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

Adição de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) à Dieta Hipercolesterolemiante Modifica a Expressão de Genes Hepáticos do Metabolismo de Colesterol e o Perfil de Adipocinas Séricas em Ratos

MELINA OLIVEIRA DE SOUZA

Ouro Preto
2013

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

Adição de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) à Dieta Hipercolesterolemiante Modifica a Expressão de Genes Hepáticos do Metabolismo de Colesterol e o Perfil de Adipocinas Séricas em Ratos

Doutoranda: Melina Oliveira de Souza
Orientadora: Profª. Drª. Maria Lúcia Pedrosa
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação 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
2013

S729a Souza, Melina Oliveira de.
Adição de polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) à dieta hipercolesterolemiante modifica a expressão de genes hepáticos do metabolismo de colesterol e o perfil de adipocinas séricas em ratos [manuscrito] / Melina Oliveira de Souza. – 2013.
xiv, 103f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientadora: Profª Drª Maria Lúcia Pedrosa.
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eutáquio Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Açaí - Teses. 2. Hipercolesterolemia - Teses. 3. Colesterol - Teses. 4. Expressão gênica - Teses. 5. Proteínas - Adipocinas - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 613.2.038:634.616

Catalogação: sisbin@sisbin.ufop.br

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Adição de polpa de açaí (*Euterpe Oleracea Martius*) à dieta hipercolesterolemiante modifica a expressão de genes hepáticos do metabolismo de colesterol e o perfil de adipocinas séricas em ratos"

Aos vinte e cinco dias do mês de Janeiro de 2013, às 14:00, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Melina Oliveira de Souza**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....APROVAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Examinador (UFLA)

Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Gouveia Pelúzio
Examinadora (UFV)

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Examinador (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Renata Nascimento de Freitas
Examinador (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pedrosa
Presidente

DATA DA DEFESA: **25/01/2013**

APOIO FINANCEIRO

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

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo **Amilton Rodrigues da Silva**, por ter permanecido ao meu lado me incentivando a percorrer este caminho e estendendo sua mão amiga em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a graça de chegar até aqui e por colocar em meu caminho uma família amável e pessoas amigas e preciosas.

Aos meus professores e orientadores **Maria Lúcia Pedrosa** e **Marcelo Eustáquio da Silva**, por serem mestres no sentido literal que a denominação confere. Exemplos de amor à profissão, que conduzem seus alunos e a ciência com excelência, garra, força, motivação, inspiração e muito conhecimento. Agradeço pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

Ao professor **Rinaldo Cardodo dos Santos**, que também se faz excepcional na arte de ser mestre. Agradeço pela orientação, pela amizade, pelo exemplo a ser seguido e pelo aperfeiçoamento dado aos manuscritos submetidos à publicação.

A professora **Daniela Caldeira Costa**, pelos ensinamentos, amor à profissão, pelo exemplo de profissional e pessoa, pelos aconselhamentos, incentivo e amizade.

À minha mãe **Maria das Graças O. Souza e** meus irmãos **Maíra O Souza e Rafael O. Souza**, família que eu tanto amo. Meu especial agradecimento que, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho.

Ao meu pai **Ronaldo O. Souza**, que mesmo não estando entre nós, sei que está sempre me protegendo.

Aos meus tios, **Renato Cruz e Maria de Lurdes Cruz**, pelas palavras de encorajamento.

A todos **meus familiares** pela amizade e confiança.

A todos os meus ***amigos-irmãos*****,** pessoas que ficarão para sempre em minha memória, pessoas amigas que levarei no meu coração. Às vezes, pelo simples fato de terem dito uma única palavra de conforto quando eu precisei, ou por terem me dado um minuto de sua atenção, ou por terem confiado em mim, ou por terem me ouvido falar das minhas angústias, medos, vitórias e derrotas. Muito obrigada pela amizade de vocês.

A minha grande amiga **Cíntia Lopes de Brito Magalhães,** pelos ensinamentos e disponibilidade tão sincera.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Nutrição Experimental, em especial a **Aline Mayrink de Miranda, Ana Flávia Santos Sampaio, Bianca Figueiredo, Bruno da Cruz Pádua, Carolina Araújo, Danielle de Lima Ávila, Fabiano Kenji Haraguchi, Glaucy Rodrigues de Araújo, Isabel Emerich, Joyce Ferreira Guerra, Kely Raspante, Lorena Souza e Silva, Maísa Silva, Natália Nascimento, Poliane Maciel, Rogério Tadeu Ferreira, Sandra Camilo, Simone de**

Fátima Viana Cunha, Waleska Claudia Dorna Amaral, a minha gratidão e a certeza de que, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.
Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Experimental e Bioquímica Metabólica, **Jair Pastor Mota, Clodoaldo e Renata Rebeca**, pela dedicação e disponibilidade que sempre me atenderam.

Aos **Laboratórios pertencentes ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**, em especial ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Laboratório de Doença de Chagas, Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Imunoparasitologia, obrigada pelo suporte necessário a realização deste trabalho.

