, observou-se que a suplementação com a FCJ reduziu significativamente o colesterol total e o colesterol não-HDL (1,71 e 1,80 vezes em relação ao grupo HF, resp.); a atividade da enzima AST; a gravidade da esteatose macrovesicular; 25% do acúmulo de gordura no tecido adiposo abdominal; reduziu parcialmente os níveis hepáticos de TNF- α , e restaurou o balanço oxidante/antioxidante hepático, apresentando, portanto, efeito protetor sobre a esteatose hepática. Além disso, o seu consumo foi associado, principalmente, com a redução na expressão de mRNA dos genes LXR- α , ACAT-1 e ACOX-1, genes envolvidos no metabolismo de colesterol e lipídios. Esses dados sugerem que a casca de jabuticaba pode representar uma estratégia dietética viável para a prevenção e tratamento da NAFLD.

Palavras-chave: jabuticaba, compostos bioativos, dieta hiperlipídica, esteatose hepática, NAFLD.

ABSTRACT

Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a hepatic chronic disease, multifactorial, and the increase of hyperlipidic diets consumption, with higher contents of saturated fat and cholesterol, plays a fundamental role in the physiopathology of NAFLD. Several foods containing antioxidant and anti-inflammatory compounds, capable of preventing or reducing the disease, have been described. In this context, the jabuticaba peel (*Myrciaria cauliflora*) contains bioactive compounds, such as fibers and phenolic compounds, with potential to interfere in the many hits involved in the pathogenesis of NAFLD. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of jabuticaba peel powder consumption (FCJ) on NAFLD and the factors involved in its genesis in rats fed a high-fat diet. For this, 32 female Fischer rats were divided into four groups according to the treatment: control group (C), receiving standard diet (AIN-93M); jabuticaba control group (CJ), receiving standard diet plus 4% FCJ; high-fat (HF) group receiving diet containing 32% lard and 1% cholesterol; high-fat jabuticaba group (HFJ), receiving a high-fat diet plus 4% FCJ. The experiment lasted 8 weeks and at the end of this period the animals were anesthetized and euthanized. The FCJ phytochemical composition analysis revealed that it has a low lipids, high fiber content and phenolic compounds, mainly anthocyanins, and presented significant antioxidant activity in vitro. Regarding the in vivo experiment, it was observed that the FCJ supplementation significantly reduced total cholesterol and non-HDL cholesterol (1.71 and 1.80-fold compared to the HF group, resp.); AST enzyme activity; severity of hepatic steatosis; 25% fat accumulation in abdominal adipose tissue; partially reduced hepatic levels of TNF- α , and restored the oxidant/antioxidant hepatic balance. In addition, its consumption was associated, mainly, with mRNA expression reduction of the genes LXR- α , ACAT-1 and ACOX-1, genes involved in the cholesterol and lipids metabolism. These data suggest that the jabuticaba peel can represent a viable dietary strategy for the prevention and treatment of NAFLD.

Key words: jabuticaba, bioactive compounds, high-fat diet, hepatic steatosis, NAFLD.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCG5, ATP-binding cassette subfamily G member 5;
ABTS, Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico;
AIN, do inglês, *American Institute of Nutrition*;
ACAT-1, colesterol aciltransferase-1;
ACC, acetil-CoA carboxilase;
ACOX-1, Acil-CoA oxidase 1;
ALT, alanina aminotransferase;
AST, aspartato aminotransferase;
AMPK, proteína quinase ativada por AMP;
AOAC, do inglês, *Association of Official Agricultural Chemists*;
ApoB 100, apolipoproteína B100;
BHT, butil-hidroxi-tolueno;
C, grupo controle;
CAT, enzima catalase;
cDNA, ácido desoxirribonucléico complementar;
CEUA, Comissão de Ética no Uso de Animais;
ChREBP, proteína de ligação aos elementos de resposta ao carboidrato;
CJ, grupo controle jabuticaba;
CJF, casca de jabuticaba liofilizada;
CNA, comprimento nasoanal do animal;
COX-2, ciclo-oxigenase-2
CPT-1, carnitina palmitoyltransferase 1
Cq, do inglês, *Quantification cycle*;
CT, colesterol total;
CYP7A1, Colesterol-7 α -hidroxilase;
C3G, cianidina-3-glicosídeo;
DMSO, dimetilsulfóxido;
DNPH, 2,4-dinitrofenilhidrazina;
dNTP, desoxiribonucleosídeo trifosfatado;
DPPH, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
DTNB, ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico);

E, fração fenólica extraível;
EAG, ácido gálico;
EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético;
ELISA, do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*;
EMA, antocianinas poliméricas na fração extraível;
EP, erro padrão;
ERO, espécies reativas de oxigênio;
FAS, ácido graxo sintase;
FBS, soro fetal bovino;
FCJ, farinha da casca de jabuticaba;
GAE, ácido gálico;
GGT, gama-glutamyltransferase;
GSH, glutathiona reduzida;
GSSG, glutathiona oxidada;
GPx, enzima glutathiona peroxidase;
H₂O₂, peróxido de hidrogênio;
HCl, ácido clorídrico;
HDL, lipoproteína de alta densidade;
HDL-c, colesterol HDL;
HF, grupo hiperlipídico;
HFJ, grupo hiperlipídico jabuticaba;
HepG2, linhagem celular de hepatocarcinoma;
HMGCR, 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase
HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase, resistência à insulina;
H&E, hematoxilina e eosina;
I, fibra insolúvel;
IL, interleucinas;
INSIG, *insulin-induced gene protein*;
IRS-1, substrato 1 do receptor de insulina;
LDL, lipoproteína de baixa densidade;
LDLox, LDL oxidadas;
LDL-R, receptor da lipoproteína de baixa densidade;
LXR- α , receptor X do fígado α ;
MDA, malondialdeído;

MTT, brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazólio;

NaCl, cloreto de sódio;

NAFLD, do inglês, *Nonalcoholic fatty liver disease*, doença hepática gordurosa não alcoólica;

NASH, do inglês, *Nonalcoholic steatohepatitis*, esteato-hepatite não alcoólica;

NE, fração fenólica não extraível;

NEPA, proantocianinas poliméricas na fração não extraível;

NFκB, fator nuclear kappa B;

•O₂⁻, radical superóxido;

OMS, Organização Mundial de Saúde;

ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*;

PA, proantocianinas;

PPAR, receptores ativados por proliferadores peroxissomais;

PUFAs, ácidos graxos poli-insaturados;

qRT-PCR, reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa;

RE, retículo endoplasmático;

rRNA 18S, Ácido ribonucleico ribossomal 18S;

S, fibra solúvel;

SCAP, proteína ativadora da clivagem da SREBP;

SOD, enzima superóxido dismutase;

SRs, receptores *scavengers*;

SREBP, proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol;

STZ, estreptozotocina;

TG, triacilgliceróis;

TBA, ácido tiobarbitúrico;

TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TEAC, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox;

TROLOX, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)

TCA, ácido tricloroacético;

TNB, ácido 5-tio-2-nitrobenzóico;

TNF-α, fator de necrose tumoral alfa;

TTOG, teste de tolerância oral à glicose;

UCP-2, proteína desacopladora 2;

VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O espectro da NAFLD.	5
Figura 2. Mecanismos envolvidos na resistência à insulina, fluxo de ácidos graxos para o fígado e desenvolvimento da esteatose hepática.	10
Figura 3. Mecanismos moleculares envolvidos no efeito hepatoprotetor dos compostos bioativos	15
Figura 4. Fotos representativas em A: Jabuticabeira <i>Plinia cauliflora</i> ; B: Frutos maduros sobre o tronco da árvore; C: Frutos jabuticaba (casca, polpa e sementes).	19
Figura 5. Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba.....	22
Figura 6. Fotos do processamento da farinha da casca de jabuticaba	28
Figura 7. Delineamento Experimental.....	33
Figura 8. Viabilidade celular após 24 horas	48
Figura 9. Curvas do TTOG, área sob a curva, glicemia e níveis séricos de glicose e insulina	53
Figura 10. Perfil lipídico sérico	54
Figura 11. Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) (A), alanina aminotransferase (ALT) (B) e fosfatase alcalina (C).....	55
Figura 12. Lipídios totais e colesterol no fígado e excretado nas fezes	56
Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido do fígado	58
Figura 14. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo abdominal	59
Figura 15. Expressão do mRNA de genes envolvidos no metabolismo do colesterol no fígado	61
Figura 16. Expressão do mRNA de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos no fígado	62
Figura 17. Níveis de TBARS (A) e proteína carbonilada (B) no fígado.....	63
Figura 18. Atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutaciona peroxidase (GPx) (C) e glutaciona redutase (GR) (D) no fígado	64
Figura 19. Níveis de glutaciona total (A), glutaciona oxidada (GSSG) (B) e glutaciona reduzida (GSH) (C), e a relação entre GSH total/GSSG (D) no fígado	65
Figura 20. Resumo dos principais resultados encontrados, no presente estudo, que possivelmente contribuíram para o efeito hepatoprotetor da casca de jabuticaba na NAFLD.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta).....	32
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de qRT-PCR.....	44
Tabela 3. Composição centesimal, fitoquímica e atividade antioxidante da FCJ.	47
Tabela 4. Massa corporal inicial e final, ingestão alimentar, excreção fecal e eficiência alimentar de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba.	50
Tabela 5. Pesos relativos do fígado, gorduras abdominal, uterina, marrom, mesentérica e intestino delgado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba.	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição da casca de jabuticaba (g/100g) segundo diferentes estudos. .	20
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFOP	100
Anexo II: Trabalhos publicados durante o doutorado sanduíche na <i>Texas A&M University</i>	101
Anexo III: Demais trabalhos publicados durante o doutorado no CBIOL.....	103
Anexo IV: Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais durante doutorado	104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)....	3
2.1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos	3
2.1.2. Diagnóstico	6
2.1.3. Patogênese	6
2.1.4. Dietas Hiperlipídicas e NAFLD	11
2.1.5. Efeito dos Compostos Bioativos na NAFLD	14
2.2. JABUTICABA	18
2.2.1. Caracterização Botânica	18
2.2.2. Jabuticaba como Alimento Funcional	19
2.2.3. Atividades Biológicas.....	22
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Preparo da Farinha da Casca de Jabuticaba (FCJ).....	28
4.2. Caracterização da FCJ	28
4.2.1. Composição Centesimal	28
4.2.2. Teor de Polifenóis Totais nas Frações Extraível e Não Extraível	29
4.2.3. Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	30
4.2.4. Ensaio de Citotoxicidade	30
4.3. Animais	31
4.4. Dieta.....	31
4.5. Delineamento Experimental	32
4.6. Índice de Lee e Índice de Adiposidade	33
4.7. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).....	34
4.8. Análises Bioquímicas no Soro e/ou Plasma	34
4.9. Extração de Lipídios nas Fezes e no Fígado	34
4.10. Análises Bioquímicas no Tecido do Fígado	35
4.11. Análise Histopatológica do Fígado e Gordura Abdominal.....	41
4.12. Ensaio de qRT-PCR.....	42
4.12.1. Extração de RNA.....	42

4.12.2.	Síntese de cDNA	43
4.12.3.	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	43
4.12.4.	Eficiência dos <i>primers</i>	44
4.12.5.	qRT-PCR	45
4.13.	Análise Estatística.....	46
5.	RESULTADOS.....	47
5.1.	Composição centesimal e fitoquímica da FCJ	47
5.2.	Avaliação de Citotoxicidade da FCJ.....	48
5.3.	Massa corporal, ingestão alimentar e excreção fecal.....	49
5.4.	Peso relativo dos órgãos	51
5.5.	Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).....	53
5.6.	Perfil lipídico sérico.....	54
5.7.	Indicadores séricos de dano hepático.....	55
5.8.	Lipídios totais no fígado e excretado nas fezes	56
5.9.	Análise morfológica do tecido do fígado e do tecido adiposo abdominal.....	57
5.10.	Expressão do mRNA de Genes Envolvidos na Biossíntese, Captação, Oxidação e Excreção de Lipídios	60
5.11.	Biomarcadores do Estresse Oxidativo e Defesa Antioxidante no Fígado	63
6.	DISCUSSÃO	66
7.	CONCLUSÃO	78
8.	REFERÊNCIAS	79
9.	ANEXOS	100
9.1.	ANEXO I: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFOP	100
9.2.	ANEXO II: Trabalhos publicados durante o doutorado sanduíche na <i>Texas</i> <i>A&M University</i>	101
9.3.	ANEXO III: Demais trabalhos publicados durante o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas	103
9.4.	ANEXO IV: Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais durante o doutorado.....	104

1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD do inglês “*Non alcoholic Fatty Liver Disease*”) consiste em uma doença crônica do fígado considerada como um problema de saúde pública, pois sua prevalência aumentou significativamente em paralelo ao aumento nas taxas de sobrepeso e obesidade na população em geral (BELLENTANI et al., 2004). A principal característica dessa doença é o acúmulo de gordura nos hepatócitos na ausência de consumo crônico de álcool e de qualquer outra doença hepática. Ela contempla um amplo espectro de doenças, que vai desde o simples acúmulo de lipídios, podendo evoluir para esteato-hepatite e cirrose, um quadro de dano hepático grave e irreversível (ARGO; CALDWELL, 2009; BRASILEIRO-FILHO, 2016).

Mecanismos moleculares que promovem o desenvolvimento da esteatose hepática estão sendo propostos, sendo o aumento do influxo de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo e a alteração no padrão de secreção de adipocinas, acompanhado pelo quadro de resistência à insulina, considerados os principais fatores desencadeadores (MCCARTHY; RINELLA, 2012). O desenvolvimento e progressão da doença, além de fatores genéticos, estão envolvidos estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial, estresse no retículo endoplasmático, autofagia, apoptose, fibrose e alterações na microbiota intestinal (GAMBINO; MUSSO; CASSADER, 2011; HARDY et al., 2016).

Considerando as diversas causas da NAFLD, modificações do estilo de vida, incluindo aumento da atividade física e um comportamento alimentar saudável são estratégias importantes na prevenção e tratamento da doença (DEL BEN et al., 2014; DONGIOVANNI et al., 2016). Neste contexto, alimentos contendo compostos antioxidantes e anti-inflamatórios capazes de prevenir ou reduzir a doença têm sido descritos. Até o momento, os compostos que apresentam maiores efeitos comprovados sobre a esteatose hepática e sobre os diversos processos que envolvem a doença são: as vitaminas C, D e E; os polifenóis incluindo as antocianinas; os ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ômega-3 (SANYAL et al., 2010; SALAMONE et al., 2012; TANG, XIAO et al., 2012; DING et al., 2013; VAN DE WIER et al., 2015).

Sendo assim, a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) tem atraído muita atenção no meio científico e seu consumo tem sido associado a efeitos antioxidantes, anti-inflamatório, antimicrobiano, hipolipidêmico, hepatoprotetor e efeito benéfico sobre a resistência à

insulina (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013; DRAGANO et al., 2013; BATISTA et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2015; LAGE et al., 2015; PLAZA et al., 2016; BATISTA et al., 2017; HUANG, 2017; BATISTA et al., 2018; LAMAS et al., 2018). Esses efeitos são, principalmente, atribuídos aos compostos bioativos presentes na casca da jabuticaba, dando destaque aos flavonoides e antocianinas.

Nessa perspectiva, o presente estudo visa elucidar se a casca de jabuticaba pode amenizar a NAFLD induzida por dieta hiperlipídica e se o efeito se relaciona ao metabolismo de lipídios, à inflamação e ao estresse oxidativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

2.1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos

A história da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) teve início em 1980 quando LUDWIG et al. (1980) descreveram 20 casos de esteatohepatite morfológicamente semelhantes às alterações encontradas na esteatohepatite alcoólica, em pacientes obesos que negavam o uso de álcool. Trabalhos subsequentes reforçaram os achados de Ludwig et al. (1980) confirmando a existência da NAFLD e, com o passar do tempo, novos estudos demonstraram que essa doença contempla uma síndrome clínico-patológica variando de esteatose simples à fibrose ou cirrose (BACON et al., 1994; BRUNT et al., 1999; BRUNT, 2000).

Apesar da real prevalência e incidência da NAFLD ser difícil de estimar, uma vez que essa doença é assintomática e de complexo diagnóstico, estima-se que a sua prevalência na população em geral está maior que 25% (ZHU et al., 2015; YOUNOSSI et al., 2016). Além disso, estudos relatam que 60-80% de obesos apresentam NAFLD (CONTOS; SANYAL, 2002; NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). Dessa forma, acredita-se que a prevalência da doença tende a aumentar juntamente com o aumento das taxas de obesidade, inclusive em crianças, constituindo um problema de saúde pública (RASHID; ROBERTS, 2000; FLEGAL et al., 2001).

Atualmente, a NAFLD é a causa mais comum de doença crônica do fígado, sendo considerada como uma manifestação hepática da síndrome metabólica, pois o aumento de sua incidência está fortemente associada com diabetes mellitus do tipo 2 e resistência à insulina, além da obesidade como citado anteriormente. A principal característica dessa doença é o quadro de esteatose que consiste na deposição de triacilgliceróis (TG) no citoplasma dos hepatócitos, podendo ser superior a 55 mg/g de fígado (BRASILEIRO-FILHO, 2016). A esteatose hepática é, geralmente, autolimitada, mas pode progredir para a esteatohepatite não-alcoólica (NASH) caracterizada pela presença de lesão nos hepatócitos, infiltrado inflamatório e/ou fibrose. A NASH, por sua vez, pode evoluir para cirrose, aumentando o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular. (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003; ADAMS; TALWALKAR, 2006; COHEN, J. C.; HORTON; HOBBS, 2011; FOTBOLCU; ZORLU, 2016). Ainda não

está esclarecido na literatura se a esteatose sempre precede a NASH ou se a esteatose e NASH são desordens metabólicas distintas. Mas o que se sabe é que a NASH, por sua vez, pode evoluir para cirrose, um quadro de dano hepático grave e irreversível (ARGO; CALDWELL, 2009) Na Figura 1 pode-se observar a representação esquemática da evolução da NAFLD.

Com relação aos aspectos morfológicos da NAFLD, o fígado apresenta aumento de volume e peso, ocorrendo uma mudança na coloração (vermelho para um aspecto amarelado). Ao microscópio óptico, a esteatose é muito característica: os TG se depositam em pequenas vesículas ou glóbulos revestidos por membranas (lisossomos). A esteatose na NAFLD é, geralmente, macrovesicular, na qual os hepatócitos apresentam um grande vacúolo de gordura no citoplasma que desloca o núcleo para a periferia da célula, conferindo uma aparência de adipócito. Esses vacúolos são encontrados de tamanhos variados com tendência à fusão e à formação de glóbulos cada vez maiores. Em algumas condições, a esteatose hepática adquire aspecto microvesicular que é caracterizada por um acúmulo de gordura em pequenas gotículas que se distribuem geralmente na periferia da célula, permanecendo o núcleo em posição central (DAY; JAMES, 1998; BRASILEIRO-FILHO, 2016). A esteatose microvesicular é, geralmente, considerada uma condição mais grave que ocorre como resultado da alteração na β -oxidação mitocondrial. Esta alteração, por sua vez, pode culminar numa disfunção mitocondrial e análises histológicas revelam alterações ultraestruturais nessas organelas, podendo gerar mitocôndrias gigantes. A presença de megamitocôndrias na NASH pode ser resultante da peroxidação lipídica ou representar uma mudança adaptativa (BRUNT; TINIAKOS, 2010). Além disso, a oxidação de ácidos graxos no fígado pode ocorrer nos peroxissomos, sendo que na β -oxidação peroxissomal gera-se uma elevada quantidade de peróxido de hidrogênio (FROMENTY; PESSAYRE, 1995; NATARAJAN et al., 2006).

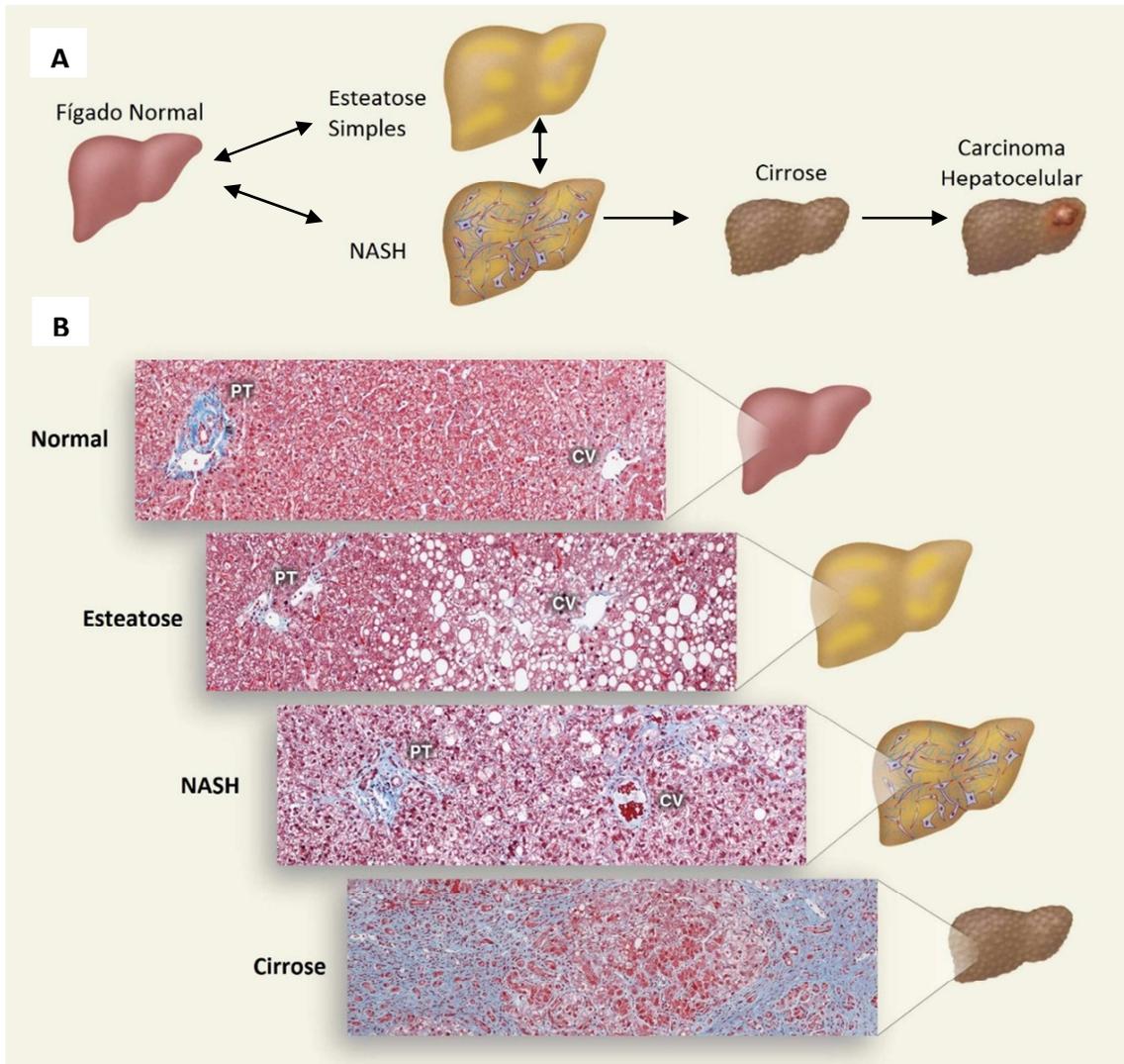


Figura 1. O espectro da NAFLD.

(A) Representação esquemática da progressão da NAFLD. O acúmulo de TG nos hepatócitos causa a esteatose simples. Esteatose associada com inflamação, morte celular e fibrose é referida como NASH, que pode progredir para cirrose. Indivíduos com cirrose tem um risco aumentado para desenvolver carcinoma hepatocelular. (B) Cortes histológicas ilustrando o fígado normal, esteatose, NASH e cirrose. Fibras colágeno estão coradas de azul pelo Tricrômico de Masson.

NAFLD: doença hepática gordurosa não alcoólica; NASH: esteatohepatite não-alcoólica; PT: Tríade Portal (artéria hepática, veia portal e ducto biliar); CV: Veia Central. Fonte: Adaptado de COHEN, J. C.; HORTON; HOBBS (2011).

2.1.2. Diagnóstico

A maioria dos pacientes são assintomáticos, porém a alteração laboratorial mais comum é a elevação das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), com níveis uma a quatro vezes além do limite da normalidade (BACON et al., 1994). A relação de AST/ALT é geralmente maior que 1, podendo haver aumento de acordo com a gravidade dos danos hepáticos (SORBI; BOYNTON; LINDOR, 1999). Além disso, elevação da atividade das enzimas fosfatase alcalina e a gama glutamil transferase também podem ser evidenciados (BAYARD; HOLT; BOROUGHS, 2006). Entretanto, vale ressaltar que todo o espectro histológico da NAFLD pode ocorrer em indivíduos com valores normais das aminotransferases e um valor normal não garante que o indivíduo não tenha um quadro de fibrose avançada (MOFRAD et al., 2003). Portanto, a biopsia hepática é o melhor método diagnóstico para confirmar a NAFLD, verificar a existência de inflamação e fibrose, além de fornecer informações prognósticas (YOUNOSSI; DIEHL; ONG, 2002; ADAMS; TALWALKAR, 2006).

2.1.3. Patogênese

Até o presente momento acredita-se que a NAFLD é desencadeada, principalmente, pelo aumento do influxo de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo e pela alteração no padrão de secreção de adipocinas, acompanhado pelo quadro de resistência à insulina. O tecido adiposo sofre por transformações significativas durante o ganho de peso, culminando em hipertrofia dos adipócitos e infiltração de macrófagos no tecido. Estas alterações levam a um aumento da taxa de apoptose de adipócitos e na secreção de citocinas pró-inflamatórias. Este estado inflamatório crônico juntamente com o aumento da lipólise no tecido adiposo e aumento do influxo de ácidos graxos no fígado contribuem para o desenvolvimento da esteatose hepática e consequente resistência à insulina. Em conjunto, estes fatores culminam em alterações no balanço entre as vias de síntese “de novo”, degradação de lipídios e na secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) pelo fígado contribuindo, assim, para o acúmulo intracelular de ácidos graxos e seus metabólitos (PAREKH; ANANIA, 2007; MCCARTHY; RINELLA, 2012).

O estudo de DAY; JAMES (1998) propôs o modelo dos dois *hits* para explicar a patogênese da NAFLD, onde o primeiro *hit* consiste no acúmulo de TG decorrente da resistência à insulina e o segundo *hit* na progressão da doença decorrente da maior produção ou incapacidade de inativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidos pela intensa degradação de ácidos graxos, levando a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias que, conseqüentemente, contribuem para um quadro mais grave da NAFLD. Porém, devido aos múltiplos fatores envolvidos nessa doença (estresse oxidativo, citocinas, disfunção mitocondrial, microbiota, estresse no retículo endoplasmático, autofagia, apoptose, fatores genéticos) atualmente, tem-se considerado a teoria dos múltiplos *hits*, uma vez que não é possível definir isoladamente uma única alteração associada à progressão da doença (BROWNING; HORTON, 2004; COHEN, J. C.; HORTON; HOBBS, 2011; HARDY et al., 2016).

Um fator em destaque que está envolvido no desenvolvimento da NAFLD é a resistência à insulina. Em condições fisiológicas, a insulina promove a lipogênese e a síntese de glicogênio, inibe a gliconeogênese e diminui a oxidação lipídica. Porém, na resistência à insulina ocorre aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres para o fígado e uma resposta insuficiente a esse hormônio contribuindo, assim, para o aumento da β -oxidação mitocondrial e aumento da síntese de TG. Os TG podem se acumular no fígado devido ao aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres ou devido à diminuição na produção e/ou secreção de VLDL (CONTOS; SANYAL, 2002).

Os níveis aumentados de insulina e glicose estimulam a síntese de ácidos graxos e TG através da ativação de vias de sinalização importantes no fígado. A insulina aumenta os níveis de SREBP-1c (proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol 1c) e de PPAR γ (receptor γ ativado por proliferadores peroxissomais), dois fatores da transcrição que ativam a expressão de enzimas-chaves envolvidas na lipogênese. Os níveis aumentados de glicose podem ativar o ChREBP (proteína de ligação aos elementos de resposta ao carboidrato), um fator de transcrição que ativa a expressão de enzimas fundamentais da glicólise e da lipogênese (ANDERSON, N.; BORLAK, 2008; AL SHARIF et al., 2014).