RESUMO

O fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) ganhou popularidade no Brasil, Estados Unidos e outros países sendo considerado como um "superalimento". Sua polpa vem sendo estudada em nosso e outros laboratórios, e suas atividades funcionais confirmadas. Visando ampliar o conhecimento sobre seus mecanismos de ação, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da polpa de açaí sobre fatores envolvidos na homeostase do colesterol hepático e sobre a concentração de adipocinas em ratos com hipercolesterolemia induzida por dieta. Ratos *Fischer* (fêmeas) foram divididos em quatro grupos de 8 animais de acordo com o tratamento recebido. O grupo C recebeu dieta padrão AIN-93M (4% óleo de soja), o grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiante (25% de óleo de soja e 1% de colesterol), o grupo CA recebeu a mesma dieta padrão suplementada com 2% da polpa de açaí e o grupo HA recebeu a mesma dieta hipercolesterolemiante suplementada com 2% da polpa de açaí. Ao final de cinquenta e seis dias, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado para a determinação do perfil lipídico e concentração de adipocinas. Após eutanásia, o fígado foi removido para determinação da expressão gênica. O grupo HA apresentou uma melhora significativa do perfil lipídico sérico, com redução do colesterol total, das lipoproteínas aterogênicas e do índice aterogênico, comparado os animais do grupo H. A polpa de açaí não afetou a expressão gênica da enzima CYP7A1 mas, por outro lado, promoveu um aumento significativo na expressão hepática dos genes dos transportadores ABCG5 e ABCG8 nos animais hipercolesterolêmicos. ABCG5 e ABCG8 formam um heterodímero funcional que promove a secreção hepatobiliar do colesterol. Além disso, o grupo HA apresentou aumento na expressão gênica hepática do receptor de LDL, proteína responsável pela captação da lipoproteína LDL plasmática, e na concentração de colesterol eliminado no conteúdo fecal. Com relação as adipocinas, a polpa de açaí reduziu os níveis séricos de leptina e aumentou o de adiponectina nos animais hipercolesterolêmicos. A concentração sérica de TNF-α não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos experimentais. Nossos resultados sugerem que o consumo da polpa de açaí melhora o perfil lipídico sérico de ratos hipercolesterolêmicos por modular a expressão de proteínas chaves do metabolismo hepático do colesterol e regula a concentração sérica de adipocinas, indicando ter este fruto um importante valor na prevenção das doenças cardiovasculares.

Palavras-chaves: *Euterpe oleracea* Martius; Açaí; Hipercolesterolemia; Expressão de genes do metabolismo do colesterol; Adipocinas; Ratos.

ABSTRACT

The açaí fruit (*Euterpe oleracea* Martius) has gained popularity in Brazil, EUA and other countries, being considered as a "superfood". Its functional properties have been studied and confirmed in our and other laboratories. Aiming at broadening the knowledge about its mechanisms of action, the objective of present study was to investigate the effect of açaí pulp on factors involved in cholesterol homeostasis in the liver and levels of adipokines in rats with dietary-induced hypercholesterolemia. Female *Fischer* rats were divided into 4 groups of 8 animals each, according to the treatment applied. The C group was fed a standard AIN-93 M diet (4% soy oil), the CA group was fed the standard diet supplemented with 2% açaí pulp, the H group was fed the hypercholesterolemic diet (25% soy oil and 1% cholesterol) and the HA group was fed the hypercholesterolemic diet supplemented with 2% açaí pulp. At the end of fifty-six days, the animals were anesthetized and the blood was collected for determination of lipid profile and adipokine content. After euthanasia, the liver was removed for determination of gene expression. Group HA presented a significant improvement of the serum lipid profile, with a decrease of total cholesterol, atherogenic lipoproteins and atherogenic index, compared with the animals of group H. The expression of CYP7A1 was unaffected by açaí pulp supplementation. On the other hand açaí promoted a significant increase in hepatic gene expression of transporters ABCG5 and ABCG8 in the hypercholesterolemic animals. These transporters form a functional heterodimer that promote the direct excretion of cholesterol via the bile. In addition, group HA exhibited increased expression of LDL-R gene in the liver, which is a protein responsible for the uptake of LDL cholesterol in the serum, and an increase in the fecal cholesterol excretion. In relation to adipokines, the açaí pulp decreased the serum levels of leptin and increased those of adiponectin in the hypercholesterolemic animals. No significant difference was observed in TNF-α levels among all experimental groups. These results suggest that açaí pulp improves the serum lipid profile of the hypercholesterolemic rats by modulating the expression of key proteins of hepatic cholesterol metabolism and regulates the concentration of adipokines, indicating its potential value for the prevention of cardiovascular disease.

Keywords: Euterpe oleracea Martius; Açaí; Hypercholesterolemia; Expression of genes of cholesterol metabolism; Adipokines; Rats.

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	IX
Capítulo 1 - Introdução	2
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	4
2.1 - Doenças Cardiovasculares	5
2.2 - Metabolismo do Colesterol	8
2.3 - Adipocinas	16
2.3.1 - Associação entre leptina, adiponectina, TNF-α e DCV	17
2.4 - Açaí (*Euterpe oleracea* Martius)	21
Capítulo 3 - Objetivos	26
3.1 - Objetivo Geral	27
3.2 - Objetivos Específicos	27
Capítulo 4 - Material e Métodos	28
4.1 - Açaí	29
4.2 - Animais	29
4.3 - Dietas	30
4.4 - Delineamento Experimental	31
4.5 - Dosagens dos Parâmetros Bioquímicos Séricos	33
4.6 - Extração e dosagem da gordura retida no conteúdo fecal	34
4.6.1 - Dosagem de colesterol total na gordura extraída do conteúdo fecal	34
4.7 - Extração e dosagem da gordura hepática	35
4.7.1 - Dosagem de colesterol total na gordura hepática	35
4.8 - Ensaio da reacão em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR)	36
4.8.1 - Extração do RNA total	36
4.8.2 - Síntese do cDNA	36
4.8.3 - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	37
4.8.4 - Curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores	37
4.8.5 - qRT-PCR	38
4.9 - Análise Estatística	39
Capítulo 5 - Resultados	41
5.1 - Colesterol total e peso corporal inicial e com 14 dias de experimento	42
5.2 - Ganho de peso, excreção fecal e ingestão alimentar	42
5.3 - Indicadores da função hepática	43

5.4 - Lipídeos séricos e índice aterogênico 44
5.5 - Gordura total e colesterol total no fígado e excretado nas fezes 45
5.6 - Expressão do mRNA de genes que regulam o metabolismo hepático do colesterol 46
5.7 - Concentração sérica das adipocinas 48
5.8 - Correlação entre CT e adipocinas 49
Capítulo 6 - Discussão 51
Capítulo 7 - Conclusão 59
Capítulo 8 - Artigos 61
Capítulo 9 - Referências Bibliográficas 63
Capítulo 10 - Anexos 79
Anexo I - Protocolos das Dosagens Bioquímicas Séricas 80
I.1 - Alanina Aminotransferase 80
I.2 - Aspartato Aminotransferase 81
I.3 - Colesterol HDL 82
I.4 - Colesterol Total 83
Anexo II - Protocolo das dosagens de imunoensaio do tipo Elisa 85
II.1 - Leptina 85
II.2 - Adiponectina 88
II.3 - TNF-α 91
Anexo III - Concentração e pureza do RNA extraído do fígado 95
Anexo IV - Curva padrão e curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores 96

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Composição das dietas experimentais (g / Kg de dieta) 31

Tabela II - Caloria proveniente dos macronutrientes das dietas experimentais (Kcal / Kg de dieta) 31

Tabela III - Colesterol total e peso corporal inicial e com 14 dias de experimento de ratos tratados com dieta padrão e hipercolesterolemiante. 42

Tabela IV - Ganho de peso final, excreção fecal diária e ingestão alimentar diária de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí. 43

Tabela V - Peso do fígado, atividade sérica da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí. 44

Tabela VI - Colesterol total final, Colesterol - HDL, colesterol não-HDL e índice aterogênico de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí. 45

Tabela VII - Gordura total e colesterol total no fígado e excretada nas fezes de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí. 46

Tabela VIII - Coeficientes de correlação entre colesterol total e leptina, adiponectina e TNF-α dos animais experimentais. 50

LISTA DE FIGURAS

Figura I - Formação da placa de ateroma 6

Figura II - Liberação de adipocinas pelo tecido adiposo e formação da placa de ateroma 7

Figura III - Estrutura química do colesterol 8

Figura IV - Regulação pós-transcricional da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase 9

Figura V - Regulação da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase pelo estado metabólico celular. 10

Figura VI - Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas 11

Figura VII - Captação do colesterol por endocitose mediada por receptores 12

Figura VIII - Ativação da Proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol 14

Figura IX - Eliminação do colesterol livre e de fitosteróis na bile 15

Figura X - Contribuição de adipocinas pró e antiinflamatórias para a disfunção do endotélio e consequente formação da placa de ateroma 17

Figura XI - Efeitos anti-aterogênicos da adiponectina 19

Figura XII - Palmeira *Euterpe oleraceae* Martius e o fruto açaí 21

Figura XIII - Delineamento Experimental 32

Figura XIV - Efeito da suplementação com açaí sobre a expressão do mRNA de genes que regulam o metabolismo hepático do colesterol em ratos controles e hipercolesterolêmicos 47

Figura XV - Efeito da suplementação com açaí na concentração sérica de adipocinas 49

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCGs – do ingles, *ATP-binding cassette subfamily G transporters*

ANOVA - Análise de variância

ALT - Alanina aminotransferase

Apo B100 - Apolipoproteina B100

AST - Aspartato aminotransferase

C - Grupo que recebeu dieta padrão

CA – Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí 2%

CT – Colesterol Total

CYP7A1- Colesterol-7α-hidroxilase

DCV – Doenças Cardiovasculares

GAPDH - Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase

H - Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante

HA - Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí 2%

HDL - Lipoproteína de densidade alta

HMG CoA-R - 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase

INSIG - Gene 1 induzido por insulina

LDL - Lipoproteína de densidade baixa

LDL-R – Receptor da lipoproteína de densidade baixa

QM - Quilomícrom

qRT-PCR - Reacão em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa

SREBP-2 - Proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol – 2

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

Capítulo 1 - Introdução

Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que, a cada ano, 17,3 milhões de pessoas morrem em todo o mundo vítimas das doenças cardiovasculares (DCV) (World Health Organization, 2008). A hipercolesterolemia promove alterações estruturais e funcionais nas paredes dos vasos contribuindo para o desenvolvimento dessas doenças (Haller, 1997).