O papel da inflamação na patogênese da esteatose hepática também tem sido evidenciado, uma vez que há um aumento na expressão de genes e ativação de vias pró-inflamatórias proporcional ao acúmulo de TG (CAI et al., 2005). Recentemente, inúmeras citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória têm sido relacionados à presença de obesidade (KERSHAW; FLIER, 2004). O tecido adiposo expressa e secreta

adipocinas que atuam em nível tanto local (ação parácrina/autócrina) quanto sistêmico (ação endócrina). Na obesidade, a hipertrofia dos adipócitos leva a um aumento da lipólise e produção de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (TNF- α e IL-6) e diminuição na produção de citocinas anti-inflamatórias (adiponectina) que juntamente contribuem para a inflamação crônica de baixa intensidade e resistência à insulina (MCCARTHY; RINELLA, 2012). Já o controle do metabolismo dos ácidos graxos nos tecidos não-adiposos depende da leptina, peptídeo sintetizado no tecido adiposo que age no sistema nervoso central inibindo o apetite. Além disso, ela atua em receptores que induzem aumento da expressão de PPAR α (receptor α ativado por proliferadores peroxissomais), um fator de transcrição ativado por ácidos graxos que aumenta a expressão dos genes para enzimas que atuam na β -oxidação, aumentando assim o consumo dos ácidos graxos; também aumenta a expressão da proteína desacopladora da fosforilação (UCP-2), que aumenta a liberação de energia das oxidações sob a forma de calor. Nos obesos, nos diabéticos insulino-dependentes, nos portadores de insulino-resistência e nos dislipidêmicos, tem-se uma diminuição na ativação de PPAR α , e os ácidos graxos que chegam às células não-adiposas passam a ativar os PPAR γ , os quais induzem a transcrição dos genes das enzimas necessárias para a lipogênese, aumentando a conversão dos ácidos graxos em TG que podem, então, depositar-se originando a esteatose (BRASILEIRO-FILHO, 2016).

O estresse oxidativo também pode ser atribuído ao acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, pois promove aumento na produção de ERO via β -oxidação, resultando em alterações no estado redox e função mitocondrial (GAMBINO; MUSSO; CASSADER, 2011). Por sua vez, o aumento do estresse oxidativo nas mitocôndrias pode provocar lesões ultraestruturais, depleção de DNA mitocondrial, atividade diminuída dos complexos da cadeia respiratória e alteração na β -oxidação mitocondrial, além de ativar proteases envolvidas na via de sinalização da apoptose (caspases) e desencadear a morte celular programada (SANYAL et al., 2001; WEI et al., 2008). A disfunção mitocondrial decorrente dessas agressões também favorece vias alternativas de oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos e microsossomos do retículo endoplasmático (ω -oxidação), resultando na formação adicional de ERO (CHALASANI et al., 2003; BROWNING; HORTON, 2004).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, normalmente, é balanceada por mecanismos de defesa antioxidante. Porém, um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade dos sistemas de defesa

antioxidante desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do dano tecidual inicial na NAFLD. O excedente de radicais livres gerado por esse desequilíbrio promove à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, contribuindo, assim, para o desenvolvimento das complicações tardias da doença (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A enzima SOD é uma das principais enzimas de defesa antioxidante celular e constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo-os a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). Este pode, então, ser rapidamente removido pela GPx ou pela CAT, enzimas que agem com o mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de H_2O_2 . A catalase é uma importante enzima antioxidante intracelular localizada principalmente em peroxissomos e em menor quantidade no citosol, e ela é expressa na maioria das células, órgãos e tecidos e em concentrações mais elevadas, no fígado e nos eritrócitos (SCOTT et al., 1991). Já a ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da glutaciona, por meio do controle da relação entre glutaciona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (YANG et al., 2012).

Estudos mais recentes evidenciam o papel da microbiota sobre a NAFLD (CHAKRABORTI, 2015; BOURSIER et al., 2016). O sistema digestivo humano abriga uma comunidade diversa e complexa de microrganismos (10 a 100 trilhões) que trabalham de forma simbiótica com o hospedeiro. No entanto, uma alteração na diversidade dessa comunidade provocando uma redução nos microrganismos benéficos e um aumento nos potencialmente patogênicos, denominada disbiose, pode tornar-se uma fonte de estresse e lesão, gerando impacto ao metabolismo e favorecendo, por exemplo, a obesidade e distúrbios relacionados (HOLZAPFEL et al., 1998; BÄCKHED et al., 2004; LAGIER et al., 2012). Embora os mecanismos exatos sejam desconhecidos, estudos revelam que ratos obesos apresentam, principalmente, uma mudança na permeabilidade e resistência da mucosa intestinal, aumento da circulação de citocinas inflamatórias, perturbação no metabolismo dos ácidos biliares e aumento na produção de substâncias tóxicas tais como etanol e N-óxido de trimetilamina. Essas alterações, então, podem ter um enorme impacto na patogênese da obesidade e suas complicações metabólicas, bem como no desenvolvimento e progressão da esteatose hepática (BRUN et al., 2007; FARHADI et al., 2008; TARANTINO; FINELLI, 2015).

Portanto, a patogênese da NAFLD é bastante complexa e envolve uma delicada interação entre diversos fatores, dos quais muitos têm sido elucidados recentemente. Assim, estudos sobre a patogênese e progressão dessa doença devem considerar os efeitos combinados dos diversos processos envolvidos. No entanto, parece clara a relação entre a obesidade, as dislipidemias e NAFLD e, desse modo, qualquer estratégia de tratamento deverá envolver um planejamento dietético.

A Figura 2 mostra os principais mecanismos envolvidos na patogênese da NAFLD, os quais foram anteriormente descritos e, dentro deste contexto, a obesidade associada a resistência à insulina possui papel fundamental no desenvolvimento da esteatose hepática.

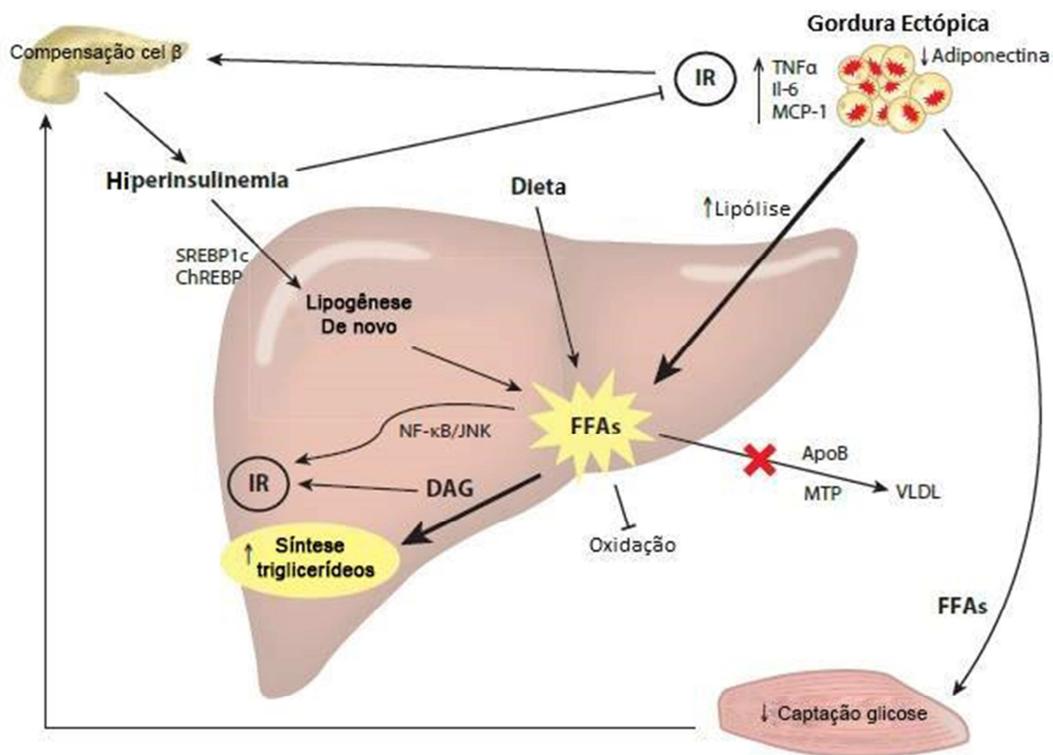


Figura 2. Mecanismos envolvidos na resistência à insulina, fluxo de ácidos graxos para o fígado e desenvolvimento da esteatose hepática. Obesidade e a deposição de gordura ectópica leva ao recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, produção desregulada de citocinas e consequente alteração na sinalização de insulina. A obesidade associada a resistência à insulina promove um aumento do influxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado e outros tecidos, aumento da via de síntese “de novo”, supressão da lipólise e alteração na secreção de lipídios via VLDL no fígado, culminando no acúmulo de TG nos hepatócitos.

IR: resistência à insulina; DAG: diacilgliceróis; FFAs: ácidos graxos livres; MTP: proteína microsômica de transferência de TG.

→ ativação; —| inibição.

Fonte: Adaptado de HARDY et al. (2016).

2.1.4. Dietas Hiperlipídicas e NAFLD

Os tipos específicos de gorduras desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da NAFLD em adição ao teor total de gordura na dieta. Normalmente, indivíduos com NAFLD consomem dietas com alto teor calórico, contendo, especialmente, maiores conteúdos de gordura saturada e colesterol e menos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) quando comparado com indivíduos saudáveis (MUSSO et al., 2003; CORTEZ-PINTO et al., 2006).

Em geral, dietas ricas em gorduras saturadas, são eficientes em aumentar o acúmulo de lipídios no fígado em diferentes modelos experimentais, uma vez que promovem alterações no metabolismo de lipídios (lipogênese e lipólise), culminando na esteatose hepática e inflamação do tecido (LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013; WANG, X.-H. et al., 2016). Além disso, estudos demonstram que o perfil de adiposidade visceral, influenciado por essas dietas, também é um importante fator de predisposição para a doença hepática gordurosa (VILAR et al., 2008).

Um estudo de ABREU et al. (2014), realizado para caracterizar as alterações histopatológicas no fígado e para avaliar alterações no status oxidante/antioxidante, observou um acúmulo de lipídios no fígado, aumento na expressão de subunidades da NADPH oxidase e alterações na atividade de enzimas antioxidantes na esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica.

Sabe-se que a hipercolesterolemia está fortemente associada com o desenvolvimento das doenças cardiovasculares e progressão das lesões ateroscleróticas. Porém, recentemente, estudos revelam que a desregulação no metabolismo do colesterol também desempenha um papel cada vez mais reconhecido na NAFLD, juntamente com as alterações no metabolismo dos ácidos graxos. Condições alimentares ou defeitos genéticos no metabolismo do colesterol podem contribuir no desenvolvimento da esteatose hepática (ARGUELLO et al., 2015).

A principal via de regulação da homeostase do colesterol é a conversão de HMG-CoA em mevalonato, reação catalisada pela enzima HMG-CoA redutase. Fatores hormonais regulam a síntese do colesterol a curto prazo, através de modificação covalente reversível. A insulina promove a desfosforilação da enzima ativando-a, enquanto o glucagon promove a fosforilação, inibindo-a (NELSON; COX, 2011). Já há longo prazo, o número de moléculas de HMG-CoA redutase aumenta ou diminui em resposta às concentrações celulares de colesterol. Neste caso, por exemplo, uma

pequena família de proteínas chamadas proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBPs), principalmente pela isoforma SREBP-2, regulam os níveis da enzima. Essas proteínas, após transcritas, estão inseridas à membrana do retículo endoplasmático ligadas à proteína ativadora da clivagem da SREBP (SCAP) que por sua vez, está ancorada à membrana por uma terceira proteína chamada INSIG (de *insulin-induced gene protein*). Interações entre SCAP e INSIG mantêm o complexo proteico firmemente conectado ao retículo endoplasmático, o que ocorre quando o nível de colesterol celular está alto. Porém, quando essa concentração diminui, a conformação da SCAP não favorece a sua ligação à INSIG, deixando o complexo SREBP/SCAP livre para deixar o retículo endoplasmático em vesículas e migrar para o Golgi, onde sofre clivagem por proteases e, posteriormente, são translocadas para o núcleo, ativando a transcrição de diversos genes envolvidos na síntese de colesterol e outros lipídios, incluindo o receptor de LDL e a enzima HMG-CoA redutase (BROWN, A. J. et al., 2002; EBERLÉ et al., 2004; RAGHOW et al., 2008).

Crescentes evidências vêm sugerindo que as LDL oxidadas (LDLox) são um novo fator de risco para a inflamação hepática e que podem ter um envolvimento direto no desenvolvimento da NASH. A captação de LDLox por macrófagos constitui um importante fator responsável por gerar uma resposta inflamatória prejudicial tanto nas artérias quanto no fígado (BIEGHS et al., 2012b; HOUBEN et al., 2017). Dentro deste contexto, as células de *Kupffer*, os macrófagos residentes do fígado, desempenham um papel importante no mecanismo de patogênese da NASH. As células de *Kupffer* expressam receptores *scavengers* (*SRs*, *scavenger receptors*) que, normalmente, se ligam às LDL circulantes, as fagocitam e direcionam para os lisossomos, onde sofrem ação das enzimas lisossômicas, liberando colesterol livre no citoplasma. As LDLox, por sua vez, podem ser captadas pelos receptores *scavengers* CD36 e SR-A nas células de *Kupffer*, e como a LDL, também são direcionadas para os lisossomos, mas por mecanismos ainda pouco conhecidos, se acumulam e desencadeiam uma resposta inflamatória hepática, levando à formação de células espumosas (BIEGHS et al., 2012a). O estudo de WOUTERS et al. (2008) demonstrou uma hipertrofia das células de *Kupffer* em camundongos hiperlipídicos que foram correlacionadas com a inflamação hepática. Além disso, verificou-se que o aumento da inflamação hepática está associada com o acúmulo de LDLox nos lisossomos das células de *Kupffer* no fígado de camundongos LDL-R *-/-*, que receberam injeção intravenosa de LDLox (BIEGHS et al., 2013).

Estudos demonstram um efeito sinérgico entre dietas hipercolesterolêmicas e ricas em gorduras saturadas no desenvolvimento da NASH. SAVARD et al. (2013) avaliaram o efeito de dietas ricas em gordura (HF: 15% de gordura e 0% colesterol); ricas em colesterol (HC: 1% de colesterol e 4% de gordura) e ricas em gordura e colesterol (HFHC: 15% de gordura e 1% de colesterol) em camundongos C57BL/6J alimentados com as respectivas dietas durante 30 semanas. E os resultados mostraram que os animais que receberam dieta HF e HC apresentaram um aumento do acúmulo de gordura no fígado contendo uma pequena inflamação e sem características histológicas de fibrose (esteatose simples). Entretanto, os animais alimentados com a dieta HFHC tiveram uma esteatose hepática significativamente mais profunda associada com um quadro inflamatório e fibrose perisinusoidal (características da esteatohepatite), acompanhado de inflamação do tecido adiposo e uma redução nos níveis séricos de adiponectina.

Um estudo semelhante, realizado em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em gordura e colesterol sugeriu que a cristalização do colesterol dentro de gotículas lipídicas nos hepatócitos, e agregação e ativação de células de *Kupffer* em torno de tais gotas representam um novo e importante mecanismo de progressão da esteatose simples para NASH em animais alimentados com ambas as dietas (IOANNOU et al., 2013; IOANNOU et al., 2015).

Outros estudos também revelam que dieta hipercolesterolêmica induz estresse oxidativo, resistência à insulina, inflamação e exacerba a esteatose hepática em diferentes modelos experimentais, uma vez que promove dislipidemia, peroxidação lipídica, ativação de células estreladas e reduz a expressão de genes responsáveis pela transcrição de enzimas antioxidantes (MATSUZAWA et al., 2007; ZHENG et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2011; ABREU et al., 2014; WU, K.-T. et al., 2016).

Em geral, o acúmulo de colesterol livre no fígado resulta em alteração no seu transporte intracelular, nas vias envolvidas na sua excreção e síntese de ácidos biliares e um desequilíbrio na sua homeostase celular. Em conjunto, essas alterações culminam no dano hepático por ativar vias pró-inflamatórias (FON TACER; ROZMAN, 2011; SIMONEN et al., 2011; MIN et al., 2012).

Portanto, modelos experimentais utilizando dietas ricas em gordura saturada e colesterol podem ser usados como estratégia para induzir a esteatose hepática e os distúrbios metabólicos associados.

2.1.5. Efeito dos Compostos Bioativos na NAFLD

A principal recomendação clínica, como um passo inicial do tratamento da esteatose hepática, é a modificação do estilo de vida (DONGIOVANNI et al., 2016). Intervenções que visem à dieta, exercício e modificações no comportamento com o objetivo de promover 7 a 10% de redução da massa corporal, conduzem a uma significativa melhora da esteatose hepática, inflamação e lesão hepatocelular de indivíduos com NASH, além de reduzir o risco para doenças cardiovasculares (PROMRAT et al., 2010; SULLIVAN et al., 2012).

Em adição à ingestão de energia, a composição da dieta também afeta as funções metabólicas e endócrinas, bem como o balanço energético global (RYAN; DESMOND; WILSON, 2013). A maioria das recomendações encorajam a redução no consumo de gorduras totais, ácidos graxos saturados, gorduras *trans* e frutose. Por outro lado, o consumo de frutas e legumes ricos em compostos bioativos (ácidos graxos mono e poli-insaturados, polifenóis, fibras, vitaminas A, E e C) tem sido associado com a prevenção de doenças crônicas, incluindo a NAFLD, uma vez que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (MUSSO et al., 2003; MANCO; CALVANI; MINGRONE, 2004).

Os efeitos dos compostos bioativos sobre a NAFLD têm ganhado destaque no meio científico e alguns deles têm sido sugeridos para o tratamento da esteatose hepática, sendo que na maioria dos estudos destacam-se uma melhora na função hepática e na histologia (DEL BEN et al., 2016; DONGIOVANNI et al., 2016) (Figura 3).

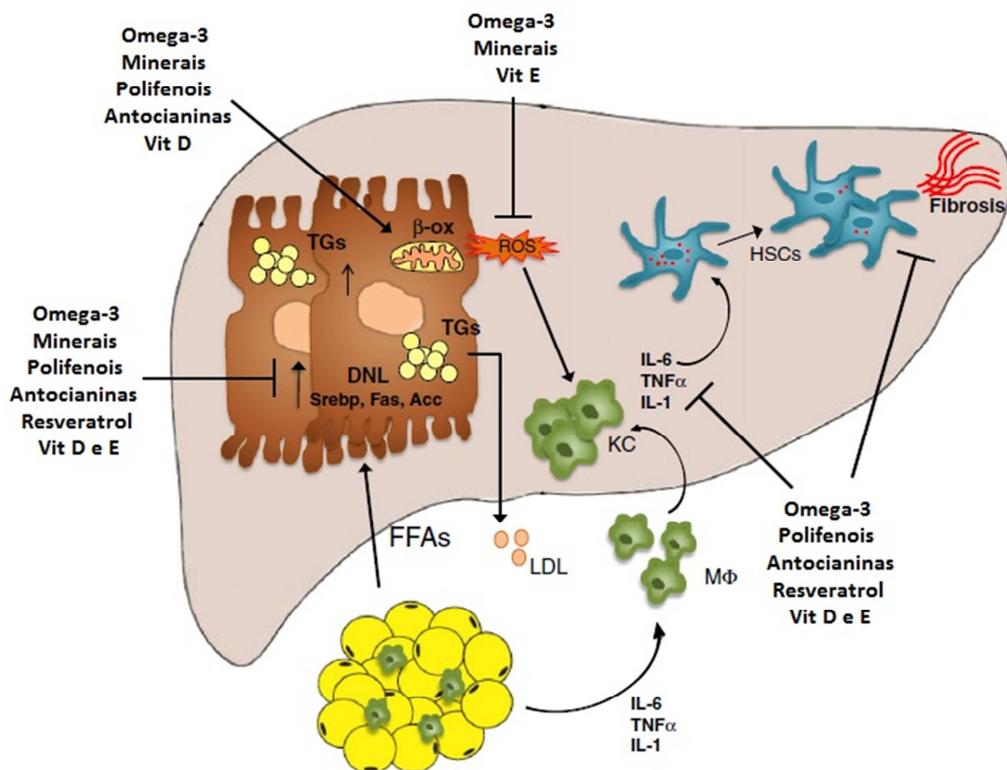


Figura 3. Mecanismos moleculares envolvidos no efeito hepatoprotetor dos compostos bioativos. Na figura estão listados os principais compostos bioativos, indicando os possíveis mecanismos pelos quais podem melhorar a lesão hepática na NAFLD.

Vit: vitamina; TGs: triacilglicerídeos; FFAs: ácidos graxos livres; β-ox: β-oxidação; DNL: lipogênese “de novo”; FAS: enzima ácido graxo sintase; ACC: enzima acetil-CoA carboxilase; ROS: espécies reativas de oxigênio; HSCs: células esteladas do fígado; KC: células de Kupffer; MΦ: macrófagos.

→ ativação; —| inibição.

Fonte: Adaptado de DONGIOVANNI et al. (2016).

O aumento no consumo de ácidos graxos mono e poli-insaturados reduz a esteatose, uma vez que esses compostos modulam o metabolismo de lipídios em hepatócitos através da restauração da expressão gênica de PPARα e diminuição da expressão de enzimas lipogênicas via redução do fator de transcrição SREBP-1c, favorecendo, assim, a oxidação de ácidos graxos. Além disso, os PUFAs reduzem a inflamação, fibrose e peroxidação lipídica, e aumentam a atividade de enzimas antioxidantes (CAPANNI et al., 2006; SPADARO et al., 2008; KAJIKAWA et al., 2011).

A vitamina E possui efeito antioxidante sobre a peroxidação lipídica e sua suplementação em pacientes com NASH promoveu uma redução na inflamação, fibrose e esteatose hepática (SANYAL et al., 2010). Em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, a vitamina E reduziu estresse oxidativo, peroxidação lipídica, níveis de

TNF- α , inflamação e fibrose no fígado (RASO et al., 2009; CHUNG et al., 2010; TZANETAKOU et al., 2012). Já com relação a vitamina D, evidências demonstram que ela regula a proliferação e diferenciação celular, além de apresentar propriedades anti-inflamatória, antifibrótica e imunomodulador. Estudos *in vivo* também comprovam o seu efeito benéfico sobre a esteatose hepática, melhorando o perfil lipídico sérico via redução da lipogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos (YIN et al., 2012; DING et al., 2013).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* investigam as propriedades dos polifenóis e a sua relação com a NAFLD, apesar de haver poucas evidências clínicas quanto aos seus efeitos no tratamento da esteatose hepática. Em geral, os polifenóis agem como antioxidantes, reduzem o acúmulo de gordura no fígado, principalmente por inibir a lipogênese e aumentar a oxidação de ácidos graxos, além de melhorar a resistência à insulina e inflamação, inibindo a via do fator nuclear kappa B (NF κ B) (PANDEY; RIZVI, 2009; VAN DE WIER et al., 2015). O consumo do suco de *bayberry*, rico em polifenóis, reduziu os níveis de biomarcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos em indivíduos jovens com NAFLD (GUO, H. et al., 2014). Em estudos *in vivo*, o consumo de polifenóis melhora o metabolismo da glicose, acúmulo de lipídios no fígado e reduz níveis de TNF- α (PARK, H. J. et al., 2013; CHENG et al., 2014).

As antocianinas têm sido largamente investigadas devido ao seu potencial efeito na prevenção e tratamento de diferentes doenças. Alimentos ricos em antocianinas melhoram a hiperlipidemia, controlam o estresse oxidativo e atenuam a esteatose hepática em modelos experimentais que induzem NAFLD (SEYMOUR et al., 2008). Até o momento, poucos estudos em humanos foram realizados e, dentre os já finalizados, tem-se uma divergência quanto a fonte de antocianinas, doses e as características clínicas dos pacientes. Mas em geral, eles demonstraram que a ingestão de antocianinas reduz a atividade de enzimas como a gama-glutamyltransferase (GGT) e ALT, e melhora a resistência à insulina (SUDA et al., 2008; ZHANG, P.-W. et al., 2015). Diversos estudos *in vitro*, principalmente utilizando células HepG2, observaram que as antocianinas podem prevenir a progressão da disfunção hepática: inibindo a lipogênese (reduzindo SREBP-1c), promovendo lipólise (induzindo a atividade PPAR α ativando a via da AMPK) e reduzindo o estresse oxidativo (aumentando a atividade de enzimas antioxidantes) (CHANG et al., 2013; JIA et al., 2013; JIANG et al., 2014). Com relação aos estudos *in vivo* utilizando diferentes modelos experimentais que induzem a NAFLD e síndrome metabólica, os resultados demonstraram que o consumo

de antocianinas por camundongos obesos e/ou alimentados com uma dieta hiperlipídica foi eficaz em promover uma redução no estresse oxidativo, inflamação e fibrose. Além disso, reduziu o acúmulo de gordura no fígado associado com uma diminuição da lipogênese hepática (SALAMONE et al., 2012; TANG, XILAN et al., 2015).

Neste contexto, o consumo de alimentos que contenham estes compostos bioativos poderia ser uma boa alternativa na prevenção e no tratamento da NAFLD.

2.2. JABUTICABA

2.2.1. Caracterização Botânica

A jabuticabeira, *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae, é uma planta nativa do Brasil encontrada em grande parte do país, com maior ocorrência nos estados da região Sudeste. O seu nome é originário do tupi, “iapoti’kaba” e significa fruta em botão. A planta floresce geralmente duas vezes ao ano (julho-agosto e novembro-dezembro) e os frutos maduros ocorrem em agosto-setembro e janeiro (LORENZI, 1992). A sua importância econômica está na utilização de seus frutos tanto para fins culinários quanto para fins medicinais. Por exemplo, podem ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, geleias, compotas e doces. Além disso, sua fermentação produz licores, vinhos e vinagre, e sua casca adstringente é indicado, pela medicina popular, para tratamento de diarreia, asma e irritações da pele (REYNERTSON et al., 2006). Devido a sua grande ocorrência no país, existem diferentes variedades da sua espécie, havendo diversos sinônimos. Dentre as mais conhecidas, destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba paulista ou jabuticaba açu) encontradas em Minas Gerais e no Rio de Janeiro, e *Myrciaria jaboticaba* (jabuticaba sabará) que seriam frutas nativas nas regiões do Rio de Janeiro e São Paulo (MATTOS, 1983).

O fruto de jabuticaba possui formato arredondado, a casca tem uma coloração que pode variar do roxo escuro ao preto e é adstringente, a polpa é esbranquiçada conferindo o sabor agradavelmente doce ao fruto e apresenta comumente uma única semente, mas podendo apresentar até 4 sementes (LIMA, A. D. J. B. et al., 2008). Em média, as partes casca, polpa e semente representam, respectivamente, 40%, 30% e 30% do fruto inteiro (DE JESUS et al., 2004). Com relação à composição nutricional, a jabuticaba contém compostos bioativos capazes de promover benefícios à saúde. Nas cascas dos frutos estão presentes, principalmente, as antocianinas responsáveis pela cor arroxeada e, na polpa, encontram-se ferro, fósforo, vitamina C e niacina (LIMA, A. D. J. B. et al., 2008; SILVA et al., 2008).

É um fruto muito popular no Brasil, sendo comparável a uvas na Europa ou nos Estados Unidos (BATISTA et al., 2013). Porém, embora a sua popularidade no país seja grande, sua comercialização é prejudicada, uma vez que o fruto é muito perecível. Além disso, normalmente as cascas e sementes são desprezadas durante o preparo de produtos

derivados, o que representam juntos mais de 50% da fruta (OLIVEIRA et al., 2003). Portanto, um maior aproveitamento dessas frações agregaria maior valor a essa fruta, uma vez que a casca, como foi dito anteriormente, contém compostos nutricionais com potencial funcional.

A Figura 4 ilustra as fotos representativas da jabuticabeira, da jabuticabeira com frutos maduros no seu tronco e os frutos da jabuticaba mostrando as suas partes casca, polpa e sementes.

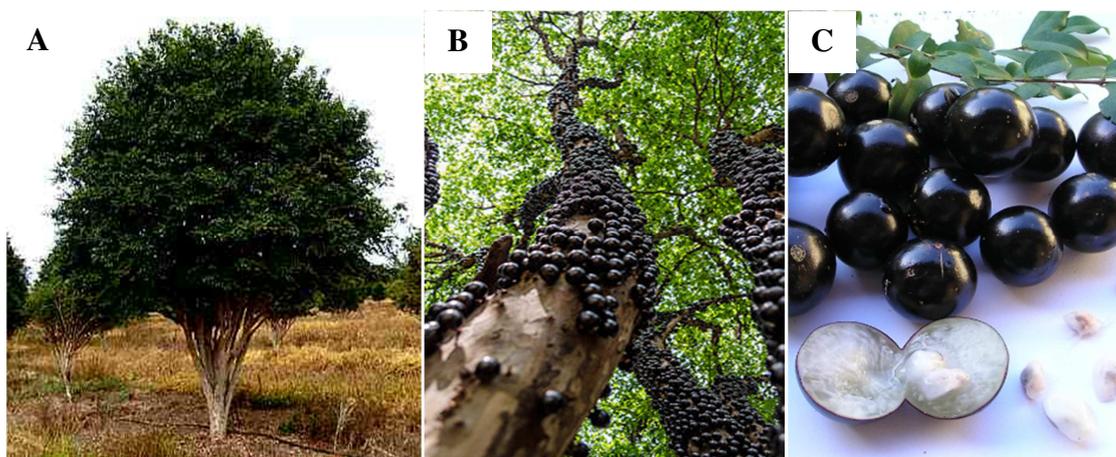


Figura 4. Fotos representativas em A: Jabuticabeira *Plinia cauliflora*; B: Frutos maduros sobre o tronco da árvore; C: Frutos jabuticaba (casca, polpa e sementes).