Uma alimentação adequada tem sido apontada como fator importante na prevenção e controle da hipercolesterolemia e vários componentes presentes em alimentos são importantes na manutenção da homeostase do colesterol. Neste sentido, encontra-se o açaí. Açaí é fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Martius nativa da região amazônica (Lorenzi *et al.,* 1996), recentemente ganhou popularidade no Brasil, Estados Unidos e outros países, uma vez que seu consumo tem sido associado a vários efeitos benéficos para a saúde, destacando-se o seu potencial antioxidante (Del Pozo-Insfran *et al*., 2004; Menezes *et al*., 2005). A composição química do açaí o indica com alto potencial para prevenção das DCV, tanto pela presença de polifenóis como pela presença de ácidos graxos insaturados, fitosteróis e fibras alimentares (Schauss *et al*., 2006b; Sanabria e Sangronis, 2007).

Recentemente, nosso grupo investigou o potencial hipocolesterolêmico da polpa de açaí em ratos submetidos as dietas padrão e hipercolesterolemiante. Os resultados mostraram que o consumo deste fruto apresentou significante efeito hipocolesterolêmico, reduzindo colesterol total e frações aterogênicas do colesterol - lipoproteína de densidade baixa (LDL) + lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) - (Souza *et al*., 2010). Outros estudos, em humanos e modelos experimentais, também mostraram que o açaí promoveu uma melhora significante nos níveis séricos de colesterol (De Oliveira *et al*., 2010; Udani *et al*., 2011; Xie *et al.,* 2011). Entretanto, não foi identificado se fatores que regulam o metabolismo do colesterol podem ser influenciados pelo consumo da polpa do açaí.

Decidiu-se investigar o papel da suplementação com a polpa de açaí sob a expressão de genes que regulam a homeostase hepática do colesterol. O fígado possui papel essencial na regulação do metabolismo do colesterol, controlando as vias de fornecimento e os caminhos de eliminação deste esterol pelo corpo. Ao nível transcricional, a síntese do colesterol é regulada pelo fator de transcrição ligado à membrana do retículo endoplasmático, denominado proteína ligadora aos elementos de

resposta a esterol - 2 (SREBP-2) (Brown e Goldstein, 1997). Quando as células estão depletadas de colesterol, o SREBP-2 é liberado do retículo endoplasmático e translocado para o núcleo onde ativa a transcrição de genes alvos responsáveis pelo aumento da concentração intracelular do colesterol como, o do receptor da lipoproteína de densidade baixa (LDL-R) e da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG CoA-R) (Rudling, 1992). Por outro lado, o fígado elimina o excesso de colesterol do corpo pela formação de ácidos biliares, através da reação catalisada pela enzima colesterol-7α-hidroxilase (CYP7A1), ou excretando diretamente na bile, na forma de colesterol livre, caminho controlado pelos transportadores ABCG5 e ABCG8- *ATP-binding cassette subfamily G transporters* (Russell e Setchell, 1992; Yu et al., 2002).

Neste contexto, em relação à biossíntese do colesterol analisamos a expressão da HMG CoA-R, LDL-R, SREBP-2, Apo B100 (apolipoproteina B100) e para avaliar proteínas envolvidas na eliminação do excesso do colesterol do corpo, analisamos a expressão de CYP7A1, ABCG5 e ABCG8. Adicionalmente investigamos o efeito deste fruto sobre a excreção fecal do colesterol.

De acordo com evidências mais recentes, o tecido adiposo também está envolvido no desenvolvimento das DCV, devido a produção e secreção de fatores inflamatórios chamados adipocinas (Ahima e Flier, 2000). Disfunções no tecido adiposo promovem um desequilíbrio nos níveis séricos de algumas adipocinas o que altera a função endotelial e propicia o aparecimento da lesão aterosclerótica (Hotamisligil *et al*., 1993; Spiegelman *et al*., 1993; Shimomura *et al*., 1996; Maeda *et al*., 1997; Steppan *et al*., 2001; Lau *et al*., 2005). Sendo o açaí um fruto que exibe propriedades antiinflamatórias (Matheus *et al*., 2006; Schauss *et al*., 2006a) e dado o interesse na relação entre disfunção do tecido adiposo e DCV, investigamos o efeito da suplementação com a polpa de açaí sobre fatores inflamatórios envolvidos na etiopatogenia das doenças vasculares. Assim, as concentrações séricas das adipocinas leptina, adiponectina e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) foram avaliadas.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Doenças cardiovasculares

Em 2001, Robert Beaglehole, lançou um apelo para o engajamento global no controle das DCV. Estimando que naquele ano houvessem 56 milhões de mortes em todo o mundo, ele esperava que 12,5 milhões delas fossem atribuíveis à doença coronariana e ao acidente vascular cerebral, com ocorrência afetando todos os países (Beaglehole, 2001). Apesar dos importantes avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento, dados da Organização Mundial da Saúde mostram que, a cada ano, 17,3 milhões de pessoas ainda morrem em todo o mundo vítimas das DCV (World Health Organization, 2008).

No Brasil, as DCV apresentam alta morbidade e mortalidade em homens e mulheres, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos (Coltro *et al*., 2009). Essas doenças representam uma cifra expressiva dos gastos em saúde e apresentam custos socioeconômicos elevados. Dados do Ministério da Saúde mostram que em 2005 ocorreram 1.180.184 internações por DCV, com custo global de R$ 1.323.775.008,28.

Tradicionalmente, considera-se que as DCV se desenvolvem em adultos e idosos, porém grande parte dos fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento tem início na infância e na adolescência (Rique *et al*., 2002), podendo apresentar efeitos aditivos na vida adulta (Mendes *et al.*, 2006). Dentro da multicausalidade das DCV, existe uma série de fatores de risco que contribui para o seu aparecimento. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, os mais evidentes no panorama nacional de saúde cardiovascular são: obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo e dislipidemia (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

De uma maneira geral, podemos definir DCV como doenças que afetam o coração, os vasos sanguíneos e as doenças vasculares do cérebro. Existem vários tipos dessas doenças, entre as mais comuns podemos referir o infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral e a doença arterial periférica, sendo importante destacar o papel da aterosclerose na etiopatogenia das várias DCV (Ministério da Saúde, 2012).

A aterosclerose é uma desordem inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão endotelial, deposição lipídica, migração de células musculares e calcificação, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Wang *et al*., 2012). Em linhas gerais, o colesterol ligado à LDL em altas concentrações na corrente sanguínea pode acumular no espaço subendotelial arterial e

promover um aumento na permeabilidade do endotélio vascular a linfócitos e monócitos. Além disso, essas partículas de LDL podem sofrer modificações químicas, como por exemplo, oxidação por espécies reativas de oxigênio, tornando-se LDL modificada as quais são atraídas para a íntima das artérias (Gant e Heinecke, 2001). Macrófagos reconhecem essas partículas de LDL modificadas, por meio de receptores *scavengers*, formando as células espumosas (Kunjathoor *et al*., 2002). Em seguida, uma capa fibrosa contendo células musculares lisas e colágeno é formada, originando a placa de ateroma (Osterud e Bjorklid, 2003) (Figura I).

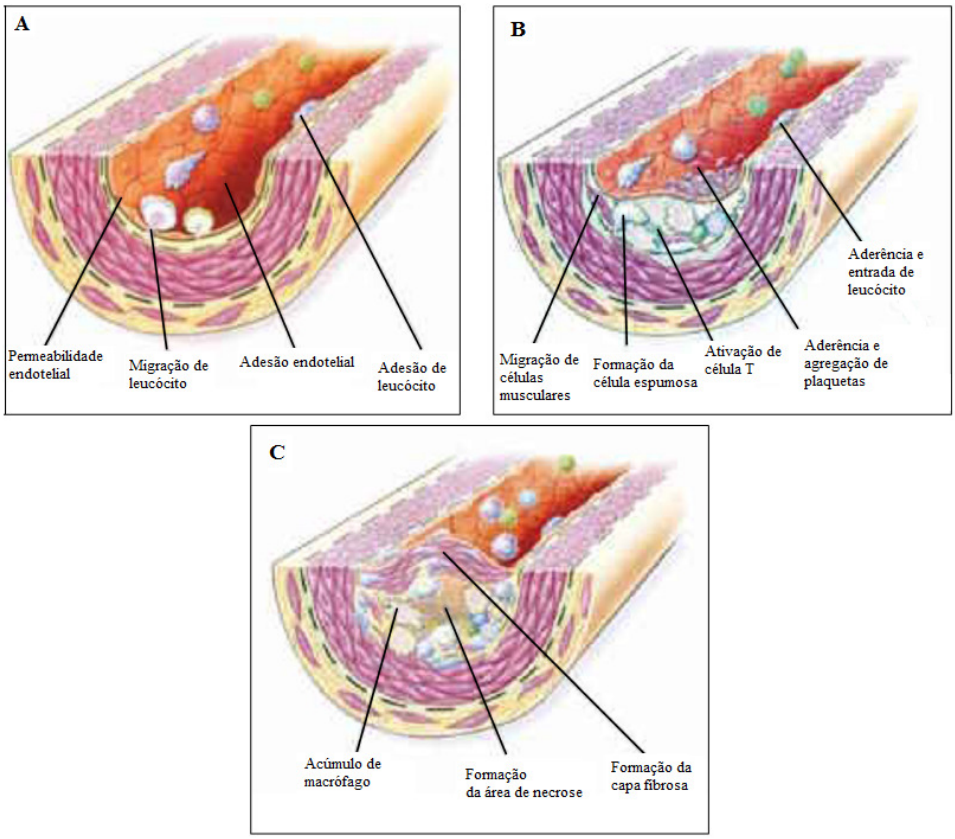


Figura I – Formação da placa de ateroma. A - Disfunção endotelial: Migração de leucócitos e adesão na camada íntima; B – Formação da célula em espuma e migração de células musculares lisas; C – Formação da capa fibrosa.
Fonte: adaptado de Ross, 1999.

Portanto, o colesterol ligado à LDL é fator causal e independente para o desenvolvimento das DCV (Williams e Tabas, 1995), visto que seu aumento no plasma promove alterações estruturais e funcionais nas paredes dos vasos, determinantes para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Haller, 1997). Além da hipercolesterolemia, a inflamação é um fator importante na formação da placa de

ateroma (Ross, 1999). A primeira mudança que precede a formação da lesão aterosclerótica é a agressão ao endotélio vascular que é mediada por vários estímulos inflamatórios. Como por exemplo, o surgimento de moléculas de adesão leucocitárias na superfície endotelial e a atração de monócitos e linfócitos (Gimbrone *et al*., 1995).