2.2.2. Jabuticaba como Alimento Funcional

Vários estudos vêm demonstrando uma relação entre dieta e doenças crônicas e, dentro deste contexto, os alimentos funcionais ganham cada vez mais destaque (WANG, L. et al., 2013). Não existe uma definição universalmente aceita para os alimentos funcionais. Porém, várias organizações vêm tentando criar uma definição para essa classe de alimentos. No Brasil, por exemplo, a ANVISA (BRASIL, 1998) define-os como “alimentos que podem, além de cumprir com suas funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

O Quadro 1 contempla os resultados de alguns trabalhos que avaliaram a composição centesimal de diferentes cascas de jabuticaba. Em suma, os resultados mostram que esta possui alto teor de carboidratos, em torno de 50g em 100g de casca, e alto teor de fibras dietéticas, predominando a fração insolúvel, que corresponde mais de

20% da composição. Segundo a *Dietary reference intakes* de 2002 (DRIs), fibra dietética refere-se a carboidratos e lignina não digeríveis, intactos e inerentes às plantas. Já fibra funcional, consiste também em carboidratos não digeríveis que foram isolados, extraídos ou fabricados, mas que são capazes de promover benefícios fisiológicos aos humanos (TRUMBO et al., 2002). Além disso, a casca de jabuticaba apresenta baixos teores de lipídios totais. Como pode ser observado, há uma discrepância entre os resultados e isso pode ser decorrente às diferenças morfológicas e químicas entre as variedades, bem como os diversos graus de maturação e de umidade dos frutos.

Já quanto aos micronutrientes, estudos comprovam que a jabuticaba é rica em potássio, magnésio, cálcio, cobre e ferro, vitaminas C, B1, B2, niacina e significativos níveis dos aminoácidos triptofano e lisina, além de conter compostos fenólicos e ácido elágico (RUFINO et al., 2010; LIMA, A. D. J. B. et al., 2011b; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012).

Quadro 1. Composição da casca de jabuticaba (g/100g) segundo diferentes estudos.

	Araújo et al, 2014	Lage et al, 2014	Marques et al, 2012	Lima et al, 2008
Carboidratos	51.61 ± 1.29	32.17 ± 1.30	49.46	60.64
Proteínas	1.26 ± 0.30	5.53 ± 0.18	4.89 ± 0.10	1.16
Lipídios	0.72 ± 0.23	1.59 ± 0.41	1.72 ± 0.02	0.57
Minerais	4.26 ± 0.16	5.46 ± 0.57	3.52 ± 0.02	4.40
Fibras	25.28 ± 2.52	(I) 27.51 ± 1.08 (S) 6.05 ± 0.78	(I) 20.00 ± 2.00 (S) 5.00 ± 0.50	(I) 26,43 (S) 6,80
Umidade	14.45 ± 0.63	21.69 ± 0.20	15.33 ± 0.19	-

Fibra dietética solúvel (S); fibra dietética insolúvel (I).

Diversos fitoquímicos já foram identificados (taninos, flavonas, fitoesteróis, saponinas e alcaloides), mas ainda uma grande percentagem permanece desconhecida. E a função de proteção desses compostos está, principalmente, associada com a sua atividade antioxidante, ou seja, são capazes de reduzir a maioria das ERO (GUO, Y.-J. et al., 2012; ZHANG, Y.-J. et al., 2015).

Dentre os compostos fitoquímicos encontrados na casca de jabuticaba destacam-se os polifenóis, predominantemente os flavonoides e antocianinas (LIMA, A. D. J. B. et al., 2008; CIPRIANO, 2011; LEITE et al., 2011; ALEZANDRO et al., 2013). Os polifenóis, dentre os vegetais, são o maior grupo que possui atividade bioativa, sendo

subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. Quanto as ações fisiológicas desenvolvidas por eles, estas estão relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da sua elevada capacidade antioxidante (FALLER; FIALHO, 2009).

Os flavonoides consistem de um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, amplamente distribuídos nos vegetais dando cor a folhas, flores e frutos. São caracterizados estruturalmente como difenilpropanos (C3-C6-C6) e são agrupados em diversas subclasses incluindo antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavanonas. Eles são, geralmente, encontrados nos alimentos como O-glicosídeos com o açúcar normalmente ligado na posição C3 (KING; YOUNG, 1999).

As antocianinas são os constituintes mais abundantes na jabuticaba, estão presentes exclusivamente na casca deste fruto e possui entre 58,1-315 mg de antocianinas por 100g do fruto fresco (REYNERTSON et al., 2006; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; WU, S.-B. et al., 2012). Diversos trabalhos evidenciaram que as antocianinas predominantes na casca da jabuticaba são cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo (EINBOND et al., 2004; TERCI, 2004; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; LIMA, A. D. J. B. et al., 2011a; MARQUES et al., 2012; ALEZANDRO et al., 2013; DRAGANO et al., 2013; ALVES et al., 2014; LAGE, 2014). Outros flavonoides são encontrados como a quercetina, rutina e isoquercitrina (REYNERTSON et al., 2006).

Além disso, o estudo de REYNERTSON et al. (2006) também identificou na jabuticaba um outro grupo importante de polifenóis chamado taninos, incluindo o ácido gálico e o ácido elágico. Paralelamente a este estudo, o trabalho de ABE; LAJOLO; GENOVESE (2012) confirmou a presença de níveis significativamente altos de ácido elágico na jabuticaba quando comparado a outras frutas da família Myrtaceae, tais como camu-camu e grumixama, assim como o teor de antocianinas totais foi próximo aos encontrados em morangos e superior ao camu-camu. Este trabalho também encontrou que os taninos estão presentes em maiores concentrações nas sementes da jabuticaba, seguido pela casca e a polpa.

A Figura 5 mostra a estrutura química geral dos principais polifenóis e antocianinas presentes na casca da jabuticaba.

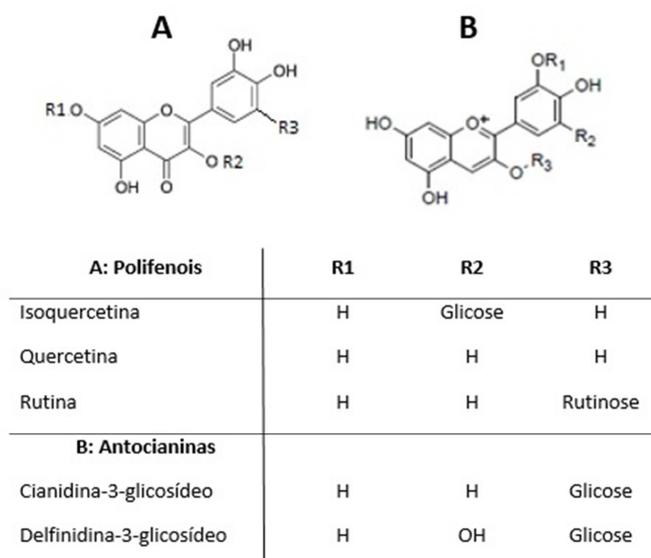


Figura 5. Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba. A: estrutura química dos polifenóis; B: estrutura química das antocianinas; R1: radical 1; R2: radical 2; R3: radical 3. Adaptado de WU, S.-B.; LONG; KENNELLY (2013).

2.2.3. Atividades Biológicas

Tendo em vista que a casca da jabuticaba possui quantidades significativas de compostos bioativos, vários estudos vêm demonstrando sua capacidade antioxidante em adição com outras atividades biológicas importantes *in vitro* e *in vivo* como hipolipidêmica, antidiabetes, antimicrobiana e anti-inflamatória.

Atividade antioxidante *in vitro*:

A atividade antioxidante de um alimento está relacionada com a sua habilidade de proteger os organismos aeróbicos do estresse oxidativo devido a presenças de substâncias capazes de neutralizar radicais livres e/ou quelar íons metálicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Há na literatura diversos trabalhos que confirmam a atividade antioxidante *in vitro* da jabuticaba utilizando diferentes ensaios químicos como a capacidade de sequestrar radicais peroxil avaliada pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), inibição dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico) (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; LEITE-LEGATTI et al., 2012; BATISTA et al., 2014). Segundo estudo de LIMA, A. D. J. B. et

al. (2011a) que avaliou a atividade antioxidante *in vitro* nas diferentes frações da jabuticaba através do método ABTS, a casca da jabuticaba expressou maiores valores comparado às demais frações: 1.56 ± 0.13 (casca), 0.08 ± 0.01 (polpa), 0.92 ± 0.08 (semente) e 1.20 ± 0.11 mmol L⁻¹ g⁻¹ eq. Trolox (fruto inteiro).

Estudos realizados em diferentes espécies de frutas nativas brasileiras com o objetivo de investigar a capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos dessas frutas observaram que existe uma correlação positiva entre a concentração total de polifenóis e a atividade antioxidante dos frutos. Além disso, a jabuticaba demonstrou atividade antioxidante expressiva entre as espécies analisadas (RUFINO et al., 2010; PERES et al., 2013). Já um estudo de BARROS; CAMPOS; MOREIRA (2010) verificou a atividade antioxidante de vinhos de jabuticaba e uva, e observaram que os vinhos de jabuticaba apresentaram os melhores resultados.

Atividade antioxidante in vivo e Papel da jabuticaba no controle da obesidade e diabetes:

Os resultados obtidos em estudos conduzidos *in vivo* e clínico reforçam o papel da casca de jabuticaba em promover benefícios à saúde.

LEITE et al. (2011) investigaram o efeito da ingestão da casca de jabuticaba liofilizada (CJL) sobre o potencial antioxidante avaliado no plasma de ratos *Wistar* machos. No primeiro experimento a jabuticaba foi administrada de forma que cada animal recebesse 7 mg de antocianinas/100g de peso corporal por gavagem e foram realizadas análises da capacidade antioxidante no sangue por ORAC e TEAC após 0, 30, 60 120 minutos da administração. Os autores não observaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Porém, no segundo experimento onde 40 ratos *Wistar* machos foram divididos em 4 grupos experimentais que consumiram, respectivamente, 0, 1, 2 e 4% de CJL adicionada à dieta, os autores encontraram um aumento no potencial antioxidante no plasma nos animais que receberam 1 e 2% da CJL pelos mesmos ensaios avaliados anteriormente.

LENQUISTE et al. (2012) avaliaram o efeito da CJL adicionada a dieta hiperlipídica sobre o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina e observaram que o consumo de 1, 2 e 4% da CJL reduziu os níveis de insulina sérica e o índice HOMA-IR (modelo de avaliação da homeostase – resistência à insulina). Além

disso, a adição de 2% da CJL aumentou 41,65% dos níveis de colesterol HDL quando comparado ao grupo controle.

ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE (2013) avaliaram o efeito do consumo de jabuticaba liofilizada (1 e 2 g/kg de peso) sobre o estresse oxidativo e o perfil lipídico sérico de ratos diabéticos STZ-induzidos. A administração de jabuticaba promoveu uma redução em 32% nos níveis de colesterol e 50% nos níveis séricos de TG séricos; aumentou a atividade antioxidante no plasma; reduziu peroxidação lipídica no plasma e cérebro; aumentou atividade de enzimas antioxidantes: SOD no cérebro, CAT no rim e fígado, e GPx no plasma, rim e fígado.

DRAGANO et al. (2013) investigaram os efeitos da CJL sob parâmetros metabólicos em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. A suplementação com 1, 2 ou 4% da CJL foi eficiente em reduzir a resistência à insulina, evidenciado pelo teste de tolerância à insulina e, posteriormente, confirmado pela análise da via de sinalização desse hormônio, uma vez que observou-se um aumento na expressão proteica do receptor de insulina, Akt fosforilada e IRS-1 fosforilado no fígado e tecido adiposo abdominal. Além disso, os autores observaram uma redução na expressão gênica de IL-1 β e IL-6, e redução na expressão proteica de I κ B- α fosforilada. Esses resultados sugerem, então, que a CJL pode exercer efeito protetor contra a obesidade associada a resistência à insulina e inflamação.

BATISTA et al. (2013) avaliaram o efeito de dietas hiperlipídicas adicionadas de 1, 2 e 4% de CJL sobre os perfis lipídicos no soro, fígado e fezes. Os níveis de colesterol e TG séricos não foram alterados. Porém, o consumo de 2% da CJL foi eficiente em reduzir peroxidação lipídica no fígado. Já nas fezes, os animais que receberam 1 e 4% da CJL excretaram maior teor de TG. Outros estudos foram conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa nos anos posteriores. BATISTA et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes doses da CJL sobre o *status* antioxidante de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Neste trabalho os autores encontraram que o consumo da CJL reduziu ácidos graxos saturados no soro; aumentou defesas antioxidantes no plasma, fígado e rim; e preveniu peroxidação lipídica no fígado e cérebro. Já BATISTA et al. (2017) avaliaram se a suplementação com 4% da casca de jabuticaba em uma dieta hiperlipídica melhoraria a sensibilidade à insulina em camundongos *Swiss* adultos após 10 semanas de tratamento, e os resultados revelaram que o tratamento com a casca de jabuticaba preveniu o ganho de peso e a resistência periférica à insulina. Além disso, os autores também observaram uma melhora no desempenho da aprendizagem e memória

nos animais dos grupos tratados. Por fim, BATISTA et al. (2018) verificaram se a ingestão de 4% de CJL poderia evitar efeitos nocivos causados por uma dieta hiperlipídica (31% de banha de porco) em camundongos *Swiss*. Os resultados mostraram que a suplementação com a CJL foi eficiente em reduzir citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo e preveniu o acúmulo de gordura neste tecido. O tratamento com a CJL também preveniu o ganho de peso, aumentou a excreção fecal de TG, reduziu a área da esteatose hepática e estimulou a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs). Além disso, houve uma redução na expressão gênica de PPAR α , indicando uma menor oxidação lipídica no fígado.

LAGE et al. (2015) averiguaram o efeito da farinha da casca de jabuticaba (0,5, 1,5 e 3%) sobre a peroxidação e perfil lipídico sérico e hepático em ratos fêmeas da linhagem Fischer no modelo experimental de hipercolesterolemia. Os grupos que receberam a farinha da casca de jabuticaba reduziram a atividade da AST e ALT. Já os animais que consumiram 3% da farinha apresentaram um aumento de 20,23% nos níveis séricos do colesterol HDL comparado ao grupo controle; apresentaram menor acúmulo de colesterol hepático e diminuíram esteatose macrovesicular no fígado. Além disso, a suplementação com 1,5 e 3% foi eficiente em reduzir a peroxidação lipídica no fígado. Portanto, a farinha da casca de jabuticaba demonstrou um efeito hipolipidêmico e hepatoprotetor.

PLAZA et al. (2016) estudaram a ingestão da casca de jabuticaba sobre parâmetros antioxidantes e glicêmicos em um estudo placebo controlado e randomizado em 10 voluntários saudáveis (5 homens e 5 mulheres) com $26,5 \pm 3,4$ anos de idade e IMC $22,9 \pm 1,1$ kg/m². Os autores encontraram que a capacidade antioxidante sérica foi significativamente maior quando os indivíduos consumiram a refeição teste contendo jabuticaba, e a insulina sérica diminuiu após a segunda refeição às 4 h após o consumo da casca de jabuticaba.

HUANG (2017) avaliou o efeito de diferentes concentrações de um extrato aquoso da *Myrciaria cauliflora* sobre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (5% de óleo de soja e 15% de banha de porco) em ratos *Wistar*. Os resultados mostraram que a administração dietética do extrato (0,5; 1; 1,5%) reduziu o peso corporal e parâmetros bioquímicos séricos como TG, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, enzimas AST e ALT, e reduziu a esteatose hepática. Além disso, o extrato também modulou a expressão de proteínas relacionadas à síntese de lipídios (CPT-1, SREBP-1, PPAR α) verificada por *western blotting*.

LAMAS et al. (2018) desenvolveram um extrato patenteado de casca de jabuticaba com o objetivo de investigar o efeito dose-dependente de PJE no fígado e no metabolismo de camundongos envelhecidos alimentados com alto teor de gordura. Os resultados revelaram que ambas as doses (2,9 e 5,8 g PJE/kg do animal) preveniram o ganho de peso corporal, dislipidemia, hiperglicemia, reduziu os níveis de COX-2 e melhorou os níveis de colesterol HDL, pIRS-1 e PPAR γ , indicando que a ingestão do extrato pode prevenir distúrbios hepáticos e metabólicos associados à obesidade, diabetes e envelhecimento.

Diante do exposto e considerando que a casca da jabuticaba exibe efeito antioxidante, hipolipidêmico e anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais, nós hipotizamos que este fruto possui potencial para interferir em diversos *hits* envolvidos na patogênese da NAFLD, contribuindo para prevenir ou retardar sua progressão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) sobre a NAFLD e os fatores envolvidos na sua gênese em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Avaliar a composição centesimal, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e citotoxicidade da farinha da casca de jabuticaba (FCJ);
- II. Investigar os efeitos da FCJ em ratos alimentados com dieta hiperlipídica sobre:
 - ✓ Ingestão e massa corporal;
 - ✓ Danos hepáticos através da análise de enzimas séricas e morfologia;
 - ✓ Níveis de lipídios no fígado e excretados nas fezes;
 - ✓ Lipemia, glicemia e teste de tolerância oral à glicose (TTOG);
 - ✓ Morfologia do tecido adiposo abdominal;
 - ✓ Expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de lipídios;
 - ✓ Níveis séricos de citocinas pro e anti-inflamatórias;
 - ✓ Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes no fígado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo da Farinha da Casca de Jabuticaba (FCJ)

A jabuticaba foi adquirida em Cachoeira do Campo, distrito da cidade de Ouro Preto, Minas Gerais em novembro de 2014. A árvore onde foram colhidas foi identificada no Herbário Professor José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (voucher: N.N. Lage, 1 - OUPR) e está localizada a 20°23'45.0''S 43°30'34.2''W (SISGEN: A06098D).

Para a produção da FCJ, inicialmente, foram coletados 40 kg do fruto inteiro de jabuticaba. Os frutos foram lavados em água corrente, sanitizados e a casca foi separada manualmente da polpa/semente. As cascas foram, então, secas em estufa à 40 °C/24 horas, trituradas em liquidificador e, por fim, pulverizadas (Figura 6). Os 2 kg de FCJ obtidos foram armazenados a -20°C em pacotes plásticos escuros e devidamente selados.



Figura 6. Fotos do processamento da farinha da casca de jabuticaba mostrando em A: Fruto jabuticaba inteiro; B: Casca da jabuticaba fresca e C: Farinha da casca de jabuticaba após secagem em estufa. Foto: Arquivo pessoal.

4.2. Caracterização da FCJ

4.2.1. Composição Centesimal

As determinações de umidade residual (105°C), proteínas, lipídios, cinzas e fibras dietéticas na FCJ foram realizadas em triplicatas de amostras, segundo métodos da AOAC (HORWITZ; LATIMER, 2000). As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Na determinação de umidade utilizou-se o método de secagem em estufa à temperatura de 105°C. As cinzas totais foram determinadas após as amostras serem submetidas à incineração em mufla (500-600°C). Para determinação das

proteínas utilizou-se o Método de Kjeldahl, ao qual consiste na determinação através de N total. Os lipídeos foram determinados pela extração com solvente à quente, onde o extrator utilizado foi do tipo Soxhlet. As fibras dietéticas totais, solúvel e insolúvel, foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico que consiste no tratamento com enzimas digestivas (alfa-amilase termoestável, protease, amiloglucosidade), precipitação alcoólica, com posterior determinação do teor de proteínas e cinzas no resíduo seco. Essa último procedimento é necessário para que os teores de proteínas e cinzas sejam descontados do valor da fibra dietética total.

4.2.2. Teor de Polifenóis Totais nas Frações Extraível e Não Extraível

O teor de polifenóis totais foi determinado em ambas às frações fenólicas extraível e não extraível da FCJ. Inicialmente, a fração fenólica extraível (E) foi obtida a partir de 0,5 g da FCJ por extração sequencial com solvente orgânico (3 ml de metanol pH 2,0; 3 ml de acetona/água). O resíduo insolúvel remanescente foi seco (Savant SpeedVac ISS110-115, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) e submetido a hidrólise alcalina para libertar a fração fenólica não extraível (NE) como descrito anteriormente por (LUO et al., 2016). Os fenólicos totais extraíveis e não extraíveis foram quantificados pelo micrométodo de Folin Ciocalteu (CONDEZO-HOYOS; MOHANTY; NORATTO, 2014) contra uma curva padrão de ácido gálico (0-0,2 mg/ml) e o teor de polifenóis totais foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100g da farinha.

O teor de antocianinas monoméricas totais na fração extraível (EMA) foi determinado pelo método do pH diferencial, como previamente descrito por GIUSTI; WROLSTAD (2001), e expressa em mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g da FCJ.

O teor de proantocianidinas poliméricas na fração não extraível (NEPA) foi quantificado utilizando os procedimentos relatados por ZURITA; DÍAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO (2012). Resumidamente, o extrato fenólico não extraível da FCJ foi diluído em água e posteriormente homogeneizado em vórtex. A absorbância foi imediatamente determinada a 450 nm e 555 nm usando FLUOstar® Omega (BMG Labtech). Assim, a absorbância foi calculada usando a fórmula: $Abs = (Abs\ 450\ nm + Abs\ 555\ nm)$ e o NEPA foi calculado contra a curva padrão reportada por Zurita et al. (2012) ajustada com um fator de correção de 0,82.

4.2.3. Capacidade Antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante da FCJ foi determinada através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Esse método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH em solução de metanol. O DPPH, que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina de coloração amarela.

As determinações foram realizadas adicionando em tubos de ensaio, 3,9 mL de solução de DPPH 60 µM, dissolvidos em metanol 80%, e 100 µL de solução com FCJ em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75 e 1,25 mg/mL) e de água destilada (amostra controle).

Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante de referência. Do mesmo modo, adicionou-se em tubos de ensaio 3,9 mL de solução de DPPH e 100 µL de solução de Trolox em diferentes concentrações (200, 300 500 e 600 µM) em metanol 80%.

Posteriormente, cada tubo foi homogeneizado e mantido na ausência de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A atividade foi determinada através da redução da absorbância do radical DPPH a 515nm e os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).

4.2.4. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar a citotoxicidade da FCJ em linhagem celular de hepatocarcinoma (HepG2) adquirida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de glicose 1% de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina, e mantida em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando o reagente MTT (brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) como descrito previamente por FOTAKIS; TIMBRELL (2006). Resumidamente, as células HepG2 (1×10^5) foram cultivadas em placas de 96 poços na ausência (controle e veículo hidroetanólico) ou presença do extrato hidroetanólico da FCJ (10-800 µg/mL) por 24 h. Após a incubação, o meio foi removido e 200 µl da solução de 5 mg/mL de MTT foram adicionados e incubados a 37 °C por mais 1 h.

Posteriormente, 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para dissolver os cristais de formazan e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas. A viabilidade celular foi expressa em percentual calculada com base na fórmula: (absorbância das células tratadas/ controle de absorbância) × 100, considerando o controle como 100% de viabilidade.

4.3. Animais

Foram utilizados 32 ratos Fischer fêmeas, com aproximadamente 45 dias de idade e pesando cerca de $140 \pm 2,0$ g provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O protocolo relativo ao uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFOP (Protocolo: 2014/53) (Anexo I).

4.4. Dieta

Os animais receberam dieta padrão AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993) ou dieta hiperlipídica (32% banha de porco e 1% de colesterol) acrescidas ou não de 4% da FCJ conforme apresentado na Tabela 1.

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição, UFOP, acondicionadas em sacos plásticos protegidos de luminosidade e armazenadas em freezer a -20°C.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta).

Componentes	Dietas (g/1000g)			
	Padrão	Padrão + 4% FCJ	Hiperlipídica	Hiperlipídica + 4% FCJ
Amido de Milho	620,7	580,7	290,7	250,7
Caseína	140	140	140	140
Sacarose	100	100	100	100
Celulose	50	50	50	50
Mist. Minerais ¹	35	35	35	35
Mist. Vitaminas ²	10	10	10	10
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Cisteína	1,8	1,8	1,8	1,8
Óleo de Soja	40	40	40	40
Banha de Porco	-	-	320	320
Colesterol	-	-	10	10
FCJ	-	40	-	40
Valor Calórico (kcal)	3802,8	3744,7	5452,8	5394,7

¹ - **Mistura de Minerais** (expresso em g/kg da mistura): NaCl - 74/KI - 0,01/Citrato Tripotássico - 28/CaCO₃ - 357/MnCO₃ - 0,63/Citrato de Ferro - 6,06/ MgO - 24/ K₂SO₄ -46,6/ KH₂PO₄ - 250 / ZnCO₃ - 1,65/CuCO₃ - 0,3/Na₂SeO₄ - 0,01/(NH₄)₆MoO₂₄ . 4 H₂O - 0,00795.

² - **Mistura de Vitaminas** (expresso em g/kg da mistura): Niacina - 3/ Pantotenato de Cálcio - 1,6/Piridoxina HCl - 0,7/Tiamina HCl - 0,6/Riboflavina - 0,6/Ácido Fólico - 0,2/Biotina - 0,02/Cianocobalamina - 2,5/Vitamina E (500 IU/g) - 15/Vitamina A (500.000 IU/g) - 0,8/Vitamina D (400.000 IU/g) - 0,25/Vitamina K - 0,075/Sacarose q.s.p. 1Kg.

4.5. Delineamento Experimental

Trinta e dois animais foram divididos em quatro grupos contendo 8 animais em cada de acordo com o tratamento recebido (Figura 7): o grupo controle (C), recebendo dieta padrão (AIN-93M); grupo controle jabuticaba (CJ), recebendo dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 4% de farinha da casca de jabuticaba (FCJ); grupo hiperlipídico (HF) recebendo dieta contendo 32% de banha de porco e 1% de colesterol; grupo hiperlipídico jabuticaba (HFJ), recebendo dieta hiperlipídica acrescida de 4% de FCJ.

O experimento teve duração de 8 semanas e ao final deste período os animais foram deixados de jejum por 12 horas, anestesiados com isoflurano e eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno e centrifugados a 3000 g por 15 minutos, o soro foi retirado e armazenados à -80°C. O fígado, intestino delgado

e gorduras abdominal, uterina, marrom e mesentérica foram coletados, pesados, imersos em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a -80°C para análises posteriores. O menor lobo do fígado e um fragmento do tecido adiposo abdominal foram mantidos em formol 4% tamponado para análise histopatológica.

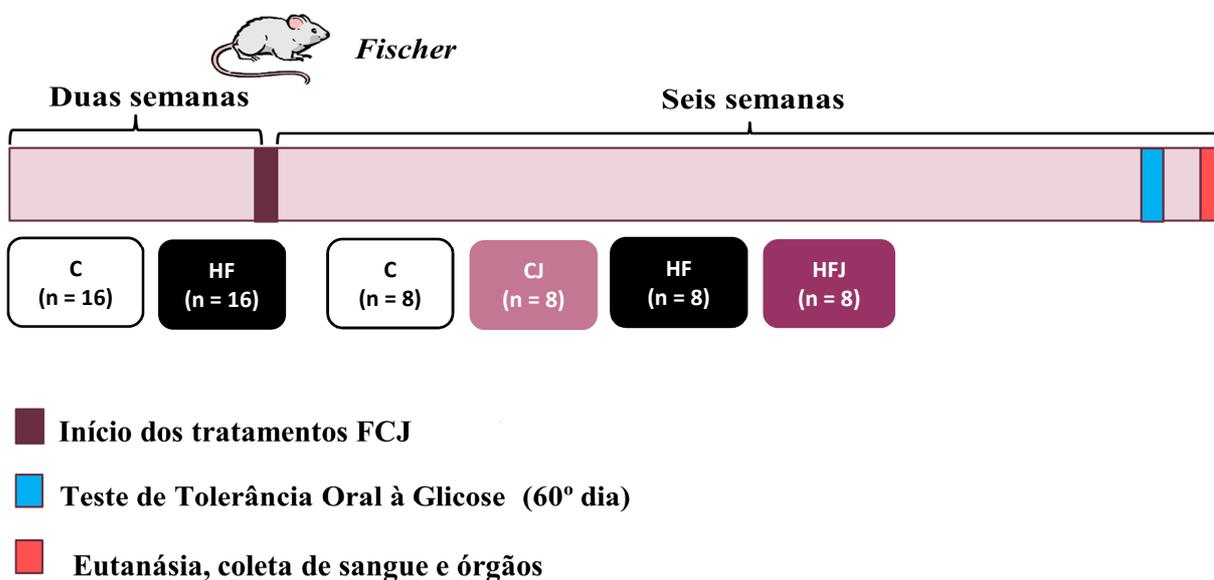


Figura 7. Delineamento Experimental.

4.6. Índice de Lee e Índice de Adiposidade

Para avaliar o peso corporal dos animais em relação aos seus respectivos comprimentos realizou-se o cálculo do Índice de Lee (NOVELLI et al., 2007) que consiste no cálculo, ao final do experimento, da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal (CNA):

$$\text{Índice de Lee} = \sqrt[3]{\frac{\text{Peso corporal (g)}}{\text{CNA (cm)}}} \quad (1)$$

O índice de adiposidade foi determinado a partir da soma de diversas camadas adiposas (gordura abdominal, uterina e mesentérica) dividido pelo peso corporal final do animal.

4.7. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

O TTOG foi realizado no 60º dia do experimento. Para isso, os animais foram deixados em jejum por 12 horas e, posteriormente, receberam 2,5 g de glicose por Kg de peso corporal por gavagem. Para tal foi utilizada uma solução de glicose 25% ajustando o volume injetado para o peso do animal. A glicose plasmática foi medida antes (tempo 0) e após 30, 60 e 120 minutos, utilizando glicosímetro digital (Accu- Chek Active® da Roche).