Um crescente corpo de evidências indica que o tecido adiposo também é um fator envolvido no desenvolvimento da aterosclerose, devido a produção e secreção de fatores inflamatórios - as adipocinas - como por exemplo, leptina, resistina, proteína estimuladora de acilação, inibidor do ativador de plasminogênio-1, TNF-α e interleucina-6 (Ahima e Flier, 2000). Alterações na secreção dessas adipocinas promovem o desenvolvimento da aterosclerose, por primordialmente alterarem a função endotelial (Hotamisligil et al., 1993; Spiegelman et al., 1993; Shimomura et al., 1996; Maeda et al., 1997; Steppan et al., 2001; Lau et al., 2005). Por exemplo, a leptina promove um estímulo na proliferação e migração de células endoteliais (Martin *et al*., 2008) (Figura II).

Por outro lado, a adiponectina, uma adipocina com efeito antiinflamatório, é descrita como anti-angiogênica (Fernandez-Sanchez *et al*., 2011). Esta adipocina protege contra o desenvolvimento da placa de ateroma ao inibir a formação das células espumosas e reduzir a expressão de fatores inflamatórios como, o TNF-α e a proteína C-reativa (Sikaris, 2004).

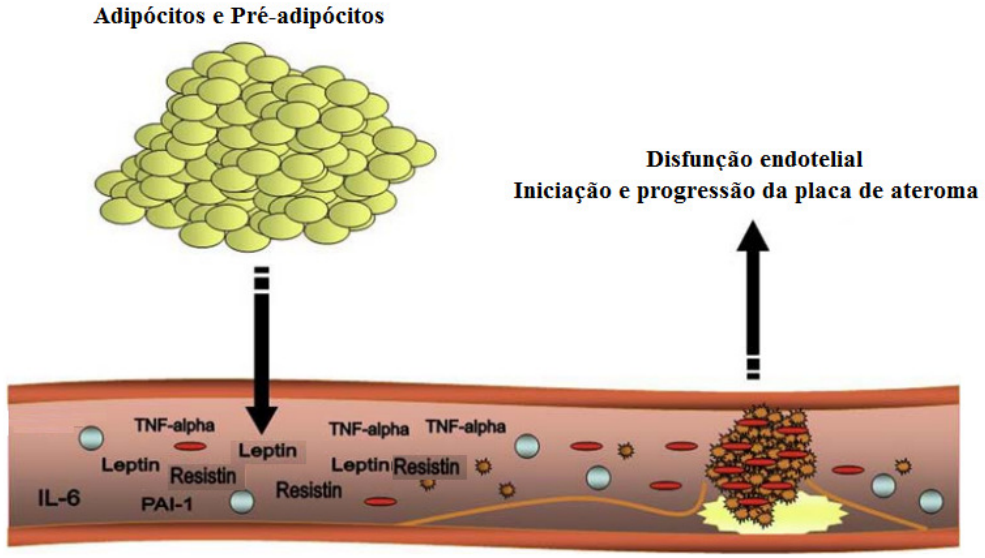


Figura II – Liberação de adipocinas pelo tecido adiposo e formação da placa de ateroma. Inibidor do ativador de plasminogênio-I (PAI-1); Fator de necrose tumoral (TNF-alfa); Interleucina-6 (IL-6).
Fonte: adaptado de Calabro *et al*., 2009.

2.2 - Metabolismo do Colesterol

Há mais de 100 anos o colesterol, principal esterol nos tecidos animais, tem sido amplamente estudado. Sua estrutura química é caracterizada pela presença do núcleo esteróide constituído por quatro anéis fundidos entre si, três deles com seis átomos de carbonos e um com cinco átomos (Figura III). O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares, da vitamina D, além de ter importantes funções nas membranas celulares, influenciando na sua fluidez e no estado de ativação de enzimas.

O metabolismo hepático do colesterol é essencial para controle de seus níveis no sangue e tecidos. No fígado ocorrem vias essenciais na regulação do metabolismo do colesterol, que controlam o fornecimento e os caminhos de eliminação deste esterol pelo corpo, atuando em três mecanismos principais: síntese intracelular do colesterol, armazenamento após esterificação e excreção pela bile (Nelson e Cox, 2006).

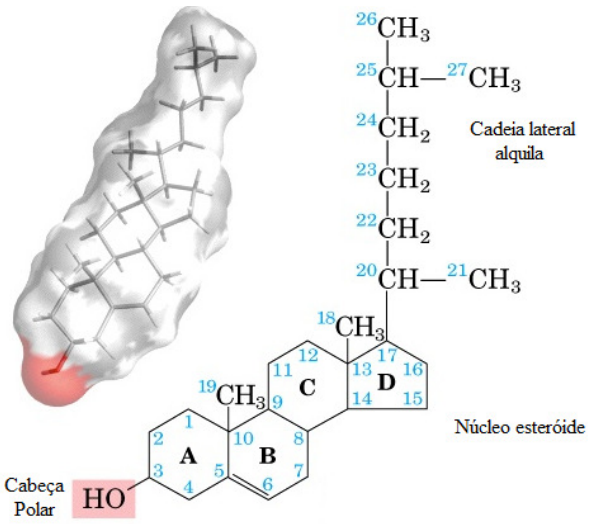


Figura III – Estrutura química do colesterol.
Fonte: Nelson e Cox, 2006.