4.8. Análises Bioquímicas no Soro e/ou Plasma

As dosagens bioquímicas - colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL-c), triacilglicerídeos (TG), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, glicose - foram realizadas utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A de acordo com as instruções do fabricante.

Os níveis séricos de insulina e adiponectina foram determinados pelo método de imunoensaio do tipo Elisa sanduíche, utilizando o Kit *Ultra Sensitive Rat Insulin Elisa Kit*, (Cat. #90060, Crystal Chem, Downers Grove, IL., EUA) e Kit *Rat Adiponectin Elisa Kit* (Cat. #KRP0041, Novex, Life Technologies Corp., EUA) respectivamente.

4.9. Extração de Lipídios nas Fezes e no Fígado

Os lipídios totais fecais e do fígado foram extraídos de acordo com o método proposto por FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY (1957). Inicialmente, 200 mg de fezes macerada e 200 mg de fígado foram homogeneizados com 2 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, vol/vol). Em seguida, foram adicionados aos tubos 0,4 mL de metanol, que foi então centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado 0,8 mL de clorofórmio e 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73%. Após este procedimento, foi feita uma nova centrifugação a 3.000 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 0,3 mL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% metanol, 47% água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa semiaberta a 40 °C, esfriados em dessecador para posterior pesagem e, então, ressuspensos em

isopropanol para a análise de colesterol total e TG. Os conteúdos de lipídios totais foram determinados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídios e o mesmo tubo vazio. Os conteúdos de colesterol total e TG foram determinados utilizando-se Kits Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

4.10. Análises Bioquímicas no Tecido do Fígado

4.10.1. Concentração de TNF α :

Os níveis de TNF- α no fígado foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo Elisa sanduíche, utilizando o Kit *Rat TNF- α ELISA Kit* (Cat. n° KRC3011) (Invitrogen, Frederick, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o preparo das amostras de fígado utilizou-se fragmentos de 150 mg homogeneizados em 0,75 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2), centrifugou-se a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante foi utilizado como amostra biológica.

4.10.2. Peroxidação Lipídica por TBARS:

A oxidação de lipídios pode ser avaliada através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA), o mais abundante aldeído resultante de peroxidação lipídica e sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma um produto que pode ser detectado espectrofotometricamente. Para se determinar a peroxidação lipídica foi utilizado o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de BUEGE; AUST (1978). Inicialmente, 100 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão Tris-HCl (20 mM) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foram misturados com 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/vol em HCl 0,25 N), 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% de ácido acético 0,25 N) e 12,5 mL de butilhidroxitolueno (BHT) (125 mM em etanol), aquecido por 15 min a 95°C e colocado em banho de gelo. Foram transferidos 0,5 mL da mistura para um tubo de polipropileno e adicionados 0,5 mL de butanol. Os tubos foram agitados e, após uma centrifugação de 10.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e plaqueado. A absorbância foi determinada a 535nm e a água destilada foi utilizada como branco. Uma curva padrão

com o MDA foi construída. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

4.10.3. Proteínas Carboniladas

A oxidação de proteínas por ERO resulta na introdução de grupos carbonilados em proteínas. Estas proteínas carboniladas podem ser mensuradas utilizando o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A concentração de proteínas carboniladas foi determinada conforme descrito por LEVINE et al. (1994). Inicialmente, 200 mg do fígado foram homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,7) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, 0,2 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de polipropileno previamente identificados como amostra e respectivos brancos. A cada tubo, foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA 20%) e, após homogeneização, foram adicionados 0,5 mL de DNPH 10 mM aos tubos com as amostras e 0,5 mL de HCl 2M aos brancos. Todos os tubos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 15 minutos e a cada 5 minutos foram agitados vigorosamente. No passo seguinte, foram adicionados 0,7 mL de TCA 20% em cada tubo. Esses foram centrifugados a 2.000 g por 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 ml da mistura etanol/acetato de etila na proporção de 1:1, agitados vigorosamente em vórtex e novamente centrifugados a 5.000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido por mais duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados em ambos os tubos 0,5 ml de guanidina 6M (pH 2,5), misturados no vórtex e centrifugados a 5.000 g por 2 minutos a 4 °C. Por fim, pipetaram-se 0,2 mL dos sobrenadantes correspondentes a cada amostra e brancos em uma microplaca e as absorbâncias foram determinadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína. O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de *Lambert Beer*.

4.10.4. Atividade da Enzima Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método proposto por AEBI (1984) que se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, acompanhado durante 3 min a 240 nm. Inicialmente, 100 mg do fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2), em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante resultante foi utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno adicionaram-se 990 μ L de uma solução de H_2O_2 10 mM, o qual foi mantido em termobloco a 25 °C por 1 minuto. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ L da amostra e as absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco. A atividade da catalase foi calculada utilizando a equação de *Lambert Beer* e o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39,4 $M^{-1}cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em unidade de atividade por miligrama de proteína (U/mg), onde uma unidade de catalase é equivalente à decomposição de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

4.10.5. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase

Atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método adaptado de MARKLUND; MARKLUND (1974), baseado na auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT). O superóxido é gerado por auto oxidação do pirogalol em meio básico e a superóxido dismutase compete por este radical inibindo a auto oxidação. A quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição da auto oxidação do pirogalol é considerada como uma unidade de atividade enzimática. Inicialmente, 100 mg do fígado foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em uma microplaca foram pipetados em cada poço 30 μ L de amostra, 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT 1,25 mM e 15 μ L de pirogalol 100 μ M. Para o branco foram pipetados 144 μ L de tampão fosfato e 6 μ L de MTT e para o padrão 129 μ L de tampão, 6 μ L de MTT e 15 μ L de pirogalol. Em seguida a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37 °C. Logo após a incubação, 150 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados às mesmas para

parar a reação e as absorbâncias foram lidas a 570 nm. Para o cálculo da atividade de superóxido dismutase, expressa em U de SOD/mg de proteína, foi utilizado à fórmula descrita abaixo:

$$\text{Atividade de SOD} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{padrão}} - A_{\text{branco}}} \quad (2)$$

Onde:

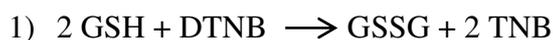
A_{amostra} : absorbância da amostra

$A_{\text{padrão}}$: absorbância do padrão

A_{branco} : absorbância do branco

4.10.6. Conteúdo de Glutationa Total, Oxidada e Reduzida

O conteúdo de glutathione total foi determinado por meio de um ensaio que utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)) a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) proposto por GRIFFITH (1980), que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm, conforme descrito nas seguintes reações:



A combinação das duas reações:



Para o procedimento experimental, 100 mg do fígado foram homogeneizados com 1 mL de ácido de sulfosalicílico 5% e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Em microplaca, foram adicionados 10 µL do sobrenadante do homogenato e 150 µL de solução contendo 95 mM de tampão fosfato (pH 7,0), EDTA 0,95 mM, NADPH 48 µM, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutathione redutase (GR), e 0,24% de ácido de sulfosalicílico. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH 0,16 mg/mL foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram

lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA a 412 nm. As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutathiona reduzida (GSH) foram determinadas conforme descrito anteriormente, para obtenção da curva padrão. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathiona total.

Para determinar a concentração de glutathiona oxidada (GSSG), 100 mg do fígado foram homogeneizados com 1 mL de ácido de sulfosalicílico 5% e, em seguida, centrifugado por 10 minutos à 4°C. Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µL do sobrenadante a 2 µL de vinilpiridina e a mistura foi agitada em vórtex. O pH foi ajustado na faixa 6-7 com trietanolamina (TEA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 60 min e, em seguida, procedeu-se o ensaio conforme a dosagem da glutathiona total.

A concentração de GSH foi obtida pela subtração entre a glutathiona total e a GSSG.

4.10.7. Atividade das Enzimas Glutathiona Peroxidase e Redutase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com o método proposto por PAGLIA; VALENTINE (1967) com modificações. O método se baseia na oxidação da GSH, catalisada pela GPx, acoplada a reciclagem da GSSG através da reação catalisada pela enzima GR que utiliza o NADPH como cofator. O decréscimo na absorbância medida a 340 nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da GPx. Inicialmente, 100 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 1 mL de tampão Tris HCL 50 mM (pH 7,0). Após centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4° C o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL de tampão de ensaio, 10 µL de amostra e 80 µL do mix composto por NADPH 0,25 mM, GSH 2,1 mM, 0,5 U/mL de GR e azida sódica 1 mM. A azida sódica foi adicionada ao meio, para inibir a atividade da catalase que também utiliza peróxido de hidrogênio como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de H₂O₂ 0,2 mM, utilizado como substrato da reação. A oxidação do NADPH foi monitorada a 340 nm. Foram realizadas cinco leituras, com intervalo de vinte segundos entre elas. A atividade da GPx foi calculada utilizando a fórmula descrita abaixo:

(3)

$$\textit{Atividade de GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\textit{min}}{3,73 \mu\textit{mol}/\textit{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde:

ΔA_{340} é o delta da absorbância por minuto;

3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH. O valor real do coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ é de 6,22, no entanto este valor foi ajustado para o caminho óptico da solução em microplaca de 0,6 cm;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL;

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto a 25° C. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

A determinação da atividade enzimática da GR foi realizada de acordo com o método proposto por CARLBERG; MANNERVIK (1985). O ensaio é baseado na redução da GSSG pelo NADPH na presença da GR. Amostras de 100 mg de fígado foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA. Após centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4° C o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 60 μL de tampão de ensaio, 100 μL de GSSG 2 mM e 10 μL de amostra. A reação foi iniciada pela adição de uma solução 2 mM de NADPH. A atividade da GR foi mensurada espectrofotometricamente através da redução da absorbância, causada pela oxidação do NADPH a 340 nm. Foram realizadas dez leituras, com intervalo de vinte segundos entre elas e a atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

(4)

$$\textit{Atividade de GR} = \frac{\Delta A_{340}/\textit{min}}{3,73 \mu\textit{mol}/\textit{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde:

ΔA_{340} é o delta da absorvância por minuto;

3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH. O valor real do coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ é de 6,22, no entanto este valor foi ajustado para o caminho óptico da solução em microplaca de 0,6 cm;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL;

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto a 25° C. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

4.10.8. Determinação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais nas amostras de fígado utilizadas para a determinação da peroxidação lipídica por TBARS, níveis de proteínas carboniladas, atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase e redutase foram determinadas de acordo com o método de LOWRY et al. (1951).

4.11. Análise Histopatológica do Fígado e Gordura Abdominal

Ao final do experimento, o menor lobo do fígado dos animais foram removidos e fixados em formol tamponado a 4%. Com relação à gordura abdominal, um fragmento foi removido e, primeiramente, colocado em álcool 70% por 24 horas e, posteriormente, fixados em formol tamponado a 4%.

Para efetuar a análise histológica, inicialmente, os tecidos foram cortados transversalmente e processados em série crescente de álcoois e, posteriormente, foram molhados em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro micrômetros de espessura foram obtidos em micrótomo, semi-automático, montados em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. Utilizou-se a técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (H&E) para identificar possíveis alterações teciduais. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital (Leica Application Suite, Versão 2.40R1, Alemanha) situado no Laboratório Multiusuários do NUPEB. A análise histológica foi realizada a partir de 10 imagens

(campos) aleatórios do tecido do fígado e tecido adiposo abdominal, e todas as fotomicrografias foram obtidas na ampliação de 400x.

Com relação ao tecido do fígado analisou-se a esteatose hepática de acordo com os critérios propostos por BRUNT et al. (1999), nos quais a graduação da esteatose se baseia no percentual de hepatócitos que apresentam acúmulo de gordura, sendo Ausente: 0%; Discreto: < 33%; Moderado: entre 33% e 66%; Intenso > 66% dos hepatócitos afetados. Além disso, analisou-se o número de células inflamatórias presente nesse tecido através do *software Leica QWin Plus*.

Já no tecido adiposo abdominal realizou-se a análise da área dos adipócitos utilizando o *software Image J*, no qual foram contabilizados cinco adipócitos por fotomicrografia.

4.12. Ensaio de qRT-PCR

4.12.1. Extração de RNA

O RNA total do fígado de ratos foi isolado utilizando o sistema *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por leitura em espectrofotômetro (*Nano Vue*, GE Healthcare) no comprimento de onda de 260nm. A pureza do RNA total foi verificada pela razão A260/A230 que indica possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos. As amostras com razões entre 2 e 2,2 foram consideradas adequadas para quantificação da expressão gênica.

Após a extração, realizou-se a separação do RNA total em gel de agarose para avaliar a sua integridade. Para isso, utilizou-se gel desnaturante de agarose 1,2% contendo formaldeído 37% e utilizou-se o brometo de etídio para visualizar as bandas 28S e 18S do RNA.

4.12.2. Síntese de cDNA

O ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de amostras de RNA total a 100 ng/μL utilizando o kit *Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems*, (Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 μL de tampão 10x (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 25 mM de MgCl₂, pH 8,3), 0,8 μL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 2 μL de primers randômicos e 1 μL da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/μL). A reação foi realizada nas seguintes condições, 10 minutos a 25 °C, seguido de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C no termociclador *Biocycler* modelo MJ96+.

4.12.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de mRNA de *Rattus norvegicus* disponível no banco de dados *Gen Bank (National Center for Biotechnology Information)* utilizando o programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O gene de referência endógeno utilizado foi o 18S, pois dentre os normalizadores avaliados, foi o que apresentou menor variação entre os grupos experimentais. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de qRT-PCR

Genes	Sequências
rRNA 18S	F: 5' GTAAGTGC GGGTCATAAG 3' R: 5' CCATCCAATCGGTGTGC 3'
ABCG5	F: 5' AGGCTCAGTTACAGGCTCAGAG 3' R: 5' GTC CCACTTCTGCTGGCATGAT 3'
ACAT-1	F: 5' GTCTCTGAGAAACCGGCTGT 3' R: 5' CCAACTGCCTCTTCTTGGCT 3'
ACOX-1	F: 5' TGGAACCTGTTGGCCTCAAT 3' R: 5' ATCTGGAGTTCTTGGGACGG 3'
ACC	F: 5' GCTAAACCAGCACTCCCGAT 3' R: 5' GTATCTGAGCTGACGGAGGC 3'
ApoB100	F: 5' AGTAGTGGTGC GTCTTGGATCC 3' R: 5' ACTCTGCAGCAAGCTGTTGAAT 3'
CYP7A1	F: 5' GCTTTGGGCTTTAGACCCTCCC 3' R: 5' TTCGCTCCATGAAAACTTCTG 3'
FAS	F: 5' CTTGGGTGCCGATTACAACC 3' R: 5' CAGACACCTTCCCATCACACA 3'
HMG-CR	F: 5' AGATACTGGAGAGTGCCGAGAAA 3' R: 5' TTTGTGGCTGGGATGTGCTT 3'
LDL-R	F: 5' CCAACCTGAAGAATGTGGTG 3' R: 5' CAGGTCCTCACTGATGATGG 3'
LXR-α	F: 5' GGCCCTGCATGCCTATGT 3' R: 5' CATTAGCATCCGTGGGAA 3'
PPARα	F: 5' TGTCGAATATGTGGGGACAA 3' R: 5' AAACGGATTGCATTGTGTGA 3'
SREBP-2	F: 5' TGGGCTTCTTGGCTGCTACTT 3' R: 5' TTCGCTCCATGAAAACTTCTG 3'

rRNA 18S, Ácido ribonucleico ribossomal 18S; ABCG5, *ATP-binding cassette subfamily G member 5*; ACAT-1, Colesterol aciltransferase-1; ACC, Acetil Co-A carboxilase; ACOX-1, Acil-CoA oxidase 1; ApoB100, Apolipoproteína B100; CYP7A1, Colesterol-7 α -hidroxilase; FAS, ácido graxo sintase; HMGCoA-R, 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase; LDL-R, receptor da lipoproteína de baixa densidade; LXR- α , receptor X do fígado; PPAR- α , Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais; SREBP-2, Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-2.

4.12.4. Eficiência dos primers

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes alvo e do gene controle endógeno, foram construídas curvas padrões para cada *amplicon*, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise da regressão linear dos valores de CTs em função do logaritmo da respectiva diluição determinou o coeficiente angular da

reta (a, em $\gamma = ax + b$) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, utilizando a equação 5:

$$Ef = (10^{-1/\text{coeficiente angular}} - 1) \times 100 \quad (5)$$

4.12.5. qRT-PCR

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, com um volume final de reação de 12 μL , foram pipetados 2 μL de cDNA (25 ng/ μL), 0,5 μL de cada primer (*forward* e *reverse*, 10 μM), 6 μL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado com água livre de DNase. As reações foram realizadas nas seguintes condições, 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e então 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (anelamento dos primers e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa 7500 Software (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (C_q comparativo ou $\Delta\Delta C_q$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência rRNA 18S e o grupo controle foi utilizado como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de C_q (*quantification cycle*), que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial do PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔC_q de cada amostra, de acordo com a equação 4, na qual o valor do C_q do gene controle endógeno (18S) foi subtraído do C_q do gene alvo.

$$\Delta C_q = C_q \text{ do gene alvo} - C_q \text{ do gene de referência} \quad (6)$$

Em seguida foram calculados os valores de $\Delta\Delta C_q$, de acordo com a equação 6, na qual o valor do ΔC_q da amostra controle (grupo C) foi subtraído do ΔC_q das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ da amostra teste} - \Delta C_q \text{ da amostra controle} \quad (7)$$

Os valores do $\Delta\Delta C_q$ obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.13. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância com *post hoc* teste de Tukey e foram expressos como a média \pm erro padrão (EP). Os demais dados foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal Wallis com *post hoc* teste de Dunns e foram expressos como a mediana e percentis (25; 75). Utilizou-se o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (San Diego, California, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Composição centesimal e fitoquímica da FCJ

A composição centesimal da FCJ foi determinada e os resultados mostraram que esta possui alto teor de carboidratos e fibras, e baixo teor de lipídios. Já a análise fitoquímica demonstrou que a FCJ possui teores significativos de compostos fenólicos totais, dando destaque às antocianinas na fração fenólica extraível e proantocianidinas na fração fenólica não extraível (Tabela 3). Além disso, a FCJ demonstrou uma significativa capacidade antioxidante *in vitro*, sendo que 0,50 mg/mL do extrato hidroalcoólico da farinha foi capaz de diminuir a redução de 50% do radical DPPH.

Tabela 3. Composição centesimal, fitoquímica e atividade antioxidante da FCJ.

Constituintes	Média ± EP
Composição (g/100g):	
Umidade	10,13 ± 0,03
Lipídio	0,62 ± 0,003
Carboidrato ^a	49,62
Proteína ^b	5,19 ± 0,00
Cinzas	2,71 ± 0,06
Fibra Dietética	31,73 ± 0,4891 (S) 5,15 ± 0,07 (I) 26,58 ± 0,42
Compostos Bioativos:	
Compostos Fenólicos Totais (g EAG/100 g)	14,59 ± 0,07 (E) 12,10 ± 0,07 (NE) 2,49 ± 0,00
Antocianinas Monoméricas Totais (g C3G/100 g) ^c	0,82 ± 0,01
Proantocianidinas Poliméricas Totais (g PA/100 g) ^d	1,38 ± 0,02
Capacidade Antioxidante (µM TEAC/g)	
	797,73 ± 8,02

As análises foram feitas em triplicata e os dados são apresentados como a média ± EP. ^a Carboidratos = 100 - (umidade + proteína + lipídios + cinzas + fibras). ^b Fator de conversão do nitrogênio em proteína: 6,25. ^c Antocianinas monoméricas totais foi dosada na fração fenólica extraível. ^d Proantocianidinas poliméricas totais foi dosada na fração fenólica não extraível. Fibra dietética solúvel (S); fibra dietética insolúvel (I); fenólico extraível (E); fenólico não extraível (NE); equivalente de ácido gálico (EAG); cianidina-3-glicosídeo (C3G); proantocianidina (PA); capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC).

5.2. Avaliação de Citotoxicidade da FCJ

Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular avaliam a capacidade intrínseca de um material ou composto em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. O ensaio de MTT, realizado em células da linhagem HepG2 e incubadas por 24 horas com 10; 50; 100; 200; 400; 600 e 800 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroetanólico da FCJ, revelou que a viabilidade celular foi diminuída significativamente nas concentrações de 100; 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$, quando comparada ao grupo controle (Figura 8). Porém, segundo a ISO2009-10993-5, um extrato é considerado citotóxico quando o mesmo promove uma redução de 70% ou mais na viabilidade celular. Sendo assim, podemos inferir que nenhuma das concentrações avaliadas apresentou citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular foi superior a 70% em todas às concentrações avaliadas.

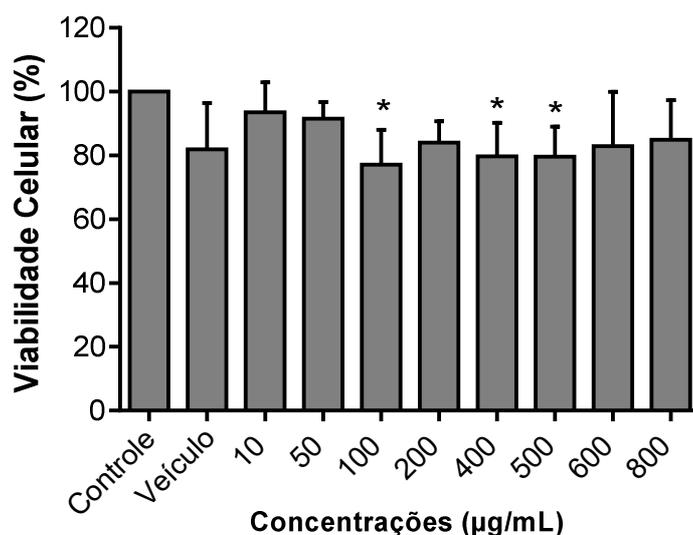


Figura 8. Viabilidade celular após 24 horas. Células HepG2 foram incubadas por 24 horas com extrato hidroetanólico da FCJ nas concentrações de 10; 50; 100; 200; 400; 600 e 800 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o teste de MTT. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que foi realizado um controle (células não tratadas) e para este atribuído 100% de viabilidade celular. Os dados foram expressos como média \pm EP. Foi realizado teste One-way ANOVA, onde diferenças foram consideradas quando $p < 0.05$. Veículo: controle tratado somente com solução hidroetanólica.

5.3. Massa corporal, ingestão alimentar e excreção fecal

A Tabela 4 mostra a massa corporal inicial e final, ingestão alimentar, excreção fecal e eficiência alimentar dos ratos dos respectivos grupos experimentais analisados neste estudo. Observamos que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram peso final, ganho de massa e eficiência alimentar significativamente maiores que os ratos alimentados com dieta controle. Por outro lado, a ingestão alimentar dos grupos hiperlipídicos foi menor comparado aos grupos controle. Além disso, o cálculo do Índice de Lee evidenciou que o peso em relação ao comprimento dos animais foi maior nos grupos HF e HFJ quando comparado ao grupo C. Já com relação à excreção fecal, observou-se que os ratos tratados com 4% da FCJ apresentaram um volume fecal maior do que os ratos que não receberam esse tratamento.

Tabela 4. Massa corporal inicial e final, ingestão alimentar, excreção fecal e eficiência alimentar de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba.

Variáveis	Grupos Experimentais				p
	C	CJ	HF	HFJ	
Massa corporal inicial (g)	139,60 ± 4,27	140,00 ± 5,51	140,20 ± 5,69	140,40 ± 3,91	0,999
Massa corporal final (g)	198,20 ± 2,52 ^b	194,10 ± 4,88 ^b	232,10 ± 6,41 ^a	237,90 ± 4,81 ^a	< 0,0001
Índice de Lee	2,12 ± 0,01 ^b	2,11 ± 0,02 ^b	2,22 ± 0,02 ^a	2,24 ± 0,01 ^a	< 0,0001
Ganho de massa (g)	58,59 ± 4,91 ^b	54,14 ± 2,46 ^b	91,91 ± 4,42 ^a	97,45 ± 1,39 ^a	< 0,0001
Ingestão alimentar (g/dia)	11,08 ± 0,32 ^a	11,31 ± 0,23 ^a	9,09 ± 0,32 ^b	9,57 ± 0,18 ^b	< 0,0001
Ingestão calórica (kcal/dia)	42,12 ± 1,24 ^b	42,36 ± 0,87 ^b	49,55 ± 1,74 ^a	51,65 ± 0,95 ^a	< 0,0001
Eficiência alimentar	0,75 ± 0,05 ^b	0,67 ± 0,03 ^b	1,44 ± 0,05 ^a	1,44 ± 0,03 ^a	< 0,0001
Excreção fecal (g/dia)	0,54 ± 0,03 ^c	0,85 ± 0,03 ^a	0,70 ± 0,04 ^b	0,95 ± 0,04 ^a	< 0,0001

Os dados são apresentados como média ± EP (*One-way* ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

5.4. Peso relativo dos órgãos

Ao final do experimento, os órgãos foram pesados e a Tabela 5 mostra os pesos relativos do fígado; gorduras abdominal, uterina, marrom e mesentérica. Observou-se que o peso relativo do fígado foi significativamente maior nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparado com os ratos alimentados com dieta controle, e a suplementação com a casca de jabuticaba não teve efeito nos grupos tratados (C = CJ e HF = HFJ). Com relação ao peso relativo do intestino delgado, os resultados mostram que os ratos do grupo HF apresentaram maior peso desse órgão e os ratos do grupo HFJ apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo C. Já quanto ao peso relativo das gorduras apenas observamos diferença estatística na gordura abdominal, onde observa-se que o grupo CJ apresenta valores menores do que os grupos hiperlipídicos. O índice de adiposidade foi estatisticamente semelhante entre todos os grupos experimentais.

Tabela 5. Pesos relativos do fígado, gorduras abdominal, uterina, marrom, mesentérica e intestino delgado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba.

Variáveis (g)	Grupos Experimentais				p
	C	CJ	HF	HFJ	
Fígado	2,95 ± 0,08 ^b	2,89 ± 0,04 ^b	4,90 ± 0,60 ^a	4,96 ± 0,13 ^a	< 0,0001
Gordura Abdominal	1,95 ± 0,16 ^{a,b}	1,62 ± 0,12 ^b	2,40 ± 0,14 ^a	2,45 ± 0,12 ^a	0,0005
Gordura Uterina	2,05 ± 0,23	1,90 ± 0,14	2,20 ± 0,15	2,12 ± 0,12	0,6185
Gordura Marrom	0,20 ± 0,0 ^a	0,17 ± 0,02 ^{a,b}	0,17 ± 0,02 ^{a,b}	0,14 ± 0,02 ^b	0,0449
Gordura Mesentérica	0,90 ± 0,06	0,85 ± 0,06	0,87 ± 0,07	0,90 ± 0,03	0,9059
Intestino Delgado	2,50 ± 0,19 ^b	2,32 ± 0,11 ^b	3,12 ± 0,11 ^a	2,26 ± 0,09 ^b	0,0002
Índice de Adiposidade	4,91 ± 0,39	4,38 ± 0,26	5,46 ± 0,24	5,47 ± 0,22	0,0342

Os dados são apresentados como média ± EP (*One-way* ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

5.5. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Para avaliar o comportamento da glicemia dos ratos estudados e se a dieta hiperlipídica resultou em um quadro de resistência à insulina, realizou-se o TTOG no 60º dia do experimento e a dosagem dos parâmetros bioquímicos séricos glicose e insulina. Como pode ser observado pela Figura 9, não encontrou-se diferença estatística entre os grupos HF e HFJ quando comparado ao grupo controle quanto a área total referente à glicemia medida no tempo 0 e após 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose (A e B) e nos níveis de glicose (C) e insulina séricas (D).

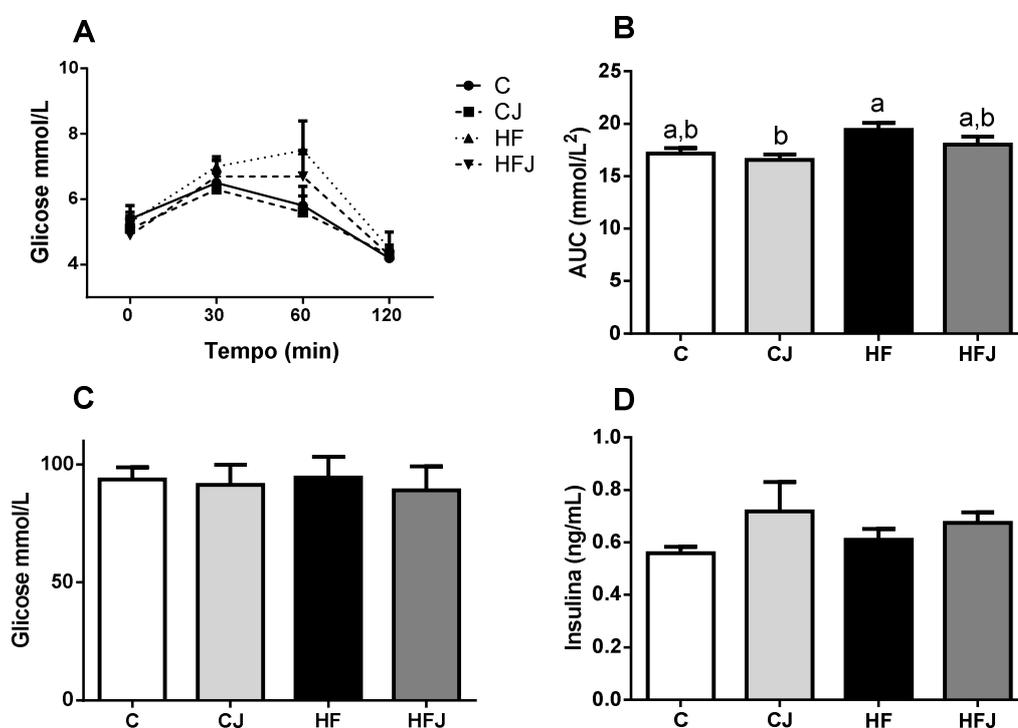


Figura 9. Curvas do TTOG, área sob a curva, glicemia e níveis séricos de glicose e insulina. Glicemia dos ratos no tempo 0 e após 30, 60, 120 minutos após a administração de solução contendo 2,5 g de glicose por Kg de peso corporal (A); glicemias correspondentes à área sob a curva do TTOG (B); concentração de glicose (C) e de insulina séricas (D). Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jaboticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jaboticaba.