As células adquirem o colesterol por meio da biossíntese endógena e pela dieta. A síntese do colesterol ocorre no citoplasma das células utilizando enzimas do citosol e retículo endoplasmático. O precursor de todos os átomos de carbono do colesterol é o grupo acetil da molécula de acetil-CoA. Os passos da biossíntese do colesterol envolvem uma via complexa com aproximadamente 21 etapas. A condensação de três grupos acetila leva à formação do mevalonato, que contém seis carbonos. A descarboxilação do mevalonato produz uma unidade isopreno de cinco carbonos. Seis

unidades de isopreno condensam-se para formar o esqualeno, que contém 30 átomos de carbono. Este sofre ciclização para formar o lanosterol, que após uma série de mudanças (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) origina o colesterol (Nelson e Cox, 2006).

A reação que converte acetil-CoA em mevalonato é catalisada pela enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG CoA-R). Esta enzima é uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático sendo o principal ponto de regulação na via de síntese do colesterol (Nelson e Cox, 2006).

A HMG CoA-R é inibida por *feedback* pelo colesterol garantindo que a síntese deste esterol atenda, mas não exceda os requisitos celulares (Goldstein e Brown, 1990). Ao nível transcricional o colesterol regula esta enzima por modular a ativação do fator de transcrição ligado à membrana do retículo endoplasmático denominado proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol - 2 (SREBP-2) (Goldstein *et al*., 2006). A degradação da HMG CoA-R é regulada pela proteína ligada ao retículo endoplasmático conhecida como gene 1 induzido por insulina (INSIG). Em condições de abundância de colesterol celular, INSIG liga-se à HMG CoA-R e recruta gp78, uma ligase E3 da ubiquitina, e outras enzimas permitindo a ubiquitinação da HMG CoA-R e sua degradação proteômica. Quando os níveis de colesterol celular estão esgotados INSIG dissocia-se da HMG CoA-R (Sever *et al*., 2003; Song *et al*., 2005) (Figura IV).

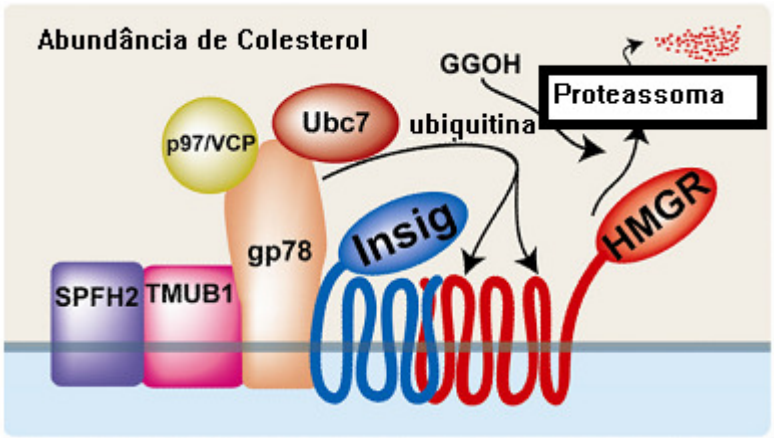


Figura IV – Regulação pós-transcricional da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase. 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG CoA-R); Gene 1 induzido por insulina (INSIG); Ligase E3 da ubiquitina (gp78).
Fonte: adaptado de Burg e Espenshade, 2011.

A HMG CoA-R também é regulada pelo estado metabólico celular (Hardie *et al*., 2006). Em linhas gerais, alta razão AMP:ATP ativa alostericamente a proteína quinase dependente de AMP que fosforila a HMG CoA-R (Tabernero *et al*., 1999). A fosforilação inibi a atividade desta enzima, sendo completamente restaurada pela reação de desfosforilação catalisada pela proteína fosfatase A2 (Figura V).

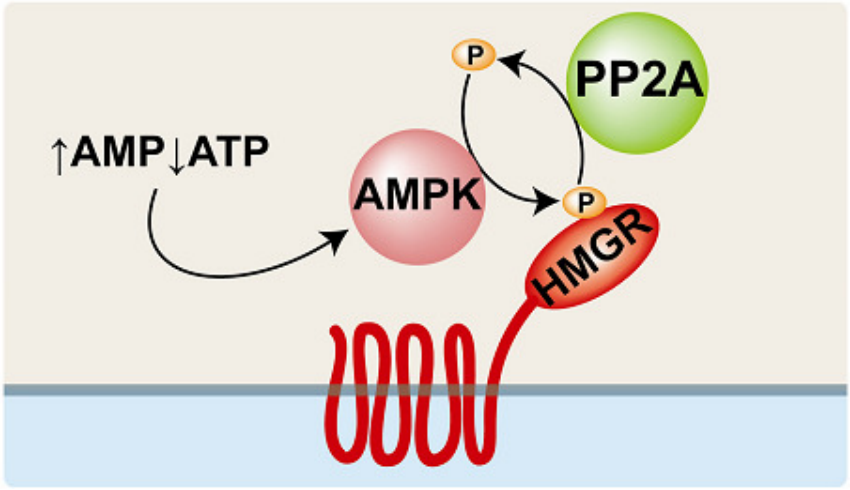


Figura V – Regulação da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase pelo estado metabólico celular. Adenosina monofosfato (AMP); Adenosina trifosfato (ATP); proteína quinase dependente de AMP (AMPK); 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG CoA-R); proteína fosfatase A2 (PPA2).
Fonte: adaptado de Burg e Espenshade, 2011.