5.6. Perfil lipídico sérico

A Figura 10 mostra os resultados encontrados quanto às concentrações séricas de colesterol total, colesterol HDL e TG. Os resultados mais importantes referem-se ao colesterol, onde os animais do grupo HF apresentaram níveis de colesterol total e fração não-HDL significativamente superiores quando comparado aos grupos controles. Por outro lado, o tratamento com a FCJ nos ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica foi eficaz em reverter ambas as alterações. Já com relação ao colesterol HDL, observou-se somente que os grupos HF e HFJ apresentaram níveis reduzidos em relação aos grupos C e CJ. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos níveis de TG.

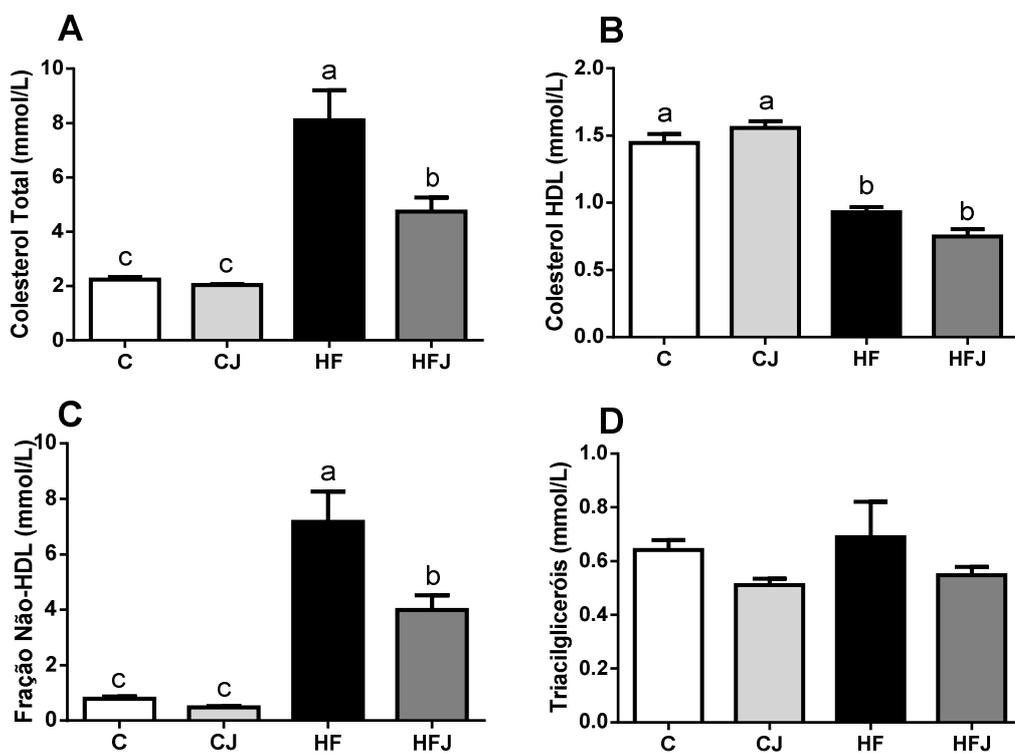


Figura 10. Perfil lipídico sérico de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Níveis séricos de colesterol total (A); colesterol HDL (B); fração não-HDL (C) e triacilgliceróis (D). Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

5.7. Indicadores séricos de dano hepático

As enzimas aminotransferases AST e ALT estão presentes nos hepatócitos, sendo que qualquer lesão tissular que afete o parênquima hepático pode provocar um aumento na liberação das mesmas para a corrente sanguínea. A fosfatase alcalina é uma enzima presente nas células que delimitam os ductos biliares do fígado e os seus níveis séricos aumentados são mais evidentes no caso de obstrução biliar (HENRY; AUBUCHON, 1997).

A atividade das enzimas ALT e fosfatase alcalina foram acentuadamente elevadas em ambos os grupos hiperlipídicos. Já com relação à atividade da AST, também observamos um aumento significativo no grupo HF quando comparado ao grupo C, sendo que o tratamento com FCJ no grupo HFJ reverteu a atividade desta enzima para níveis intermediários do grupo C (Figura 11), indicando menor dano hepático nestes animais.

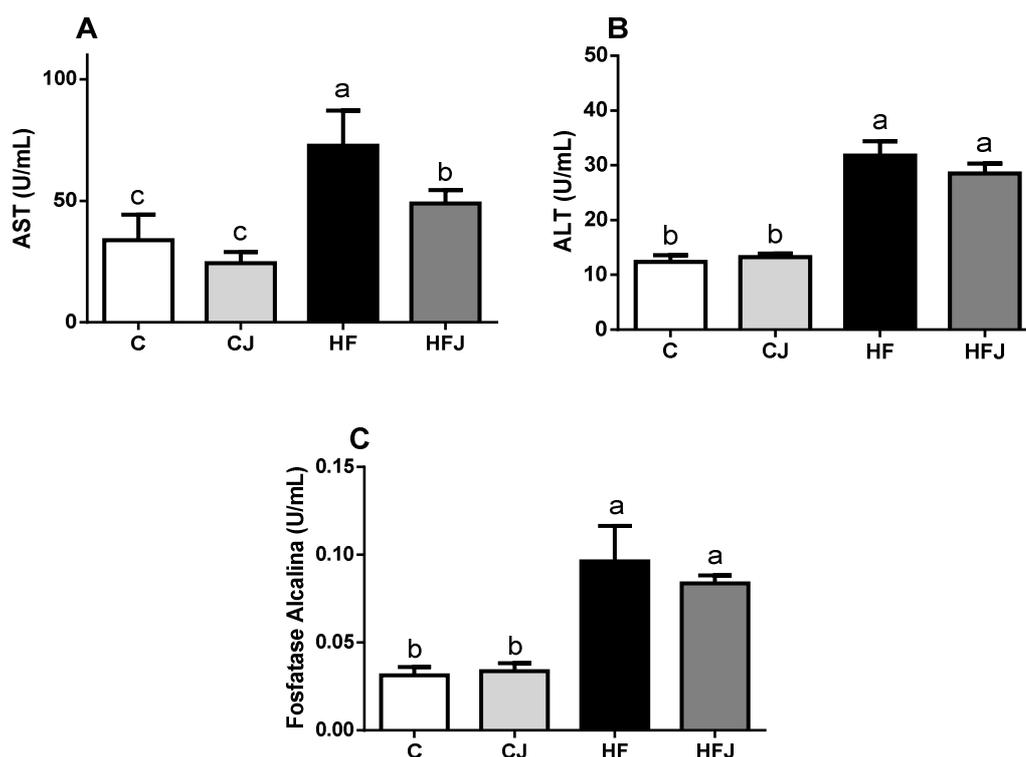


Figura 11. Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) (A), alanina aminotransferase (ALT) (B) e fosfatase alcalina (C) de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jaboticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jaboticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jaboticaba.

5.8. Lipídios totais no fígado e excretado nas fezes

O efeito da FCJ sobre o acúmulo de lipídios no fígado e sobre a excreção pode ser vistos na Figura 12. Os resultados encontrados tanto no fígado quanto nas fezes apresentaram o mesmo perfil lipídico: os animais dos grupos HF e HFJ excretaram nas fezes teores significativamente maiores de lipídios totais e colesterol, assim como o acúmulo de gordura total no fígado foi 5,63 vezes superior no grupo HF quando comparado ao grupo C ($p < 0,0001$), refletindo, também, nos níveis de colesterol neste órgão. Por outro lado, a suplementação com FCJ no grupo HFJ foi eficiente em promover um aumento de 33,80% da excreção de lipídios nas fezes quando comparado com o grupo HF ($p < 0,0001$), mas não observamos efeitos no fígado.

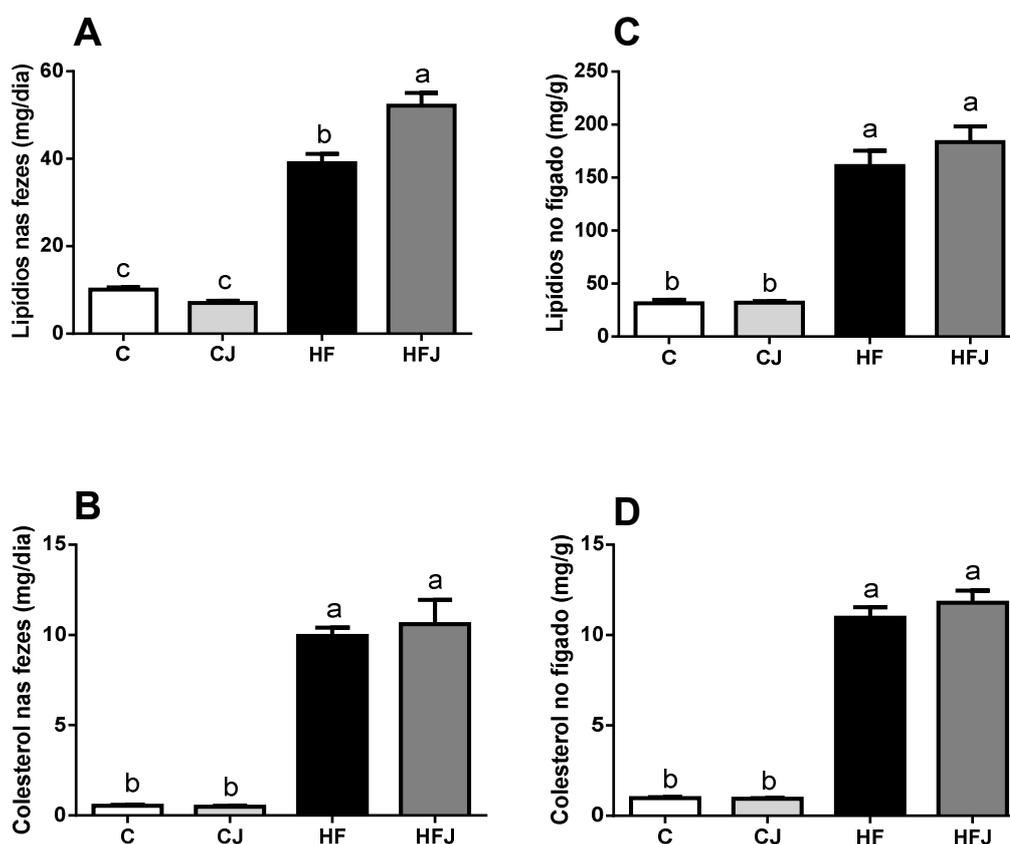


Figura 12. Lipídios totais e colesterol no fígado (mg/g) e excretado nas fezes (mg/dia). Resultados encontrados nas fezes (A e B) e resultados encontrados no fígado (C e D). Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jaboticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jaboticaba.

5.9. Análise morfológica do tecido do fígado e do tecido adiposo abdominal

Sabendo-se que o desenvolvimento da NAFLD está fortemente associadas com a alimentação e que o acúmulo de gordura visceral desempenha um papel importante no desenvolvimento dos efeitos deletérios provocados pelo excesso de gordura corporal, incluindo dislipidemia e esteatose hepática, foram realizadas análises histopatológicas do tecido do fígado e do tecido adiposo abdominal.

Com relação ao fígado, os resultados mostraram que a dieta hiperlipídica foi eficiente em desencadear a NAFLD, uma vez que a análise histológica comprova a presença de esteatose macrovesicular, variando de intenso a ausente, e a presença de esteatose microvesicular de grau intenso (Figura 13C, E e F). E a suplementação com 4% da FCJ promoveu uma redução significativa na gravidade da esteatose macrovesicular (Figura 13D e E), mas não alterou a microvesicular (Figura 13F). Com relação à contagem de células inflamatórias, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número dessas células (Figura 13G). Além disso, a análise dos níveis hepáticos de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória secretada pelo tecido adiposo, mostrou que a concentração desta citocina foi significativamente aumentada no fígado dos ratos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparado com os ratos que receberam dieta padrão, e os animais do grupo HFJ apresentaram valores intermediários (Figura 13H).

Já em relação ao tecido adiposo abdominal, observou-se que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo na área dos adipócitos (Figura 14C e E) em relação aos animais controle, evidenciando um maior acúmulo de gordura nesse tecido. Contudo, o tratamento com a casca de jabuticaba foi eficiente em manter a área dos adipócitos em ratos hiperlipídicos semelhante aos ratos do grupo controle (Figura 14D e E). Além disso, foi realizada a análise sérica dos níveis de adiponectina, uma citocina anti-inflamatória também secretada pelo tecido adiposo, e os resultados revelaram que seus níveis encontraram-se reduzidos nos grupos HF e HFJ, entretanto houve um aumento de 65,70% nos animais controles que receberam 4% da FCJ quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 14F).

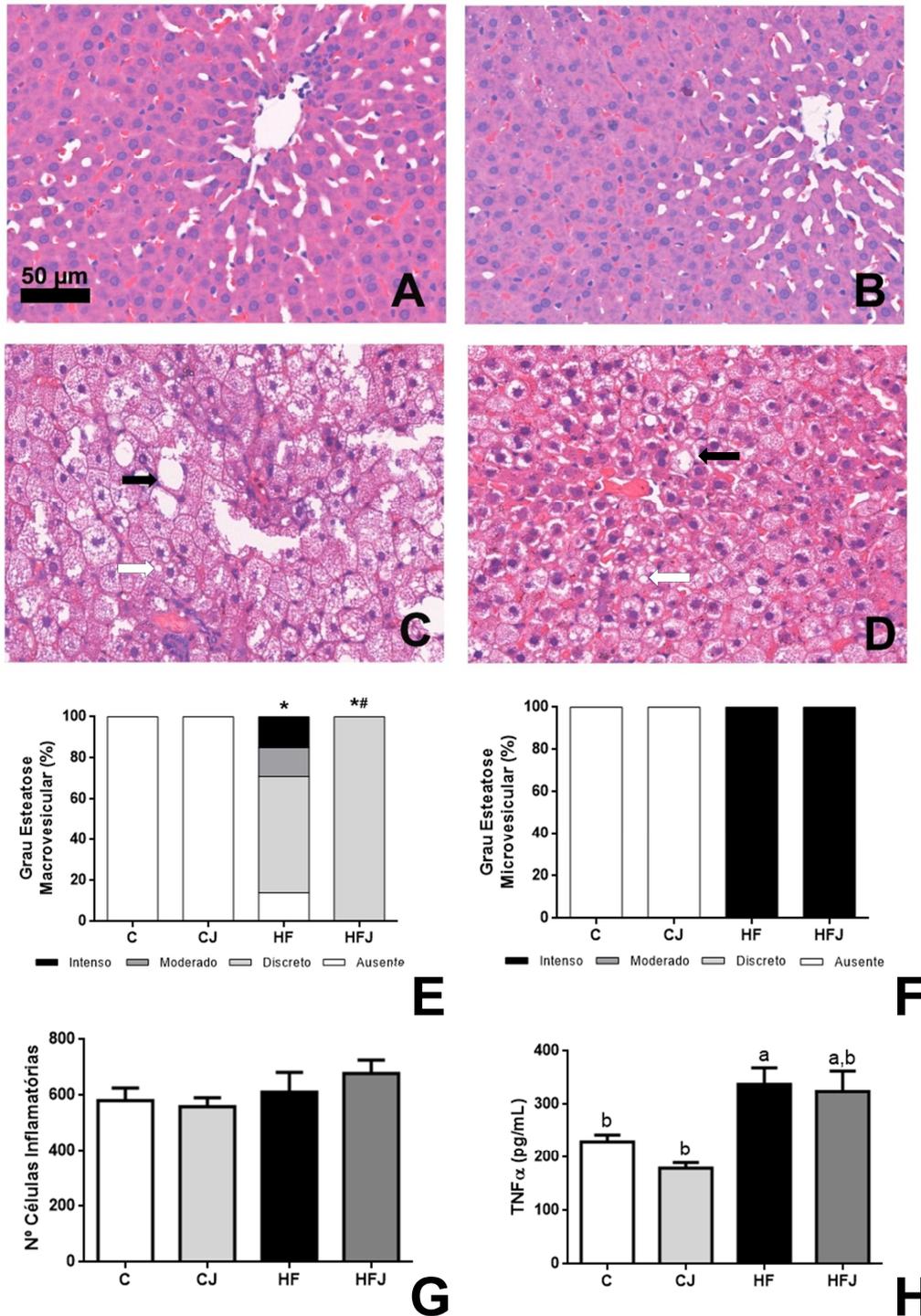


Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido do fígado de ratos pertencentes aos grupos Controle (A); Controle jaboticaba (B); Hiperlipídico (C) e Hiperlipídico jaboticaba (D) coradas com H&E em aumento de 400x. Barra de escala = 50 μm. Gráficos correspondentes à análise da esteatose macrovesicular (E) e esteatose microvesicular (F) dos respectivos grupos experimentais. Gráfico correspondente à contagem de células inflamatórias (G) e níveis hepáticos de TNF-α (H). Os dados são apresentados como média ± EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas estão representadas por letras ou símbolos diferentes: *p<0,05 em relação ao grupo C; #p<0,05 em relação ao grupo HF; +p<0,05 em relação ao grupo HFJ. Setas pretas: esteatose macrovesicular e setas brancas: esteatose microvesicular.

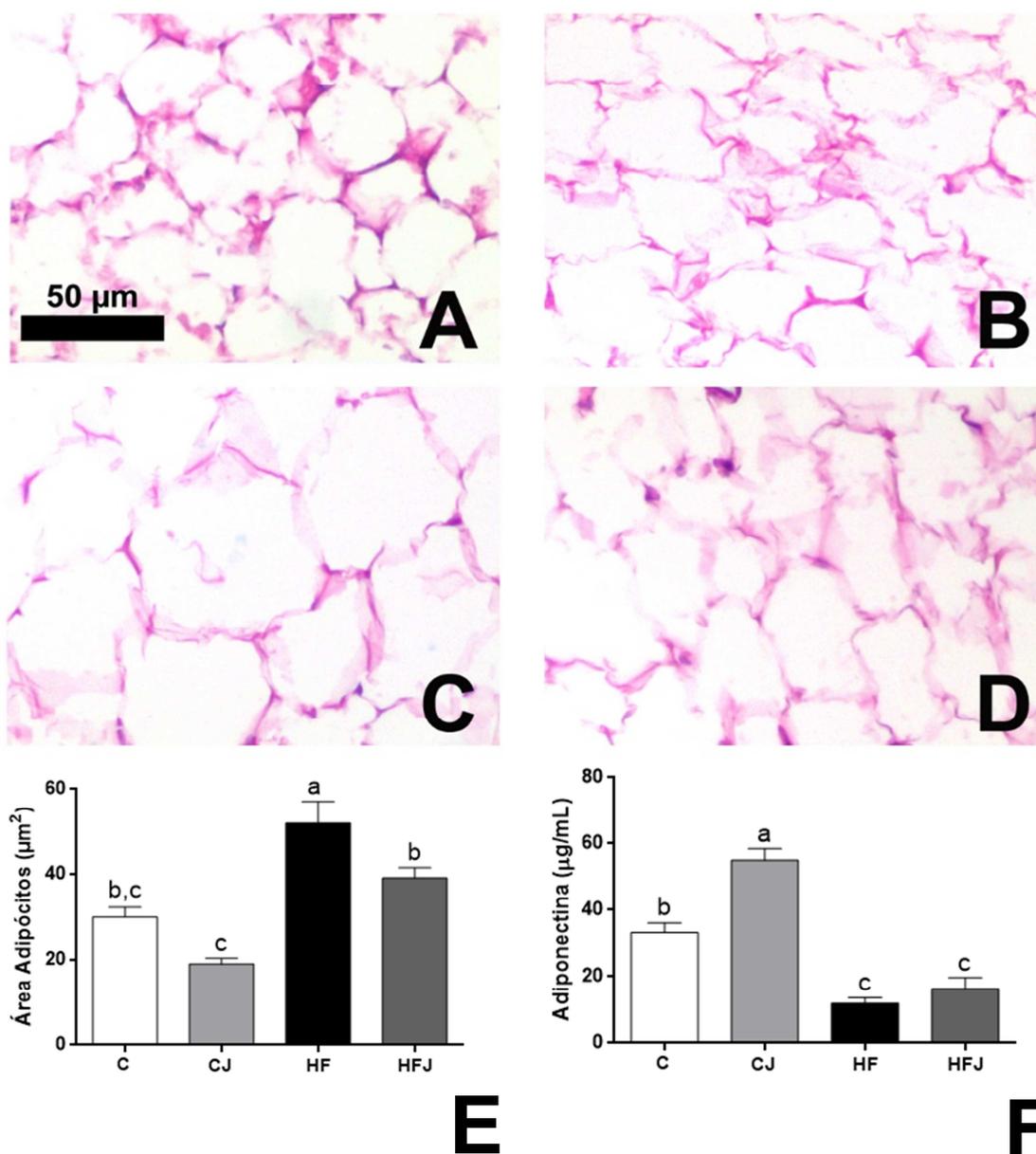


Figura 14. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo abdominal de ratos pertencentes aos grupos Controle (A); Controle jaboticaba (B); Hiperlipídico (C); Hiperlipídico jaboticaba (D) coradas com H&E em aumento de 400x. Barra de escala = 50 μm . Gráfico correspondente à análise da área dos adipócitos dos respectivos grupos experimentais (E) e níveis séricos de adiponectina (F). Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes.

5.10. Expressão do mRNA de Genes Envolvidos na Biossíntese, Captação, Oxidação e Excreção de Lipídios

Diante dos resultados encontrados, nosso próximo objetivo foi avaliar alguns genes envolvidos na biossíntese, captação, oxidação e excreção de lipídios para verificar o efeito da dieta hiperlipídica e do tratamento com a casca de jabuticaba sobre a expressão gênica dos mesmos.

5.10.1. Efeito da casca de jabuticaba na expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol no fígado

A figura 15 mostra os resultados encontrados com relação aos genes envolvidos no metabolismo de colesterol. Primeiramente, foi observado uma redução significativa na expressão gênica do receptor de LDL (LDL-R) e da apolipoproteína B100 (ApoB100) nos grupos HF quando comparado ao grupo C, genes envolvidos na captação do colesterol sérico, e houve uma redução ainda mais expressiva de ApoB100 no grupo HFJ ($p < 0,0001$). Quanto aos genes envolvidos na síntese de colesterol, os resultados para a proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-2 (SREBP-2) e 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGCR) mostraram uma menor expressão desses genes no grupo HFJ quando comparado ao grupo C, mas não observou-se diferença estatística significativa quando comparado ao grupo HF. Já o tratamento com a casca de jabuticaba reduziu a expressão gênica da enzima colesterol aciltransferase-1 (ACAT-1) nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, ficando estatisticamente semelhante ao grupo controle. Com relação aos genes envolvidos na síntese de ácidos biliares, observou-se um aumento na expressão do gene da enzima colesterol-7 α -hidroxilase (CYP7A1) no grupo HF, e a suplementação com 4% de FCJ manteve os níveis de mRNA dos genes CYP7A1 e do receptor X do fígado (LXR- α) semelhantes aos níveis encontrados no grupo controle. Por fim, a análise da expressão do gene *ATP-binding cassette subfamily G member 5* (ABCG5), envolvido no transporte hepático do colesterol para a bile, mostrou um aumento significativo no grupo HF, o que não foi observado no grupo HFJ.

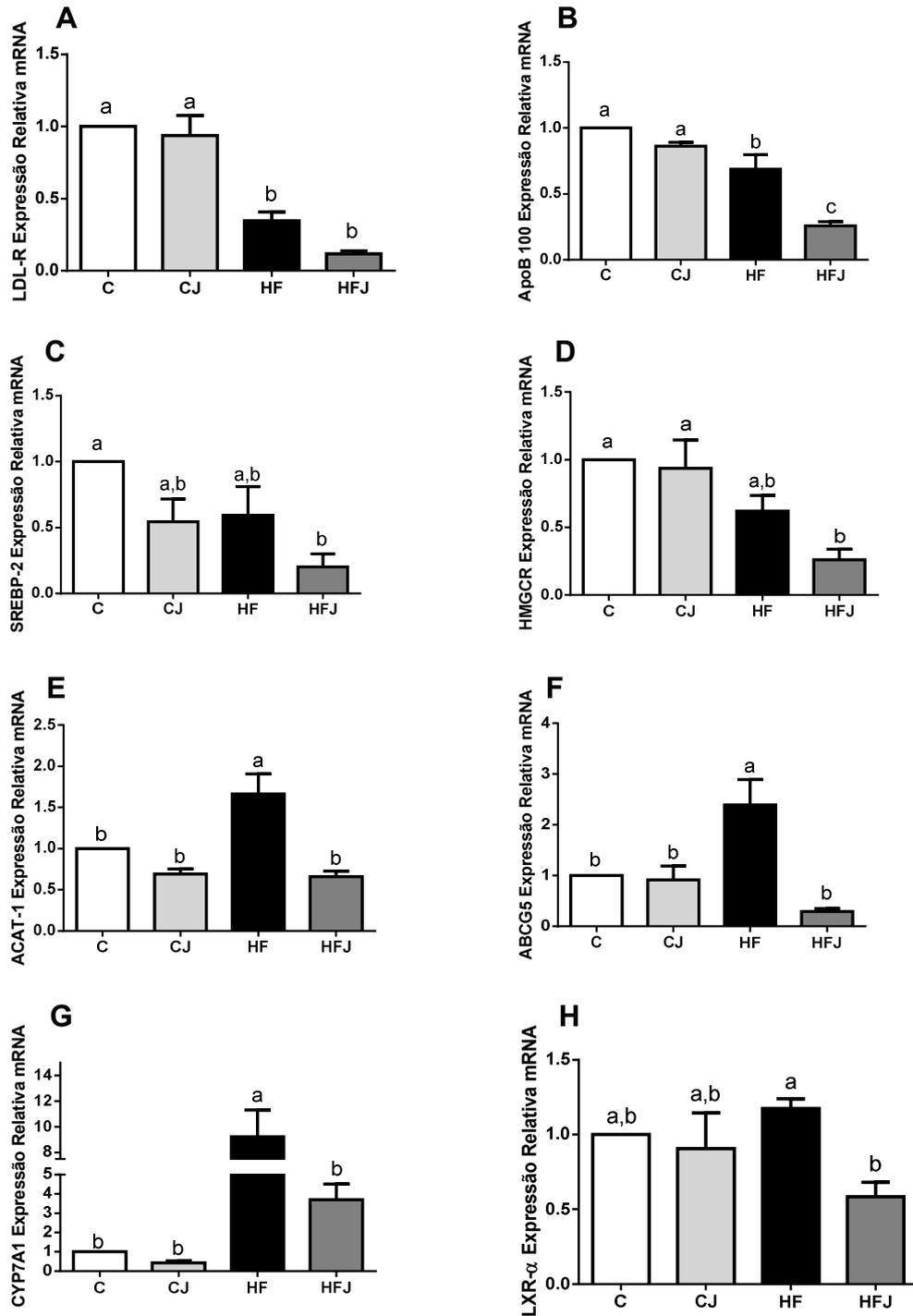


Figura 15. Expressão do mRNA de genes envolvidos no metabolismo do colesterol no fígado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

5.10.2. Efeito da casca de jabuticaba na expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos no fígado

Devido à atenuação na gravidade da esteatose hepática macrovesicular e à redução na área dos adipócitos no tecido adiposo abdominal, nosso próximo objetivo foi investigar a expressão do mRNA de genes envolvidos no lipogênese e/ou oxidação de ácidos graxos (Figura 16). Primeiramente, não observou-se diferença estatisticamente significativa com relação a expressão gênica das enzimas acetil Co-A carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) entre os grupos experimentais. Por outro lado, encontrou-se uma redução significativa na expressão gênica do receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR α) nos animais hiperlipídicos tratados com a FCJ quando com parado ao grupo HF, assim como foi observado para a expressão do gene da enzima acil-CoA oxidase 1 (ACOX-1) ($p = 0,0180$ e $p < 0,0001$).

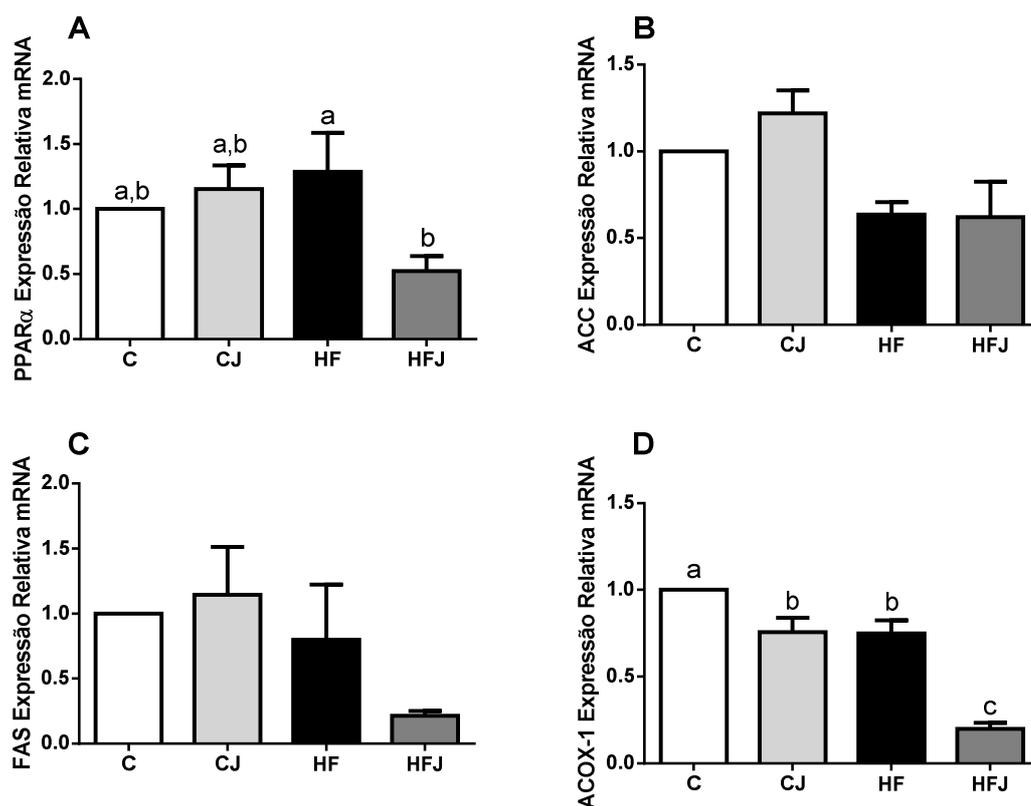


Figura 16. Expressão do mRNA de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos no fígado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way

ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

5.11. Biomarcadores do Estresse Oxidativo e Defesa Antioxidante no Fígado

No presente estudo, o estresse oxidativo foi avaliado através das análises de oxidação às biomoléculas lipídios e proteínas, além da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). Também analisou-se o sistema glutaciona através da concentração de glutaciona total, oxidada (GSSG) e reduzida (GSH).

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA). Os resultados encontrados revelaram que houve um aumento no grupo HF quando comparado com o grupo C, e os animais que receberam dieta hiperlipídica suplementada com FCJ apresentaram valores intermediários desse biomarcador (Figura 17A). Um método muito utilizado para determinar oxidação proteica baseia-se na reação dos grupos carbonilados com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Com relação a essa análise não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 17B).

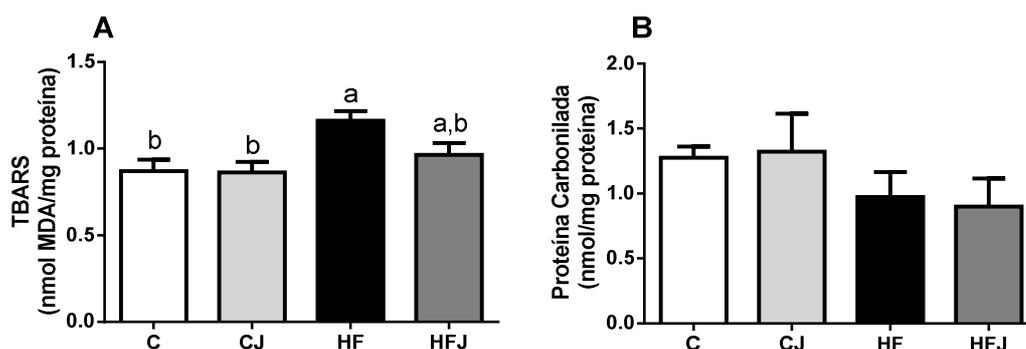


Figura 17. Níveis de TBARS (A) e proteína carbonilada (B) no fígado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

Como já foi descrito anteriormente, o sistema de defesa antioxidante enzimático inclui as enzimas SOD, CAT e GPx. Com relação à enzima CAT observou-se um aumento da sua atividade no grupo HF quando comparado ao grupo controle, sendo que o grupo hiperlipídico tratado com a FCJ apresentou ($p = 0,0006$) níveis significativamente reduzidos para essa enzima quando comparado ao grupo HF (Figura 18A). Já a análise da atividade da SOD revelou um aumento em ambos os grupos hiperlipídicos comparado ao grupo controle (Figura 18B).

A ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, por meio do controle da relação entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). No presente trabalho não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos com relação à atividade da GPx (Figura 18C). Porém, a avaliação da atividade da enzima glutatona redutase (GR) revelou um aumento nos grupos hiperlipídicos tratados ou não com a FCJ (Figura 18D).

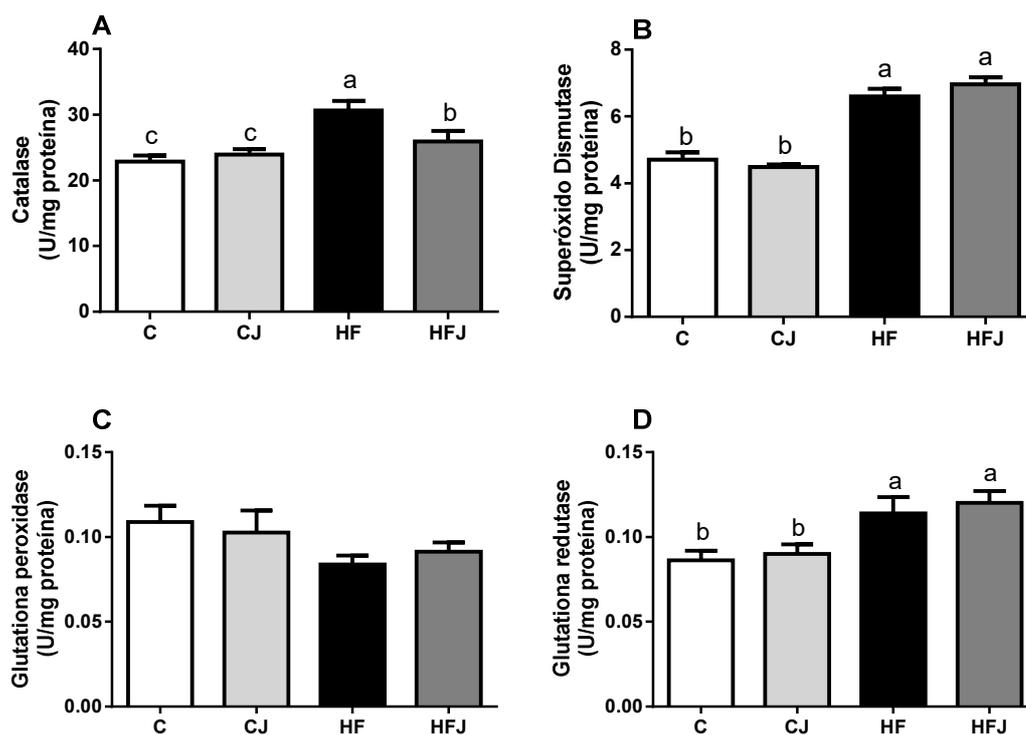


Figura 18. Atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutathione peroxidase (GPx) (C) e glutathione reductase (GR) (D) no fígado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

A Glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante. No presente estudo foram determinados os níveis de glutathiona total e de GSSG e, posteriormente por diferença, calculou-se os níveis de GSH (Figura 19). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de glutathiona total, oxidada e reduzida entre os grupos experimentais. Porém, a análise da relação entre os níveis de GSH/GSSG revelou um aumento significativo no grupo CJ quando comparado ao grupo controle e ambos os grupos hiperlipídicos apresentaram valores intermediários.

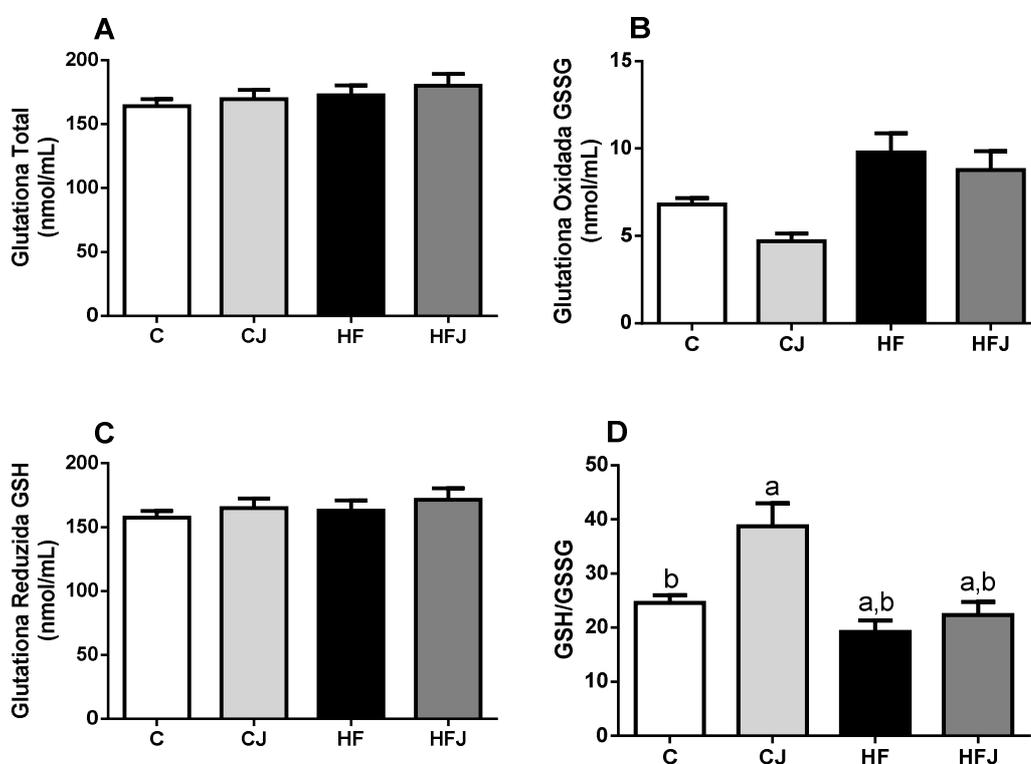


Figura 19. Níveis de glutathiona total (A), glutathiona oxidada (GSSG) (B) e glutathiona reduzida (GSH) (C), e a relação entre GSH total/GSSG (D) no fígado de ratos alimentados com dieta controle e rica em lipídios, tratados com farinha da casca de jabuticaba. Os dados são apresentados como média \pm EP (One-way ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: controle; CJ: controle jabuticaba; HF: hiperlipídico; HFJ: hiperlipídico jabuticaba.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se o efeito da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), uma fruta da flora brasileira fonte de compostos fenólicos e fibras dietéticas, na progressão da NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em ratos. A suplementação da dieta hiperlipídica com 4% de FCJ foi eficiente em alterar positivamente vários fatores envolvidos no desenvolvimento da NAFLD, uma vez que a sua ingestão foi associada, principalmente, com melhora do perfil lipídico sérico e da função hepática, redução da esteatose macrovesicular no fígado, redução da área dos adipócitos no tecido adiposo abdominal, e aumento da excreção fecal lipídica.

Diversos estudos têm demonstrado uma relação entre dieta e doenças crônicas e, nesse contexto, os alimentos contendo compostos capazes de promoverem benefícios à saúde encontram-se em destaque. A casca de jabuticaba contém compostos fenólicos, predominantemente flavonoides e antocianinas, que têm sido considerados como compostos bioativos (LIMA, A. D. J. B. et al., 2008; FALLER; FIALHO, 2009; CIPRIANO, 2011; LEITE et al., 2011; ALEZANDRO et al., 2013). Assim como relatado na literatura, a análise fitoquímica da FCJ revelou uma quantidade significativa de fenólicos totais e antocianinas, o que provavelmente contribuiu para sua alta capacidade antioxidante *in vitro* evidenciado pelo método DPPH ($797,73 \pm 8.02 \mu\text{M TEAC/g}$). Porém, pôde-se perceber uma variação entre os estudos quanto ao conteúdo desses compostos nas diferentes farinhas da casca de jabuticaba avaliadas, variando de 3,2 à 55,6 g EAG/100g com relação à concentração de compostos fenólicos totais e de 0,5 à 1,7 g C3G/100g com relação à concentração de antocianinas (LIMA, A. D. J. B. et al., 2008; LIMA, A. D. J. B. et al., 2011a; LEITE-LEGATTI et al., 2012; ZURITA; DÍAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO, 2012; ARAÚJO, C. R. et al., 2014; BATISTA et al., 2014; BATISTA et al., 2017; NERI-NUMA et al., 2017; LAMAS et al., 2018). Essas variações podem ser explicadas, em parte, pelos diferentes métodos de secagem, extração e quantificação dos compostos fenólicos nas cascas. As antocianinas, por exemplo, são compostos pouco estáveis e os principais fatores que influenciam a sua estabilidade são a estrutura química, o pH, a temperatura, a luz e a presença de oxigênio (LOPES, T. et al., 2007).

O presente estudo também analisou o teor de fenólicos extraíveis e não extraíveis na casca de jabuticaba, e os resultados mostraram uma maior concentração da fração extraível (83%). A maioria dos estudos que analisam os compostos fenólicos em

alimentos utiliza somente o sobrenadante aquoso resultante da extração com diferentes combinações de água e solventes orgânicos para verificar a sua concentração total, que corresponde à fração fenólica extraível. No entanto, quantidades significativas de compostos fenólicos permanecem nos resíduos sólidos após tais extrações (fenólicos não-extraíveis - NE) (ARRANZ; SILVÁN; SAURA-CALIXTO, 2010; PÉREZ-JIMÉNEZ; TORRES, 2011). Na FCJ observou-se que os NE representaram 17% do teor total dos compostos fenólicos, sendo, por exemplo, similar aos encontrados na cereja preta (*Prunus avium*), uma fruta que também contém altos teores de flavonoides e antocianinas (NORATTO et al., 2018). Os polifenóis não extraíveis, principalmente as proantocianidinas, os ácidos fenólicos e os taninos hidrolisáveis, são geralmente mais estáveis durante o processamento e armazenamento. Portanto, eles podem escapar da digestão gastrointestinal superior, sofrer fermentação pela microflora intestinal, atingir a corrente sanguínea e, então, promover benefícios à saúde (PÉREZ-JIMÉNEZ; TORRES, 2011).

Ainda com relação à composição química da casca de jabuticaba, a FCJ revelou perfil semelhante ao encontrado por Marques et al. (2012) e Lage et al. (2014): carboidratos > fibra dietética > umidade > proteína > cinzas > lipídios. No entanto, a concentração de fibra dietética na FCJ foi maior que o encontrado por MARQUES et al. (2012) e menor que LAGE (2014). Estas diferenças são provavelmente inerentes à colheita, uma vez que as concentrações de nutrientes são influenciadas por diversos fatores, incluindo fatores genéticos, variedade de espécies, maturação, fatores pré-colheita, temperatura, intensidade luminosa, condições pós-colheita. As fibras dietéticas presentes em quantidades significativas na maioria das frutas, como evidenciado na FCJ, são associadas com melhora no metabolismo do colesterol e na saúde intestinal (LATTIMER; HAUB, 2010; MATZIOURIDOU et al., 2016). Além disso, a FCJ não apresentou efeito citotóxico em células HepG2 em todas as concentrações avaliadas (10 a 800 µg/mL).

Diante dos resultados encontrados na FCJ com relação à sua composição fitoquímica e nutricional, e sabendo que a presença de compostos bioativos nos alimentos, tais como fibras e antocianinas, estão relacionados com a prevenção de doenças crônicas, o presente estudo propôs investigar o efeito da FCJ (*Myrciaria cauliflora*) sobre as principais vias metabólicas envolvidas na patogênese da NAFLD induzida por dieta hiperlipídica, rica em gordura saturada e colesterol, em ratos.

Inicialmente, observou-se uma ingestão alimentar média de 11,2 g/dia nos grupos C e CJ e de 9,33 g/dia nos grupos HF e HFJ, demonstrando uma redução significativa nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica. Esse comportamento é comum em ratos, nos quais a ingestão alimentar é ajustada ao requerimento energético, ou seja, proporcional à densidade energética da dieta, e dietas com alto teor de lipídios tornam-se altamente mais energéticas (SHARP; VILLANO, 2012). Considerando a ingestão diária da FCJ nos grupos HF e HFJ (~ 0,37 g FCJ/dia/animal), esta contribuiu com uma ingestão diária de compostos fenólicos totais (~ 54 mg/dia/animal) e antocianinas (~ 3 mg/dia/animal), além das fibras dietéticas (~ 120 mg/dia). Além disso, extrapolando a dose utilizada no presente estudo para indivíduos saudáveis, em uma dieta de 2000 kcal/dia, a ingestão de 4% da FCJ equivaleria à ingestão de 2,5 colheres de sopa cheia da farinha por dia, o que em termos calóricos equivale a 80 kcal/dia, representando uma quantidade que pode ser facilmente consumida na dieta.

A principal característica histológica da NAFLD é a esteatose que consiste no acúmulo de TG nos hepatócitos. Em geral, dietas ricas em gorduras saturadas e colesterol são eficientes em promover o acúmulo de lipídios no fígado, uma vez que promovem alterações no metabolismo lipídico (aumento da lipogênese e redução da lipólise), culminando em esteatose hepática e inflamação do tecido (LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013; SAVARD et al., 2013). De fato, a dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo foi eficiente em promover a NAFLD nos ratos, uma vez que foi observado o quadro de hepatomegalia; aumento das atividades das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina, bem como pela presença de esteatose hepática, evidenciada por gotículas de gordura micro e macrovesiculares. Além disso, a dieta hiperlipídica aumentou a massa corporal final, índice de Lee e ganho de massa nos animais dos grupos hiperlipídicos. Esses achados corroboram com GUERRA et al. (2015) que mostraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica contendo 32% de banha e 1% de colesterol desenvolveram NAFLD após 12 semanas e apresentaram alterações hepáticas, incluindo acúmulo de gordura no fígado e alteração na expressão dos genes envolvidos em lipogênese e oxidação de ácidos graxos.

Dietas hiperlipídicas também estão fortemente associadas com o aparecimento da resistência à insulina em diferentes modelos experimentais, e uma resposta insuficiente a esse hormônio é um dos principais fatores patogênicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da NAFLD (HARDY et al., 2016). No entanto, neste estudo a dieta hiperlipídica oferecida durante 8 semanas não alterou os parâmetros

glicêmicos dos animais, assim como não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais com relação aos níveis séricos de insulina. Provavelmente, o tempo de experimentação não foi suficiente para promover essas alterações. Em contraste com os nossos resultados, o estudo de DRAGANO et al. (2013) observaram que a ingestão de uma dieta hiperlipídica (31% banha de porco) por camundongos *Swiss* durante 10 semanas foi eficiente em promover resistência à insulina. E a suplementação com a 1, 2 e 4% da farinha liofilizada da casca de jabuticaba promoveu uma melhora na via de sinalização da insulina no fígado e no tecido adiposo.

Estudos têm demonstrado que o metabolismo das lipoproteínas também encontra-se modificado na NAFLD. A concentração anormal de lipoproteínas no plasma reflete distúrbios na homeostase dos principais componentes lipídicos das lipoproteínas: TG, colesterol e ésteres de colesterol (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; FON TACER; ROZMAN, 2011). Em nosso modelo, a dieta hiperlipídica promoveu aumento do CT e do colesterol não-HDL, e reduziu o HDL-c, indicando um padrão de dislipidemia aterogênica que é frequentemente observado em pacientes com a doença (COHEN, D. E.; FISHER, 2013; COREY; CHALASANI, 2014). Assim, nossos dados suportam a ideia de que uma dieta rica em gorduras saturadas e colesterol é eficiente em desenvolver a doença NAFLD e suas complicações metabólicas.

Já com relação ao tratamento com 4% da FCJ os resultados mostraram primeiramente que, apesar de não termos observado uma alteração nos parâmetros glicêmicos, houve uma atenuação do dano hepático e a FCJ melhorou o perfil lipídico sérico, pois sua adição à dieta hiperlipídica reduziu significativamente a atividade da enzima AST e os níveis séricos de CT e colesterol não-HDL, assim como atenuou a gravidade da esteatose hepática. Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico da casca de jabuticaba sobre o perfil lipídico sérico e sobre o fígado em diferentes modelos experimentais utilizando diferentes dietas hiperlipídicas (ARAÚJO, C. R. et al., 2014; LAGE, 2014; BATISTA et al., 2018; LAMAS et al., 2018), mostrando que a casca de jabuticaba possui potencial para atenuar a NAFLD, porém os mecanismos moleculares pelos quais ela exerce esses efeitos ainda não foram totalmente esclarecidos.

Primeiramente, podemos supor um possível mecanismo direto pelo qual a farinha promoveu a redução nos níveis séricos de colesterol total e este consiste no efeito da fibra solúvel viscosa, como a pectina encontrada na casca de jabuticaba, sobre o

metabolismo do colesterol, conforme também sugerido por BATISTA et al. (2018). Até o momento, tem sido proposto que as fibras viscosas podem reduzir o tempo de trânsito através do intestino delgado, promovendo um efeito laxativo e aumentando o peso das fezes, o que prejudica a absorção do colesterol dietético e previne a reabsorção dos ácidos biliares. Além disso, a fibra solúvel pode estimular a fermentação bacteriana no cólon, resultando na produção de SCFAs, que por sua vez podem modular o metabolismo do colesterol (BROWN, L. et al., 1999; DIKEMAN; FAHEY JR, 2006; HO et al., 2017). De fato, a adição de 4% de FCJ promoveu um aumento no volume fecal excretado pelos ratos alimentados com ambas às dietas (padrão e alto teor de gordura). Além disso, os ratos que receberam dieta hiperlipídica suplementada com FCJ apresentaram maior excreção de lipídios totais nas fezes, indicando um possível efeito benéfico das fibras solúveis presentes na casca de jaboticaba na absorção de lipídios intestinais. Esses achados corroboram com BATISTA et al. (2018) que mostraram que o consumo de casca de *Myrciaria jaboticaba*, rica em fibras dietéticas como a pectina, por camundongos *Swiss* alimentados com uma dieta rica em gordura (31% de banha e 4% de óleo), induziu maior produção de SCFAs, além de ter melhorado a produção de acetato e butirato no intestino grosso, promovendo efeitos benéficos para a saúde do intestino. Porém, no presente estudo não observou-se um aumento significativo dos níveis de CT nas fezes dos ratos do grupo HFJ quando comparado ao grupo HF, resultado este que pode ter sido subestimado pelo método de extração de lipídios utilizado (método de FOLCH et al, 1957).

O consumo de dietas hiperlipídicas, especialmente quando fortemente enriquecidas em ácidos graxos saturados, tem sido associado com alterações no perfil da microbiota intestinal e fisiologia do intestino delgado antes e após o início da obesidade. E a ingestão de prebióticos, probióticos e polifenóis tem mostrado reverter esse fenótipo induzido pela dieta rica em lipídios (ROOPCHAND et al., 2015; ARAÚJO, J. R. et al., 2017). De fato, no presente estudo os animais do grupo HF apresentaram um aumento significativo do peso relativo do intestino delgado, indicando uma possível alteração fisiológica neste órgão, o qual foi revertido quando os animais hiperlipídicos foram tratados com a FCJ. Porém, mais análises devem ser realizadas para avaliar o impacto dessas alterações sobre a integridade do intestino delgado; perfil intestinal da microbiota; permeabilidade epitelial e inflamação, fatores nos quais estão associados com o desenvolvimento da obesidade e suas complicações metabólicas.

O tecido adiposo também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da NAFLD. Tem sido observado por técnicas utilizando isótopos marcados que, na presença da esteatose hepática, aproximadamente 60% dos TG hepáticos vêm do tecido adiposo, 25% da lipogênese *de novo* e 15% dos lipídios da dieta (DONNELLY et al., 2005). De fato, os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior acúmulo de gordura no tecido adiposo abdominal, e o tratamento com a casca de jaboticaba pode ter amenizado a esteatose hepática devido à redução desse acúmulo que, possivelmente, contribuiu para uma diminuição do influxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado. Estes resultados vão de encontro com BATISTA et al. (2018) que demonstraram uma preservação do tecido adiposo saudável em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com 4% da casca de *Myrciaria jaboticaba* e, também, observou uma redução na gravidade da esteatose hepática nesses animais.

Mudanças metabólicas durante o ganho de peso culminam na alteração da secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, como por exemplo, observa-se um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e uma redução na secreção de citocinas anti-inflamatórias (adiponectina), o que contribuirá para o desenvolvimento de esteatose hepática (MCCARTHY; RINELLA, 2012). No presente estudo, apesar de não termos encontrado diferença significativa no número de células inflamatórias na análise histológica do fígado, a dieta hiperlipídica induziu um aumento nos níveis hepáticos de TNF- α e uma redução nos níveis séricos de adiponectina, apoiando a ideia de que a obesidade induzida por dieta promove alterações na produção e secreção de citocinas que irão contribuir no aumento da inflamação crônica de baixo grau. Por outro lado, o tratamento com 4% FCJ promoveu uma discreta redução dos níveis hepáticos de TNF- α no grupo HFJ e promoveu um significativo aumento nos níveis séricos de adiponectina no grupo CJ, indicando uma possível melhora no perfil secretório dessas adipocinas quando os animais foram tratados com a casca de jaboticaba, o qual há longo prazo poderiam potencializar os seus efeitos benéficos. Alguns estudos têm demonstrado o papel da casca da jaboticaba sob a inflamação, reduzindo os níveis séricos e gênicos de TNF- α , IL-6 e IL- β (DRAGANO et al., 2013; BATISTA et al., 2018; LAMAS et al., 2018), mas ainda não foi investigado o seu efeito sobre citocinas anti-inflamatórias. Desse modo, essa foi à primeira vez em que foi examinado o efeito do consumo da casca de jaboticaba sobre os níveis séricos de adiponectina e o significativo aumento no grupo controle tratado com 4% FCJ sugere um possível efeito protetivo da mesma,

porém mais estudos são necessários para investigar prováveis razões pelas quais o efeito não foi observado no grupo HFJ.

Evidências crescentes têm mostrado uma associação entre a alteração na homeostase do colesterol e o acúmulo de colesterol livre nos hepatócitos na patogênese da NAFLD (BIEGHS et al., 2013; IOANNOU et al., 2013; SAVARD et al., 2013). Por outro lado diversos compostos bioativos podem modular mecanismos moleculares, como a lipogênese e a oxidação lipídica, reduzindo o acúmulo de gordura no fígado. Nesse sentido, nosso próximo passo foi avaliar possíveis vias metabólicas pelas quais o tratamento com casca de jabuticaba pode ter atenuado os níveis séricos de colesterol e a esteatose hepática.

Primeiramente, avaliamos a expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo do colesterol no fígado. A homeostase do colesterol é mantida por um conjunto de mecanismos onde a biossíntese, a captação e a excreção são reguladas rigorosamente. SREBP-2 pertence a uma família de fatores de transcrição chamadas proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBPs) que são responsáveis pela regulação tanto da síntese de colesterol quanto da síntese de AG. Esse fator de transcrição, especificamente, está relacionado com a regulação das concentrações séricas e intracelulares do colesterol, e um aumento na sua expressão está diretamente associado com o aumento de enzimas chave da biossíntese de colesterol, principalmente da enzima HMGCR. Um aumento intracelular de colesterol tende a inibir a sua própria produção endógena através da regulação do SREBP-2 que permanece firmemente ligado ao complexo proteico SCAP e INSIG no retículo endoplasmático, impedindo a transcrição de genes envolvidos na síntese e captação do colesterol no fígado (BROWN, A. J. et al., 2002; RAGHOW et al., 2008). Entre os genes envolvidos na síntese de colesterol, a ingestão de casca de jabuticaba reduziu significativamente a expressão gênica de SREBP-2 e HMGCR no grupo HFJ quando comparado ao grupo C, o qual poderia contribuir na redução intracelular de colesterol nesses animais. OU et al. (2011) observaram que o extrato de amora, fonte de polifenóis e antocianina, atenuou a expressão de SREBP-2 e HMGCR em células HepG2 em condições de sobrecarga de ácidos graxos, contribuindo para os efeitos hipolipidêmicos.

Curiosamente, o tratamento com casca de jabuticaba também diminuiu a expressão gênica da ApoB100, uma apolipoproteína encontrada em lipoproteínas originárias do fígado (por exemplo, VLDL e LDL) que se ligam ao LDL-R, promovendo a captação de

colesterol. Sabe-se que a captação de LDL-c via LDL-R promove uma inibição da enzima HMGCR via inibição da ativação do fator de transcrição SREBP-2 (GOLDSTEIN; BROWN, 2009), e que alimentos com atividade funcional são geralmente ativadores de LDL-R, removendo LDL-c do plasma (CHEN; JIAO; MA, 2008). Entretanto, no presente estudo observou-se uma redução significativa na expressão do gene LDL-R em ambos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo controle, indicando uma possível concentração elevada de colesterol intracelular. DE SOUZA et al. (2012) observaram que o consumo de polpa de açaí por ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica (25% de óleo de soja e 1% de colesterol) promoveu redução do colesterol total e LDL-c pelo aumento na expressão de LDL-R, além de ter aumentado a expressão gênica dos transportadores ABCG5 e ABCG8.

Outra possível via relacionada à manutenção da homeostase do colesterol é a eliminação do excesso de colesterol através da conversão do colesterol em ácidos biliares no fígado. A oxidação do colesterol pela CYP7A1, uma enzima limitante da taxa de síntese do ácido biliar, é a principal via metabólica pela qual o colesterol é eliminado do corpo. Essa via é regulada, principalmente, por um receptor nuclear chamado receptor X do fígado α (LXR α) que responde a níveis elevados de colesterol intracelular, aumentando a transcrição de genes que controlam o efluxo de colesterol, como por exemplo, de CYP7A1 e dos transportadores ABCG5 e ABCG8 que desempenham um papel significativo na excreção direta do colesterol através da bile (RUSSELL; SETCHELL, 1992; YU et al., 2002; LUND et al., 2006).

No presente estudo, ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior expressão de CYP7A1 e ABCG5, enquanto a casca de jaboticaba restaurou a expressão desses genes para os níveis observados nos ratos alimentados com dieta controle, assim como foi observado para a expressão gênica de LXR α . Estudos apontam que os flavonoides podem regular a síntese *de novo* de lipídios através da modulação do receptor nuclear LXR α , e sua inibição por polifenóis via ativação de AMPK tem sido mostrado como um fator de proteção contra NAFLD (SERVIDDIO; BELLANTI; VENDEMIALE, 2013; VAN DE WIER et al., 2015; DONGIOVANNI et al., 2016). Ainda, de acordo com NORATTO et al. (2018), que avaliaram o efeito de uma farinha da cereja depletada em antocianinas em camundongos db/db, sugeriram que a redução dos lipídios hepáticos foi associado com a modulação negativa do gene LXR α , assim como modulou a expressão de mRNA dos genes PPAR α/γ mRNA no fígado. Por outro

lado alguns estudos têm demonstrado que fontes alimentares de fibra dietética e polifenóis podem reduzir o colesterol sérico por regulação positiva desses genes em modelos de NAFLD aumentando, assim, a sua excreção via ácidos biliares (DE SOUZA et al., 2012; PARK, Y. et al., 2014; DE MIRANDA et al., 2017). Portanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar a relevância desses achados, uma vez que a modulação desses genes no fígado merece ser investigada nos níveis de expressão proteica, considerando que a maior parte da atividade da proteína eucariota pode ser modulada por modificações pós-traducionais.

Por outro lado, a ingestão da casca de jaboticaba *down* regulou a expressão de mRNA do gene ACAT-1 para níveis semelhantes ao controle, sugerindo que a FCJ pode ter inibido a sua atividade nos ratos que receberam a dieta hiperlipídica. Essa enzima catalisa a esterificação intracelular do colesterol a partir do colesterol livre e de ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, ela auxilia na absorção de colesterol dietético no intestino; na produção de VLDL no fígado, bem como na formação das células espumosas, que desempenham um papel aterogênico importante (ANDERSON, R. A. et al., 1998; VAZIRI; LIANG, 2004). Nesse sentido, ela é considerada um alvo terapêutico promissor para reduzir, principalmente, a aterosclerose e a doença cardiovascular, uma vez que inibindo a sua atividade espera-se não apenas uma diminuição dos níveis séricos de colesterol, mas também um efeito direto na parede arterial (OHSHIRO; TOMODA, 2015). PARK, Y. et al. (2014) também observaram que o arroz vermelho, rico em polifenóis assim como a FCJ, reduziu a expressão de ACAT-2 em camundongos alimentados com uma dieta rica em colesterol.

A patogênese da NAFLD envolve, principalmente, alterações no metabolismo de ácidos graxos e TG no fígado. Mudanças no balanço entre as vias de síntese *de novo*, degradação de lipídios e na secreção de lipoproteínas (VLDL) pelo fígado contribuem para o acúmulo intracelular de ácidos graxos e seus metabólitos. O fator de transcrição PPAR α é um regulador mestre da oxidação de ácidos graxos que, por sua vez, aumenta a expressão dos genes para enzimas que promovem a β -oxidação, como por exemplo, CPT-1 α e ACOX-1, e reduz a biossíntese lipídica, evitando o acúmulo de TG no fígado. No presente estudo não observou-se alteração na expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos FAS e ACC. Porém, interessantemente houve uma modulação negativa nos genes envolvidos na oxidação (PPAR α e ACOX-1) nos ratos hiperlipídicos tratados com a FCJ, indicando uma possível redução na oxidação dos ácidos graxos nesses animais. Esses resultados corroboram com o estudo de

BATISTA et al. (2018) que encontraram uma menor expressão de PPAR α nos camundongos hiperlipídicos tratado com 4% da farinha liofilizada da casca de jabuticaba, indicando menor oxidação de ácidos graxos e metabólitos lipotóxicos para o fígado. Já o estudo de HUANG (2017) mostrou que o tratamento com diferentes concentrações de um extrato aquoso da *Myrciaria cauliflora* (0,5; 1; 1,5%) aumentou a expressão proteica de PPAR α e CPT-1 em ratos que receberam uma dieta hiperlipídica. Portanto, as diferenças encontradas entre os estudos podem ser explicadas pelos diferentes métodos de administração da casca de jabuticaba (farinha da casca adicionada à dieta e extrato aquoso da casca) e pelos diferentes modelos experimentais (diferentes animais e dietas hiperlipídicas), o que dificulta a comparação dos resultados. Além disso, a oxidação de ácidos graxos, por um lado, pode culminar numa redução do acúmulo de TG no hepatócitos e, conseqüentemente, reduzir a esteatose hepática. Entretanto, uma oxidação descontrolada pode causar um aumento na produção de ERO via β -oxidação, resultando em alterações no estado redox e contribuindo para a progressão da NAFLD.

Dentre os fatores envolvidos nos múltiplos *hits* da patogênese da NAFLD, o estresse oxidativo desempenha um papel central e está associado com a severidade da doença (GAMBINO; MUSSO; CASSADER, 2011). De fato, no presente estudo observou-se uma alteração do sistema redox nos ratos hiperlipídicos, evidenciado pelo aumento de TBARS, um dos biomarcadores mais utilizados para avaliar a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas. Maiores concentrações dos produtos da peroxidação de lipídios são encontrados em pacientes com NAFLD do que em pacientes normais, e estes contribuem para a progressão da doença (MADAN et al., 2006).

O estresse oxidativo ativa uma resposta específica que inclui aumento da expressão de moléculas antioxidantes endógenas. A transcrição da maioria dos genes antioxidantes é regulada através do fator nuclear de transcrição (*transcription factor nuclear factor-E2-related factor* - Nrf2), e um aumento de ERO ativa Nrf2 induzindo a transcrição gênica de SOD, CAT e GPx (NGUYEN et al., 2003). Essas enzimas agem sinergicamente para remover o excesso de ERO: a enzima SOD converte ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode ser rapidamente removido pela ação da enzima CAT ou pela GPx, enzimas que agem com o mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de H_2O_2 . No presente estudo observou-se um

aumento significativo na atividade das enzimas SOD e CAT nos ratos hiperlipídicos quando comparado com ratos do grupo controle, corroborando com DE SOUZA et al. (2010) e LOPES et al. (2018) que também encontraram atividade aumentada da enzima SOD nos grupos hipercolesterolêmicos. Esse resultado pode sugerir uma possível resposta adaptativa do organismo em neutralizar o aumento das ERO (O_2^- e H_2O_2) através da ativação do sistema antioxidante endógeno. E a ingestão da FCJ pelos ratos do grupo HFJ restaurou a atividade da enzima CAT para níveis mais próximos aos observados nos ratos do grupo controle, indicando que uma possível redução do estresse oxidativo, neste caso especificamente uma redução de H_2O_2 , diminuiu a necessidade para respostas protetoras.

Além disso, a CAT é uma enzima que está presente nos peroxissomos atuando na neutralização do H_2O_2 . Dessa forma, uma desregulação da sua atividade pode promover uma toxicidade peroxissomal devido ao excesso de H_2O_2 , que por sua vez pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como a NAFLD e NASH (SHEIKH et al., 1998; VIDELA et al., 2004). No presente estudo, observou-se que tanto a atividade da enzima CAT quanto a expressão gênica da ACOX-1, enzima envolvida na β -oxidação peroxissomal, foram reduzidas no grupo hiperlipídico tratado com a FCJ, sugerindo uma possível redução da β -oxidação peroxissomal nestes animais e, consequentemente, uma menor produção de H_2O_2 .

GSH é sintetizado endogenamente no fígado e é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. Em condições normais, os níveis celulares de GSH são altamente elevados, indicando que o mecanismo de detoxificação via glutathiona pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Desse modo, o sistema glutathiona desempenha um papel protetor contra o estresse oxidativo, pois a oxidação de GSH a GSSG é realizada pela ação da enzima antioxidante GPx. Já a regeneração da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manutenção da integridade do sistema de proteção celular, uma vez que impede a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (HALLIWELL, 1999; LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA; PEREIRA-WILSON, 2006). Neste estudo, não encontramos alterações nos níveis hepáticos de glutathiona total, GSH e GSSG, mas as concentrações de GSH foram bem maiores quando comparado com os níveis de GSSG, caracterizando as condições normais desse sistema em células saudáveis. Por outro lado, observou-se um aumento na atividade da enzima GR nos ratos dos grupos HF e HFJ, indicando um aumento na regeneração da GSH nesses animais. Além disso, a razão

GSH/GSSG mostrou um aumento no grupo controle tratado com a FCJ, sugerindo um efeito protetor, uma vez que um aumento na relação GSSG para GSH é considerado indicativo de estresse oxidativo.

Sabe-se que compostos bioativos presente nos alimentos, tais como polifenóis e vitaminas, são potentes antioxidantes de origem dietética. Com relação à casca de jabuticaba, alguns estudos vêm demonstrando o seu papel como antioxidante em diferentes modelos experimentais, confirmando *in vivo* o seu efeito benéfico no combate do estresse oxidativo decorrente das alterações metabólicas provocadas pela ingestão de dietas hiperlipídicas (BATISTA et al., 2014; LAGE et al., 2015).

Portanto, esses dados juntamente com os demais discutidos anteriormente, reforçam a ideia de que a casca de jabuticaba pode atuar positivamente nas diferentes vias metabólicas envolvidos na patogênese da NAFLD: metabolismo lipídico, inflamação e estresse oxidativo. Porém, o presente estudo não indica a modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo do colesterol como um mecanismo pelo qual a farinha promoveu a redução nos níveis séricos de colesterol total. Assim, podemos supor que a FCJ, devido aos seus altos teores de fibras dietéticas, promoveu uma redução na absorção de lipídios totais no trato gastrointestinal, no qual foi de fato evidenciado nas fezes e, provavelmente, refletiu-se também em uma baixa absorção de colesterol. Entretanto, mais análises são necessárias para verificar se realmente as fibras presentes na casca de jabuticaba, principalmente as viscosas, prejudicaram a absorção do colesterol dietético, pois a análise utilizando o método de Folch, et al (1957) não foi sensível para identificar essa diferença no grupo hiperlipídico tratado com a FCJ.

Até o momento, este foi o primeiro estudo que investigou como o consumo da casca de jabuticaba pode modular genes envolvidos tanto no metabolismo dos AG quanto no metabolismo do colesterol no fígado de ratos NAFLD induzidos por dieta hiperlipídica. E sabendo que a microbiota intestinal tem ganhado destaque no meio científico com relação ao seu efeito benéfico em diversas doenças crônicas, mais estudos são necessários para elucidar o papel das fibras dietéticas, presentes em significativa quantidade na casca de jabuticaba, sobre a produção de SCFAs e sua relação com o metabolismo do colesterol na NAFLD.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que a FCJ utilizada no estudo, fonte de fibras dietéticas e compostos fenólicos, apresentou efeito hipocolesterolêmico e hepatoprotetor na doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos.

Os dados obtidos suportam a ideia de que uma menor absorção de lipídios no trato gastrointestinal, mediado pelas fibras presentes na casca da jabuticaba, pode ter sido responsável pela redução na circulação sérica de lipoproteínas envolvidas no transporte do colesterol.

Além disso, a ingestão da FCJ modulou vias envolvidas no metabolismo de colesterol e lipídios, e atenuou a inflamação e o estresse oxidativo no fígado. Em conjunto, todos esses fatores podem ter contribuído para amenizar a esteatose hepática.

Vale ressaltar que diante do fato de que, até o momento, não existem medicamentos específicos para o tratamento da esteatose hepática, o consumo da FCJ representa uma estratégia dietética viável e segura para a prevenção e tratamento de doenças crônicas do fígado.

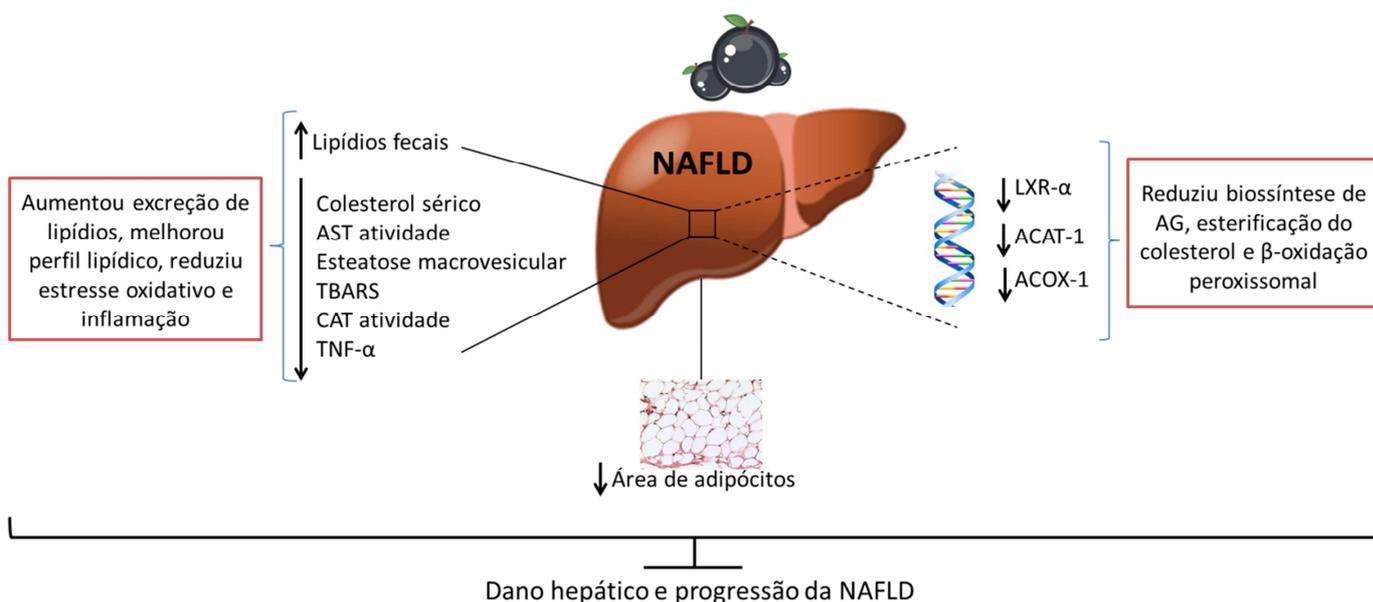


Figura 20. Resumo dos principais resultados encontrados, no presente estudo, que possivelmente contribuíram para o efeito hepatoprotetor da casca de jabuticaba na NAFLD.

8. REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, 2012.

ABREU, I. C. M. E. D.; GUERRA, J. F. D. C.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; LIMA, W. G. D.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 3, p. 251-259, 2014.

ADAMS, L. A.; TALWALKAR, J. A. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n., p. S34-S38, 2006.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1984. v.105, p.121-126.

AL SHARIF, M.; ALOV, P.; VITCHEVA, V.; PAJEVA, I.; TSAKOVSKA, I. Modes-of-action related to repeated dose toxicity: Tissue-specific biological roles of PPAR γ ligand-dependent dysregulation in nonalcoholic fatty liver disease. **PPAR research**, v. 2014, n., p., 2014.

ALEZANDRO, M. R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 468-477, 2013.

ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 650-659, 2013.

ALVES, A. P. C.; CORRÊA, A. D.; ALVES, D. S.; SACZK, A. A.; LINO, J. B.; CARVALHO, G. A. Toxicity of the phenolic extract from jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) fruit skins on *Spodoptera frugiperda*. **Chilean journal of agricultural research**, v. 74, n. 2, p. 200-204, 2014.

ANDERSON, N.; BORLAK, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 3, p. 311-357, 2008.

ANDERSON, R. A.; JOYCE, C.; DAVIS, M.; REAGAN, J. W.; CLARK, M.; SHELNESS, G. S.; RUDEL, L. L. Identification of a form of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26747-26754, 1998.

ARAÚJO, C. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A.; BATISTA, Â. G. Myrciaria cauliflora peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 2, p. 262-267, 2014.

ARAÚJO, J. R.; TOMAS, J.; BRENNER, C.; SANSONETTI, P. J. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. **Biochimie**, v. 141, n., p. 97-106, 2017.

ARGO, C. K.; CALDWELL, S. H. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. **Clinics in liver disease**, v. 13, n. 4, p. 511-531, 2009.

ARGUELLO, G.; BALBOA, E.; ARRESE, M.; ZANLUNGO, S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 9, p. 1765-1778, 2015.

ARRANZ, S.; SILVÁN, J. M.; SAURA-CALIXTO, F. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 11, p. 1646-1658, 2010.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BACON, B. R.; FARAHVASH, M. J.; JANNEY, C. G.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology-Orlando**, v. 107, n. 4, p. 1103-1109, 1994.

BARROS, J. D. Â. D. C.; CAMPOS, R. D. M. M.; MOREIRA, A. V. B. Atividade antioxidante em vinhos de jabuticaba e de uva. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 35, n. 1, p., 2010.

BATISTA, A. G.; LENQUISTE, S. A.; MOLDENHAUER, C.; GODOY, J. T.; REIS, S. M. P. M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) peel improved triglycerides excretion and hepatic lipid peroxidation in high-fat-fed rats. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 5, p. 571-581, 2013.

BATISTA, A. G.; LENQUISTE, S. A.; CAZARIN, C. B. B.; DA SILVA, J. K.; LUIZ-FERREIRA, A.; BOGUSZ, S.; HANTAO, L. W.; DE SOUZA, R. N.; AUGUSTO, F.; PRADO, M. A. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n., p. 450-461, 2014.

BATISTA, A. G.; SOARES, E. S.; MENDONÇA, M. C.; DA SILVA, J. K.; DIONÍSIO, A. P.; SARTORI, C. R.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Jaboticaba berry peel intake prevents insulin-resistance-induced tau phosphorylation in mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 10, p. 1600952, 2017.

BATISTA, A. G.; DA SILVA-MAIA, J. K.; MENDONÇA, M. C. P.; SOARES, E. S.; LIMA, G. C.; JUNIOR, S. B.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; JÚNIOR, M. R. M. Jaboticaba berry peel intake increases short chain fatty acids production and prevent hepatic steatosis in mice fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 48, n., p. 266-274, 2018.

BAYARD, M.; HOLT, J.; BOROUGHS, E. Nonalcoholic fatty liver disease. **Am Fam Physician**, v. 73, n. 11, p. 1961-1968, 2006.

BELLENTANI, S.; BEDOGNI, G.; MIGLIOLI, L.; TIRIBELLI, C. The epidemiology of fatty liver. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

BIEGHS, V.; VERHEYEN, F.; VAN GORP, P. J.; HENDRIKX, T.; WOUTERS, K.; LÜTJOHANN, D.; GIJBELS, M. J.; FEBBRAIO, M.; BINDER, C. J.; HOFKER, M. H. Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in Kupffer cells. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34378, 2012a.

BIEGHS, V.; RENSEN, P. C.; HOFKER, M. H.; SHIRI-SVERDLOV, R. NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: central role for macrophages. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 2, p. 287-293, 2012b.

BIEGHS, V.; WALENBERGH, S. M.; HENDRIKX, T.; VAN GORP, P. J.; VERHEYEN, F.; OLDE DAMINK, S. W.; MASCLÉE, A. A.; KOEK, G. H.; HOFKER, M. H.; BINDER, C. J. Trapping of oxidized LDL in lysosomes of Kupffer cells is a trigger for hepatic inflammation. **Liver International**, v. 33, n. 7, p. 1056-1061, 2013.

BOURSIER, J.; MUELLER, O.; BARRET, M.; MACHADO, M.; FIZANNE, L.; ARAUJO-PEREZ, F.; GUY, C. D.; SEED, P. C.; RAWLS, J. F.; DAVID, L. A. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. **Hepatology**, v., n., p., 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nacional Complementar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília/DF**, v., n., p., 1998.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo, Patologia**: Guanabara Koogan, 2016
BROWN, A. J.; SUN, L.; FERAMISCO, J. D.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 237-245, 2002.

BROWN, L.; ROSNER, B.; WILLET, W. W.; SACKS, F. M. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 1, p. 30-42, 1999.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.

BRUN, P.; CASTAGLIUOLO, I.; DI LEO, V.; BUDA, A.; PINZANI, M.; PALÙ, G.; MARTINES, D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 2, p. G518-G525, 2007.

BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BACON, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467-2474, 1999.

BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. In: Seminars in liver disease, 2000, p. 3-16.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 42, p. 5286-5296, 2010.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, n., p. 302-310, 1978.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 183-190, 2005.

CAPANNI, M.; CALELLA, F.; BIAGINI, M.; GENISE, S.; RAIMONDI, L.; BEDOGNI, G.; SVEGLIATI-BARONI, G.; SOFI, F.; MILANI, S.; ABBATE, R. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 1143-1151, 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1985. v.113, p.484-490.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110, 2015.

CHALASANI, N.; GORSKI, J. C.; ASGHAR, M. S.; ASGHAR, A.; FORESMAN, B.; HALL, S. D.; CRABB, D. W. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 544-550, 2003.

CHANG, J.-J.; HSU, M.-J.; HUANG, H.-P.; CHUNG, D.-J.; CHANG, Y.-C.; WANG, C.-J. Mulberry anthocyanins inhibit oleic acid induced lipid accumulation by reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 25, p. 6069-6076, 2013.

CHEN, Z.-Y.; JIAO, R.; MA, K. Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8761-8773, 2008.

CHENG, D. M.; POGREBNIYAK, N.; KUHN, P.; POULEV, A.; WATERMAN, C.; ROJAS-SILVA, P.; JOHNSON, W. D.; RASKIN, I. Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. **Nutrition**, v. 30, n. 7, p. S52-S58, 2014.

CHUNG, M.-Y.; YEUNG, S. F.; PARK, H. J.; VOLEK, J. S.; BRUNO, R. S. Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1200-1206, 2010.

CIPRIANO, P. Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas isotônicas. **Food Science and Technology Dept. Viçosa, MG–Brazil: Federal Univ. of Viçosa**, v., n., p. 131, 2011.

COHEN, D. E.; FISHER, E. A. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. In: *Seminars in liver disease*, 2013NIH Public Access, p. 380.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011.

- CONDEZO-HOYOS, L.; MOHANTY, I. P.; NORATTO, G. D. Assessing non-digestible compounds in apple cultivars and their potential as modulators of obese faecal microbiota in vitro. **Food chemistry**, v. 161, n., p. 208-215, 2014.
- CONTOS, M. J.; SANYAL, A. J. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. **Advances in anatomic pathology**, v. 9, n. 1, p. 37-51, 2002.
- COREY, K. E.; CHALASANI, N. Management of dyslipidemia as a cardiovascular risk factor in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 7, p. 1077-1084, 2014.
- CORTEZ-PINTO, H.; JESUS, L.; BARROS, H.; LOPES, C.; MOURA, M.; CAMILO, M. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 816-823, 2006.
- DAY, C. P.; JAMES, O. F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1463-1466, 1998.
- DE ALMEIDA, P. L.; DE LIMA, S. N.; COSTA, L. L.; DE OLIVEIRA, C. C.; DAMASCENO, K. A.; DOS SANTOS, B. A.; CAMPAGNOL, P. C. B. Effect of jaboticaba peel extract on lipid oxidation, microbial stability and sensory properties of Bologna-type sausages during refrigerated storage. **Meat science**, v. 110, n., p. 9-14, 2015.
- DE JESUS, N.; MARTINS, A.; DE ALMEIDA, E. J.; VIEIRA, J.; DEVOS, R.; SCALOPPI, E.; APARECIDA, R.; CUNHA, R. Caracterização de quatro grupos de jaboticabeira, nas condições de Jaboticabal. SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p., 2004.
- DE MIRANDA, A. M.; JÚNIOR, J. V. R.; E SILVA, L. S.; DOS SANTOS, R. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Agaricus brasiliensis (sun mushroom) affects the expression of genes related to cholesterol homeostasis. **European journal of nutrition**, v. 56, n. 4, p. 1707-1717, 2017.
- DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; DE PAULA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 804-810, 2010.
- DE SOUZA, M. O.; E SILVA, L. S.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L.; DE FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and

low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition research**, v. 32, n. 12, p. 976-984, 2012.

DEL BEN, M.; POLIMENI, L.; BARATTA, F.; PASTORI, D.; LOFFREDO, L.; ANGELICO, F. Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 26, p. 8341-8350, 2014.

DEL BEN, M.; POLIMENI, L.; BARATTA, F.; PASTORI, D.; ANGELICO, F. The role of nutraceuticals for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **British journal of clinical pharmacology**, v., n., p., 2016.

DIKEMAN, C. L.; FAHEY JR, G. C. Viscosity as related to dietary fiber: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 8, p. 649-663, 2006.

DING, N.; RUTH, T. Y.; SUBRAMANIAM, N.; SHERMAN, M. H.; WILSON, C.; RAO, R.; LEBLANC, M.; COULTER, S.; HE, M.; SCOTT, C. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 601-613, 2013.

DONGIOVANNI, P.; LANTI, C.; RISO, P.; VALENTI, L. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 29, n., p. 1-11, 2016.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DRAGANO, N. R.; CINTRA, D. E.; SOLON, C.; MORARI, J.; LEITE-LEGATTI, A. V.; VELLOSO, L. A.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 03, p. 447-455, 2013.

EBERLÉ, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-848, 2004.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FARHADI, A.; GUNDLAPALLI, S.; SHAIKH, M.; FRANTZIDES, C.; HARRELL, L.; KWASNY, M. M.; KESHAVARZIAN, A. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. **Liver International**, v. 28, n. 7, p. 1026-1033, 2008.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLEGAL, K. M.; OGDEN, C. L.; WEI, R.; KUCZMARSKI, R. L.; JOHNSON, C. L. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1086-1093, 2001.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FON TACER, K.; ROZMAN, D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. **Journal of lipids**, v. 2011, n., p., 2011.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FOTBOLCU, H.; ZORLU, E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 16, p. 4079, 2016.

FROMENTY, B.; PESSAYRE, D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 67, n. 1, p. 101-154, 1995.

GAMBINO, R.; MUSSO, G.; CASSADER, M. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 5, p. 1325-1365, 2011.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v., n., p., 2001.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 4, p. 431-438, 2009.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

GUERRA, J. F. D. C.; MACIEL, P. S.; DE ABREU, I. C. M. E.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; DE MORAIS CARDOSO, L.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n., p. 192-202, 2015.

GUO, H.; ZHONG, R.; LIU, Y.; JIANG, X.; TANG, X.; LI, Z.; XIA, M.; LING, W. Effects of bayberry juice on inflammatory and apoptotic markers in young adults with features of non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 198-203, 2014.

GUO, Y.-J.; DENG, G.-F.; XU, X.-R.; WU, S.; LI, S.; XIA, E.-Q.; LI, F.; CHEN, F.; LING, W.-H.; LI, H.-B. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. **Food & function**, v. 3, n. 11, p. 1195-1205, 2012.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free radical research**, v. 31, n. 4, p. 261-272, 1999.

HARDY, T.; OAKLEY, F.; ANSTEE, Q. M.; DAY, C. P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. **Annu. Rev. Pathol. Mech.**, v. 11, n., p. 451-496, 2016.

HENRY, J. B.; AUBUCHON, J. P. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**: Saunders., 1997

HO, H. V. T.; JOVANOVSKI, E.; ZURBAU, A.; BLANCO MEJIA, S.; SIEVENPIPER, J. L.; AU-YEUNG, F.; JENKINS, A. L.; DUVNJAK, L.; LEITER, L.; VUKSAN, V. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the effect of konjac glucomannan, a viscous soluble fiber, on LDL cholesterol and the new lipid targets non-HDL cholesterol and apolipoprotein B, 2. **The American journal of clinical nutrition**, v. 105, n. 5, p. 1239-1247, 2017.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; IN'T VELD, J. H. H. Overview of gut flora and probiotics. **International journal of food microbiology**, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HORWITZ, W.; LATIMER, G. AOAC International: Gaithersburg. **MD, USA**, v., n., p., 2000.

Houben, T.; Brandsma, E.; Walenberg, S.; Hofker, M.; Shirinverdlov, R. Oxidized LDL at the crossroads of immunity in non-alcoholic steatohepatitis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 4, p. 416-429, 2017.

Huang, H.-P. Myrciaria cauliflora extracts attenuating hyperlipidemia and obesity in vivo. **International Journal of Contemporary Research and Review**, v. 8, n. 07, p., 2017.

Huber, P. C.; Almeida, W. P.; Fátima, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v., n., p., 2008.

Ioannou, G. N.; Haigh, W. G.; Thorning, D.; Savard, C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 5, p. 1326-1334, 2013.

Ioannou, G. N.; Van Rooyen, D. M.; Savard, C.; Haigh, W. G.; Yeh, M. M.; Teoh, N. C.; Farrell, G. C. Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 2, p. 277-285, 2015.

Jia, Y.; Kim, J.-Y.; Jun, H.-J.; Kim, S.-J.; Lee, J.-H.; Hoang, M. H.; Kim, H. S.; Chang, H. I.; Hwang, K.-Y.; Um, S.-J. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- α reducing hepatic lipid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 4, p. 698-708, 2013.

Jiang, X.; Tang, X.; Zhang, P.; Liu, G.; Guo, H. Cyanidin-3-O- β -glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 135-144, 2014.

Kajikawa, S.; Imada, K.; Takeuchi, T.; Shimizu, Y.; Kawashima, A.; Harada, T.; Mizuguchi, K. Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 4, p. 1065-1074, 2011.

Kershaw, E. E.; Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

King, A.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

LAGE, F. F. Casca de jaboticaba: inibição de enzimas digestivas, antioxidante, efeitos biológicos sobre o fígado e perfil lipídico. **Tese** (Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, 2014.

LAGE, F. F.; ASSAID, S. A.; SANTOS, G. M. N.; DE OLIVEIRA, R. V.; DUARTE, C. A. Jaboticaba [*Plinia*jaboticaba (Vell.) Berg] skins decrease lipid peroxidation: Hepatoprotective and antihyperlipidemic effects. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 11, p., 2014.

LAGIER, J.-C.; MILLION, M.; HUGON, P.; ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Human gut microbiota: repertoire and variations. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n., p., 2012.

LAMAS, C.; LENQUISTE, S.; BASEGGIO, A.; CUQUETTO-LEITE, L.; KIDO, L.; AGUIAR, A.; ERBELIN, M.; COLLARES-BUZATO, C.; MARÓSTICA, M.; CAGNON, V. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n., p. 434-446, 2018.

LATTIMER, J. M.; HAUB, M. D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1266-1289, 2010.

LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 1, p. 165-174, 2013.

LEITE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, Â. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; MACHADO, A. R. T.; DE CARVALHO-SILVA, L. B.; RUIZ, A. L. T. G. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277-2283, 2011.

LENQUISTE, S. A.; BATISTA, Â. G.; DA SILVA MARINELI, R.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 153-160, 2012.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1994. v.233, p.346-357.

LIMA, A. D. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREU, C. M. P.; DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, n. 4, p. 416, 2008.

LIMA, A. D. J. B.; CORREA, A. D.; SACZK, A. A.; MARTINS, M. P.; CASTILHO, R. O. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011a.

LIMA, A. D. J. B.; CORRÊA, A. D.; DANTAS-BARROS, A. M.; NELSON, D. L.; AMORIM, A. C. L. Sugars, organic acids, minerals and lipids in jabuticaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 540-550, 2011b.

LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. **Life sciences**, v. 79, n. 21, p. 2056-2068, 2006.

LOPES; LAGE, N. N.; GUERRA, J. F. D. C.; SILVA, M.; BONOMO, L. D. F.; PAULINO, A. H. D. S.; REGIS, A. L. R. D. S.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food research international**, v. 105, n., p. 563-569, 2018.

LOPES, T.; XAVIER, M.; QUADRI, M. G.; QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, p., 2007.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus.. Por Geog**, v. 4, n., p., 1992.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T. R.; MCGILL, D. B.; OH, B. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. In: Mayo Clinic Proceedings, 1980, p. 434-438.

LUND, E. G.; PETERSON, L. B.; ADAMS, A. D.; LAM, M.-H. N.; BURTON, C. A.; CHIN, J.; GUO, Q.; HUANG, S.; LATHAM, M.; LOPEZ, J. C. Different roles of liver X receptor α and β in lipid metabolism: effects of an α -selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 453-463, 2006.

LUO, J.; ZHANG, P.; LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of free and bound phenolics from peel and flesh of fuji apple. **Journal of food science**, v. 81, n. 7, p. M1735-M1742, 2016.

MADAN, K.; BHARDWAJ, P.; THAREJA, S.; GUPTA, S. D.; SARAYA, A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n. 10, p. 930-935, 2006.

MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 402-413, 2004.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARQUES, C.; DRAGANO, N. R.; LENQUISTE, S. A.; BATISTA, Â. G.; PALAZZO, C. C.; MARÓSTICA JR, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel powder rich in anthocyanins did not reduce weight gain and lipid content in mice and rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 62, n. 1, p. 37, 2012.

MATSUZAWA, N.; TAKAMURA, T.; KURITA, S.; MISU, H.; OTA, T.; ANDO, H.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; ZEN, Y.; NAKANUMA, Y. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1392-1403, 2007.

MATTOS, J. Frutas nativas do Brasil: jaboticabeiras. **Porto Alegre**, 92p, 1983.

MATZIOURIDOU, C.; MARUNGRUANG, N.; NGUYEN, T. D.; NYMAN, M.; FÅK, F. Lingonberries reduce atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 5, p. 1150-1160, 2016.

MCCARTHY, E. M.; RINELLA, M. E. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 3, p. 401-409, 2012.

MIN, H.-K.; KAPOOR, A.; FUCHS, M.; MIRSHAHI, F.; ZHOU, H.; MAHER, J.; KELLUM, J.; WARNICK, R.; CONTOS, M. J.; SANYAL, A. J. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 665-674, 2012.

MOFRAD, P.; CONTOS, M. J.; HAQUE, M.; SARGEANT, C.; FISHER, R. A.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; SHIFFMAN, M. L.; STRAVITZ, R. T.; SANYAL, A. J. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 1286-1292, 2003.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; DE MICIELI, F.; CASSADER, M.; RIZZETTO, M.; DURAZZO, M.; FAGÀ, E.; SILLI, B.; PAGANO, G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 909-916, 2003.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in lipid research**, v. 48, n. 1, p. 1-26, 2009.

NATARAJAN, S. K.; EAPEN, C. E.; PULLIMOOD, A. B.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. 8, p. 1240-1249, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. In: (Ed.). **Princípios de Bioquímica de Lehninger**: Artmed, 2011, NERI-NUMA, I. A.; SANCHO, R. A. S.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food research international**, v., n., p., 2017.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-1219, 2003.

NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; HUANG, H.-C.; YANG, C. S.; PICKETT, C. B. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4536-4541, 2003.

NORATTO, G. D.; LAGE, N. N.; CHEW, B. P.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; TALCOTT, S. T.; PEDROSA, M. L. Non-anthocyanin phenolics in cherry (*Prunus avium* L.) modulate IL-6, liver lipids and expression of PPAR δ and LXRs in obese diabetic (db/db) mice. **Food Chemistry**, v., n., p., 2018.

NOVELLI, E.; DINIZ, Y.; GALHARDI, C.; EBAID, G.; RODRIGUES, H.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OHSHIRO, T.; TOMODA, H. Acyltransferase inhibitors: a patent review (2010–present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 2, p. 145-158, 2015.

OLIVEIRA, A. L. D.; BRUNINI, M. A.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Caracterização tecnológica de jabuticabas' Sabará'provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v., n., p. 397-400, 2003.

OU, T. T.; HSU, M. J.; CHAN, K. C.; HUANG, C. N.; HO, H. H.; WANG, C. J. Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 15, p. 2740-2748, 2011.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PAREKH, S.; ANANIA, F. A. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2191-2207, 2007.

PARK, H. J.; JUNG, U. J.; LEE, M. K.; CHO, S. J.; JUNG, H. K.; HONG, J. H.; PARK, Y. B.; KIM, S. R.; SHIM, S.; JUNG, J. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 2, p. 360-364, 2013.

PARK, Y.; PARK, E.-M.; KIM, E.-H.; CHUNG, I.-M. Hypocholesterolemic metabolism of dietary red pericarp glutinous rice rich in phenolic compounds in mice fed a high cholesterol diet. **Nutrition research and practice**, v. 8, n. 6, p. 632-637, 2014.

PERES, M. T. L. P.; LOPES, J. R. R.; SILVA, C. B. D.; CÂNDIDO, A. C. S.; SIMIONATTO, E.; CABRAL, M. R. P.; OLIVEIRA, R. M.; FACCO, J. T.; CARDOSO, C. A. L.; SIMAS, P. H. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 836-846, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; TORRES, J. L. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12713-12724, 2011.

PLAZA, M.; BATISTA, Â. G.; CAZARIN, C. B. B.; SANDAHL, M.; TURNER, C.; ÖSTMAN, E.; JÚNIOR, M. R. M. Characterization of antioxidant polyphenols from

Myrciaria jaboticaba peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. **Food chemistry**, v. 211, n., p. 185-197, 2016.

PROMRAT, K.; KLEINER, D. E.; NIEMEIER, H. M.; JACKVONY, E.; KEARNS, M.; WANDS, J. R.; FAVA, J. L.; WING, R. R. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 121-129, 2010.

RAGHOW, R.; YELLATURU, C.; DENG, X.; PARK, E. A.; ELAM, M. B. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 65-73, 2008.

RASHID, M.; ROBERTS, E. A. Nonalcoholic steatohepatitis in children. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 30, n. 1, p. 48-53, 2000.

RASO, G. M.; ESPOSITO, E.; IACONO, A.; PACILIO, M.; CUZZOCREA, S.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; MELI, R. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. **European journal of pharmacology**, v. 604, n. 1, p. 125-131, 2009.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria c auliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

ROOPCHAND, D. E.; CARMODY, R. N.; KUHN, P.; MOSKAL, K.; ROJAS-SILVA, P.; TURNBAUGH, P. J.; RASKIN, I. Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high fat diet-induced metabolic syndrome. **Diabetes**, v., n., p. db141916, 2015.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUSSELL, D. W.; SETCHELL, K. D. Bile acid biosynthesis. **Biochemistry**, v. 31, n. 20, p. 4737-4749, 1992.

RYAN, M. C.; DESMOND, P.; WILSON, A. Reply to: "Might some of the beneficial effects of the Mediterranean diet on non-alcoholic fatty liver disease be mediated by reduced iron stores?". **Journal of hepatology**, v. 59, n. 3, p. 640, 2013.

SALAMONE, F.; LI VOLTI, G.; TITTA, L.; PUZZO, L.; BARBAGALLO, I.; LA DELIA, F.; ZELBER-SAGI, S.; MALAGUARNERA, M.; PELICCI, P. G.; GIORGIO, M. Moro orange juice prevents fatty liver in mice. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 29, p. 3862-3868, 2012.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, 2010.

SANYAL, A. J.; CAMPBELL-SARGENT, C.; MIRSHAHI, F.; RIZZO, W. B.; CONTOS, M. J.; STERLING, R. K.; LUKETIC, V. A.; SHIFFMAN, M. L.; CLORE, J. N. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**, v. 120, n. 5, p. 1183-1192, 2001.

SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; DIEHL, A. M.; BASS, N. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; LAVINE, J. E.; TONASCIA, J.; UNALP, A. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 18, p. 1675-1685, 2010.

SAVARD, C.; TARTAGLIONE, E. V.; KUYER, R.; HAIGH, W. G.; FARRELL, G. C.; SUBRAMANIAN, S.; CHAIT, A.; YEH, M. M.; QUINN, L. S.; IOANNOU, G. N. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. **Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 81-92, 2013.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, n., p. 952-968, 2013.

SEYMOUR, E. M.; SINGER, A. A.; KIRAKOSYAN, A.; URCUYO-LLANES, D. E.; KAUFMAN, P. B.; BOLLING, S. F. Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 2, p. 252-259, 2008.

- SHARP, P.; VILLANO, J. S. **The laboratory rat**: CRC press, 2012
- SHEIKH, F. G.; PAHAN, K.; KHAN, M.; BARBOSA, E.; SINGH, I. Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2961-2966, 1998.
- SILVA, P. D.; FARIA, F. D.; TONON, B.; MOTA, S. J. D.; PINTO, V. T. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 595-600, 2008.
- SIMONEN, P.; KOTRONEN, A.; HALLIKAINEN, M.; SEVASTIANOVA, K.; MAKKONEN, J.; HAKKARAINEN, A.; LUNDBOM, N.; MIETTINEN, T. A.; GYLLING, H.; YKI-JÄRVINEN, H. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. **Journal of hepatology**, v. 54, n. 1, p. 153-159, 2011.
- SORBI, D.; BOYNTON, J.; LINDOR, K. D. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 4, p. 1018-1022, 1999.
- SPADARO, L.; MAGLIOCCO, O.; SPAMPINATO, D.; PIRO, S.; OLIVERI, C.; ALAGONA, C.; PAPA, G.; RABUAZZO, A.; PURRELLO, F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 40, n. 3, p. 194-199, 2008.
- SUBRAMANIAN, S.; GOODSPEED, L.; WANG, S.; KIM, J.; ZENG, L.; IOANNOU, G. N.; HAIGH, W. G.; YEH, M. M.; KOWDLEY, K. V.; O'BRIEN, K. D. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 9, p. 1626-1635, 2011.
- SUDA, I.; ISHIKAWA, F.; HATAKEYAMA, M.; MIYAWAKI, M.; KUDO, T.; HIRANO, K.; ITO, A.; YAMAKAWA, O.; HORIUCHI, S. Intake of purple sweet potato beverage affects on serum hepatic biomarker levels of healthy adult men with borderline hepatitis. **European journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 1, p. 60-67, 2008.
- SULLIVAN, S.; KIRK, E. P.; MITTENDORFER, B.; PATTERSON, B. W.; KLEIN, S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1738-1745, 2012.
- TANG, X.; LI, Z.-J.; XU, J.; XUE, Y.; LI, J.-Z.; WANG, J.-F.; YANAGITA, T.; XUE, C.-H.; WANG, Y.-M. Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice fed high or low fat diet. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

TANG, X.; SHEN, T.; JIANG, X.; XIA, M.; SUN, X.; GUO, H.; LING, W. Purified anthocyanins from bilberry and black currant attenuate hepatic mitochondrial dysfunction and steatohepatitis in mice with methionine and choline deficiency. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 2, p. 552-561, 2015.

TARANTINO, G.; FINELLI, C. Systematic review on intervention with prebiotics/probiotics in patients with obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. **Future microbiology**, v. 10, n. 5, p. 889-902, 2015.

TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química, 2004.

TRUMBO, P.; SCHLICKER, S.; YATES, A. A.; POOS, M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 11, p. 1621-1630, 2002.

TZANETAKOU, I. P.; DOULAMIS, I. P.; KOROU, L.-M.; AGROGIANNIS, G.; VLACHOS, I. S.; PANTOPOULOU, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; PATSOURIS, E.; VLACHOS, I.; PERREA, D. N. Water Soluble Vitamin E Administration in Wistar Rats with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 6, n., p. 88, 2012.

VAN DE WIER, B.; KOEK, G. H.; BAST, A.; HAENEN, G. R. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v., n. just-accepted, p. 00-00, 2015.

VAZIRI, N.; LIANG, K. ACAT inhibition reverses LCAT deficiency and improves plasma HDL in chronic renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 287, n. 5, p. F1038-F1043, 2004.

VIDELA, L. A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUINONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clinical science**, v. 106, n. 3, p. 261-268, 2004.

VILAR, L.; OLIVEIRA, C. P.; FAINTUCH, J.; MELLO, E. S.; NOGUEIRA, M. A.; SANTOS, T. E.; ALVES, V. A.; CARRILHO, F. J. High-fat diet: a trigger of non-alcoholic steatohepatitis? Preliminary findings in obese subjects. **Nutrition**, v. 24, n. 11, p. 1097-1102, 2008.

WANG, L.; CHEN, J.; XIE, H.; JU, X.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of adlay varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5103-5113, 2013.

WANG, X.-H.; LI, C.-Y.; MUHAMMAD, I.; ZHANG, X.-Y. Fatty acid composition in serum correlates with that in the liver and non-alcoholic fatty liver disease activity scores in mice fed a high-fat diet. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v., n., p., 2016.

WEI, Y.; RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; IBDAH, J. A. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 193, 2008.

WOUTERS, K.; VAN GORP, P. J.; BIEGHS, V.; GIJBELS, M. J.; DUIMEL, H.; LÜTJOHANN, D.; KERKSIEK, A.; VAN KRUCHTEN, R.; MAEDA, N.; STAELS, B. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474-486, 2008.

WU, K.-T.; KUO, P.-L.; SU, S.-B.; CHEN, Y.-Y.; YEH, M.-L.; HUANG, C.-I.; YANG, J.-F.; LIN, C.-I.; HSIEH, M.-H.; HSIEH, M.-Y. Non-alcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol. **Journal of Clinical Lipidology**, v., n., p., 2016.

WU, S.-B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513-7525, 2012.

WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboricaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 148-159, 2013.

YANG, L.; CHEN, J.-H.; XU, T.; ZHOU, A.-S.; YANG, H.-K. Rice protein improves oxidative stress by regulating glutathione metabolism and attenuating oxidative damage to lipids and proteins in rats. **Life sciences**, v. 91, n. 11, p. 389-394, 2012.

YIN, Y.; YU, Z.; XIA, M.; LUO, X.; LU, X.; LING, W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. **European journal of clinical investigation**, v. 42, n. 11, p. 1189-1196, 2012.

YOUNOSSI, Z. M.; DIEHL, A. M.; ONG, J. P. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 746-752, 2002.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

YU, L.; LI-HAWKINS, J.; HAMMER, R. E.; BERGE, K. E.; HORTON, J. D.; COHEN, J. C.; HOBBS, H. H. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 5, p. 671-680, 2002.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZHANG, P.-W.; CHEN, F.-X.; LI, D.; LING, W.-H.; GUO, H.-H. A CONSORT-compliant, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of purified anthocyanin in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Medicine**, v. 94, n. 20, p., 2015.

ZHANG, Y.-J.; GAN, R.-Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A.-N.; XU, D.-P.; LI, H.-B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015.

ZHENG, S.; HOOS, L.; COOK, J.; TETZLOFF, G.; DAVIS, H.; VAN HEEK, M.; HWA, J. J. Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **European journal of pharmacology**, v. 584, n. 1, p. 118-124, 2008.

ZHU, J.-Z.; DAI, Y.-N.; WANG, Y.-M.; ZHOU, Q.-Y.; YU, C.-H.; LI, Y.-M. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and economy. **Digestive diseases and sciences**, v. 60, n. 11, p. 3194-3202, 2015.

ZURITA, J.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SAURA-CALIXTO, F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 936-939, 2012.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFOP



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA N.º 072/2016, de 27 de abril de 2016

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Maria Lúcia Pedrosa
DECBI/UFOP**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n.º **2014/53**, intitulado **"Efeitos da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) sobre mecanismos moleculares envolvidos no status antioxidante e no metabolismo de lipídios em ratos."**.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n.º 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA.

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.**

9.2. ANEXO II: Trabalhos publicados durante o doutorado sanduíche na *Texas A&M University*

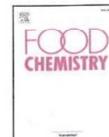
Food Chemistry 266 (2018) 405–414



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Non-anthocyanin phenolics in cherry (*Prunus avium* L.) modulate IL-6, liver lipids and expression of PPAR δ and LXRs in obese diabetic (db/db) mice



Giuliana D. Noratto^{a,*}, Nara N. Lage^{a,b}, Boon P. Chew^a, Susanne U. Mertens-Talcott^a, Stephen T. Talcott^a, Maria L. Pedrosa^b

^a Department of Nutrition and Food Science, Texas A&M University, College Station, TX, United States
^b Research Center in Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cherry
Prunus avium L.
Diabetes
Obesity
Phenolics

ABSTRACT

Anthocyanin-rich cherries are known for preventing/decreasing risk factors associated with obesity; however, the specific benefits exerted by cherry non-anthocyanin phenolics are not clear. Obese diabetic (db/db) mice fed a diet supplemented with anthocyanin-depleted cherry powder (cherry) were compared to db/db (obese) or lean counterparts (lean) fed a control isocaloric diet for 12 weeks. The reduced plasma interleukin (IL)-6 and improved liver health may be mediated by cherry fibre and non-anthocyanin phenolics. Benefits for liver health included reduction of lipids and protein carbonyls, and modulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ mRNA to resemble levels in lean. Lack of plasma antilipidemic, improvement of antioxidant defenses, and PPAR α/γ mRNA modulation in liver suggest cherry anthocyanins specific benefits. This is the first study to elucidate *in vivo* the potential benefits of cherry non-anthocyanin phenolics for diabetes-induced liver disorders and the importance of choosing processing technologies that preserve anthocyanins and health benefits of whole cherries.

1. Introduction

Obesity and metabolic syndrome have become a major public-health challenge worldwide and are characterized by clinical multifactorial disorders and coexistence of many alterations; in particular abdominal obesity, insulin-resistance, hypertension and dyslipidemia. According to the World Health Organization, the prevalence has doubled since 1980 worldwide.

Obesity and the ectopic deposition of fat promote the recruitment of macrophages, dysregulated adipokine production, which in the long-term, culminate in an inefficient insulin signaling, hyperglycemia, and increased oxidative stress mediated by production of reactive oxygen species (ROS). Equally, hyperglycemia allied with alterations in lipid metabolism and hormone concentrations that regulate energy balance can contribute to oxidative stress and inflammation. This scenario leads to the development of peripheral insulin resistance and a compensatory hyperinsulinemia, resulting in increased delivery of free fatty acids from adipocytes to other tissues including the liver. The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by liver triacylglycerol build-up and influx of fatty acids from the adipose tissue into the liver, is the hepatic manifestation of metabolic syndrome, and has become a global health concern because its incidence has increased along with the

obesity epidemic.

In general, the pathways regulated during obesity translate oxidative stress and metabolic challenges into low grade chronic inflammation, leading to diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. In this context, the host antioxidant homeostatic mechanisms are regulated to maintain oxidative stress under control; e.g. superoxide dismutase (SOD) is a major cellular defense system against superoxides; catalase (CAT) is an intracellular antioxidant enzyme which catalyzes the reaction of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen. CAT is very effective in high-level oxidative stress and protects cells from hydrogen peroxide produced within the cell by SOD. Glutathione peroxidase (GPx) is a selenium-containing antioxidant enzyme that reduces hydrogen peroxide and lipid peroxides to water and lipid alcohols, respectively, and in turn oxidizes glutathione to glutathione disulfide. GPx plays a role as a major defense system in low-level oxidative stress.

Healthy dietary habits can promote health and prevent the metabolic disorders associated with obesity. Particularly dietary phenolics can detoxify the system from oxidative species due to their scavenging role. In addition, they can regulate cellular antioxidant defenses, inflammatory pathways, transcription factors, hormones, and peptides to help in prevention and/or reduction of metabolic complications associated with obesity.

* Corresponding author at: Department of Nutrition and Food Science, Centeq A, Room 220M, 1500 Research PKWY, College Station, TX 77845, United States.
E-mail address: gnoratto@tamu.edu (G.D. Noratto).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.020>
Received 16 January 2018; Received in revised form 9 May 2018; Accepted 4 June 2018
Available online 05 June 2018
0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Effect of dark sweet cherry powder consumption on the gut microbiota, short-chain fatty acids, and biomarkers of gut health in obese db/db mice

Jose F. Garcia-Mazcorro^{1,2}, Nara N. Lage^{3,4}, Susanne Mertens-Talcott⁴, Stephen Talcott⁴, Boon Chew⁴, Scot E. Dowd⁵, Jorge R. Kavas⁶ and Giuliana D. Noratto⁴

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Mexico

² Research and Development, MNA de Mexico, San Nicolas de los Garza, Mexico

³ Research Center in Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

⁴ Department of Nutrition and Food Science, Texas A&M University, College Station, TX, United States of America

⁵ Molecular Research LP, Shallowater, TX, United States of America

⁶ Faculty of Agronomy, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Mexico

ABSTRACT

Cherries are fruits containing fiber and bioactive compounds (e.g., polyphenolics) with the potential of helping patients with diabetes and weight disorders, a phenomenon likely related to changes in the complex host-microbiota milieu. The objective of this study was to investigate the effect of cherry supplementation on the gut bacterial composition, concentrations of caecal short-chain fatty acids (SCFAs) and biomarkers of gut health using an *in vivo* model of obesity. Obese diabetic (db/db) mice received a supplemented diet with 10% cherry powder (supplemented mice, $n = 12$) for 12 weeks; obese ($n = 10$) and lean ($n = 10$) mice served as controls and received a standard diet without cherry. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene and quantitative real-time PCR (qPCR) were used to analyze the gut microbiota; SCFAs and biomarkers of gut health were also measured using standard techniques. According to 16S sequencing, supplemented mice harbored a distinct colonic microbiota characterized by a higher abundance of mucin-degraders (i.e., *Akkermansia*) and fiber-degraders (the S24-7 family) as well as lower abundances of *Lactobacillus* and Enterobacteriaceae. Overall this particular cherry-associated colonic microbiota did not resemble the microbiota in obese or lean controls based on the analysis of weighted and unweighted UniFrac distance metrics. qPCR confirmed some of the results observed in sequencing, thus supporting the notion that cherry supplementation can change the colonic microbiota. Moreover, the SCFAs detected in supplemented mice (caproate, methyl butyrate, propionate, acetate and valerate) exceeded those concentrations detected in obese and lean controls except for butyrate. Despite the changes in microbial composition and SCFAs, most of the assessed biomarkers of inflammation, oxidative stress, and intestinal health in colon tissues and mucosal cells were similar in all obese mice with and without supplementation. This paper shows that dietary supplementation with cherry powder for 12 weeks affects the microbiota and the concentrations of SCFAs in the lower intestinal tract of obese db/db diabetic mice. These effects occurred in

Submitted 12 October 2017
Accepted 5 December 2017
Published 3 January 2018

Corresponding authors
Jose F. Garcia-Mazcorro,
josegarcia_mex@hotmail.com
Giuliana D. Noratto,
gnoratto@exchange.tamu.edu

Academic editor
Maria Cristina Albertini

Additional Information and
Declarations can be found on
page 22

DOI 10.7717/peerj.4195

© Copyright
2018 Garcia-Mazcorro et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Garcia-Mazcorro et al. (2018), Effect of dark sweet cherry powder consumption on the gut microbiota, short-chain fatty acids, and biomarkers of gut health in obese db/db mice. *PeerJ* 6:e4195; DOI 10.7717/peerj.4195

9.3. ANEXO III: Demais trabalhos publicados durante o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

1. **LAGE, N. N.**; LOPES, J.M.M.; PEREIRA, R.R.; GUERRA, J. F. C.; PEREIRA, M.F.A; SILVA, M.; BONOMO, L. F.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Antioxidant potential of the buriti (*Mauritia flexuosa*) flour in diabetic rats. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION. , 2018.
2. LOPES, J.M.M.; **LAGE, N.N.**; GUERRA, J.F.C.; SILVA, M.; BONOMO, L.F.; PAULINO, A.H.S.; REGIS, A.L.R.S.; PEDROSA, M.L.; SILVA, M.E. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL. , v.105, p.563 - 569, 2018.
3. CARVALHO, M. M. F.; REIS, L. L. T.; LOPES, J.M.M.; **LAGE, N.N.**; GUERRA, J. F. C.; ZAGO, H. P.; BONOMO, L. F.; PEREIRA, R.R.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M.L. Açai improves non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by fructose. Nutrición Hospitalaria. , v.35, p.318 - 325, 2018.
4. PEREIRA, R.R.; DE ABREU, I.C.M.E.; GUERRA, J.F.C.; **LAGE, N. N.**; LOPES, J.M.M.; SILVA, M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M.L. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Upregulates Paraoxonase 1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. , v.2016, p.1 - 13, 2016.

9.4. ANEXO IV: Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais durante o doutorado

Trabalho Apresentados em Congressos	Anos				
	2014	2015	2016	2017	2018
Chemical and phytochemical composition of flour buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>) and its effects about biomarkers of oxidative stress in cardiac tissue of diabetic rats. <i>XII Reunião Regional Nordeste da SBBq, Natal, RN</i>	X				
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> mart.) effect on metabolic changes induced by high-fat diet in mice. <i>SBBq/IUBMB 2015, Foz do Iguaçu, RS</i>		X			
Effects of jabuticaba skin (<i>Myrciaria cauliflora</i>) on lipid metabolism in rats with high-fat diet-induced NAFLD. <i>45a Reunião Anual da SBBq, Natal, RN</i>			X		
Efeitos da casca de jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>) sobre a função hepática e tecido adiposo abdominal em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. <i>III CONAN e VI COMAN, Ouro Preto, MG</i>				X	
Dark sweet cherry helps to ameliorate metabolic disorders in blood and liver associated with obesity and diabetes in mice. <i>SOT 57th Annual Meeting, San Antonio, TX, USA</i>					X
Dark sweet cherry (<i>Prunus avium</i>) polyphenolics as breast cancer chemopreventive natural compounds. <i>Student Research Week, Texas A&M University, College Station, TX, USA</i>					X
Potential of sweet cherry polyphenolics to fight aggressive and metastatic breast cancer. <i>47a. Reunião Anual da SBBq, Joinville, SC</i>					X