Além da síntese de novo, as células obtêm colesterol pela captação de lipoproteínas plasmáticas circulantes via o LDL-R (Brown *et al*., 1983).

O colesterol vindo da dieta é inicialmente transportado do intestino delgado ao fígado que posteriormente, distribui aos outros tecidos. Por ser insolúvel em água, o colesterol é transportado na circulação pelas lipoproteínas plasmáticas, quilomícrom (QM), VLDL, LDL e lipoproteína de densidade alta (HDL), as quais apresentam tamanho, forma, composição, função e principalmente contribuição para as DCV diferenciados (Nelson e Cox, 2006).

O QM é formado no intestino e transporta o colesterol e os triacilgliceróis vindos da dieta para o tecido adiposo e músculo esquelético. Os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e os ácidos graxos são liberados para os tecidos podendo ser metabolizados ou estocados na forma de triacilgliceróis. Os QM se transformam em remanescentes (despojados de seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol e Apo E e Apo B-48) que são removidos pelo fígado por receptores específicos como o LDL-

R (Brown *et al*., 1983). Por sua vez, os lipídeos de origem hepática são secretados para os outros tecidos em partículas de VLDL que caracteristicamente contém Apo B100 (White *et al*., 1998).

A Apo B100 é sintetizada nos hepatócitos e além de participar da formação das lipoproteínas VLDL, IDL e LDL, funciona como ligante ao receptor de membrana LDL-R. Atualmente tem sido mostrado o importante papel da APO B100 nas DCV, sendo utilizada como preditora de risco cardiovascular, assim como o colesterol ligado à LDL (*Emerging Risk Factors Collaboration et al*., 2009).

A perda de triacilgliceróis converte a VLDL em partículas de densidade intermediária. Estas podem ser absorvidas pelos hepatócitos via LDL-R ou podem ser transformadas em LDL. Em humanos, a LDL é a principal lipoproteína transportadora de colesterol no plasma, providenciando o suprimento deste esterol para os tecidos extra-hepáticos (Walker, 1994) (Figura VI).

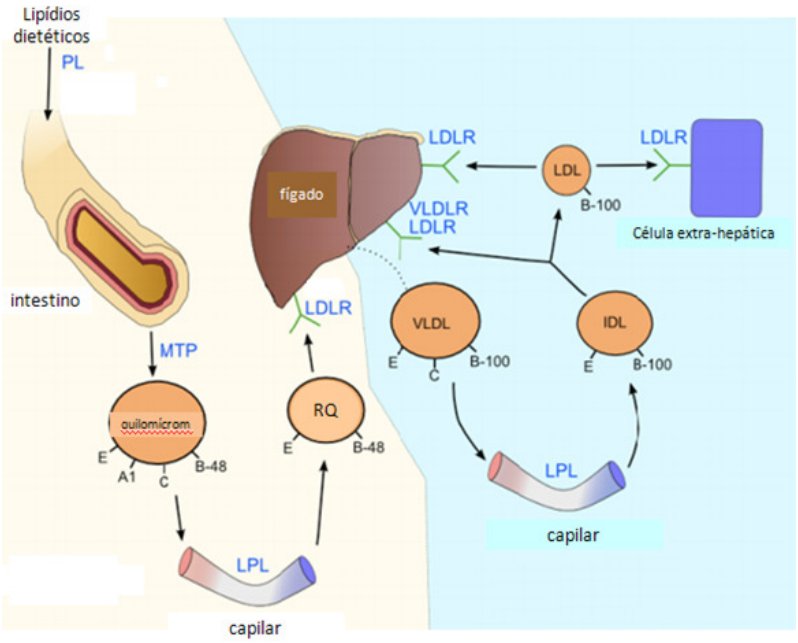


Figura VI – Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Lipase pancreática (PL); Lipase lipoprotéica (LPL); Quilomícron remanescente (RQ); Receptor da lipoproteína de densidade baixa (LDLR); Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL); Lipoproteína de densidade intermediária (IDL); Receptor da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDLR); Lipoproteína de densidade baixa (LDL); Apolipoproteína B100 (B-100); Apolipoproteína E (E); Apolipoproteína A1 (A1); Apolipoproteína C (C); Apolipoproteína B-48 (B-48).
Fonte: adaptado de Daniels *et al.,* 2009.

A LDL fornece colesterol para os tecidos periféricos através da interação com receptores de superfície celular os LDL-R que reconhecem sua Apo B100. Após a

ligação, o complexo LDL-LDL-R sofre endocitose mediada por clatrina (Champe e Harvey, 2002). O colesterol que entra na célula pode ser incorporado nas membranas ou reesterificado para armazenamento. O LDL-R é reciclado e através de vesículas citoplasmáticas retorna à membrana plasmática (Figura VII).

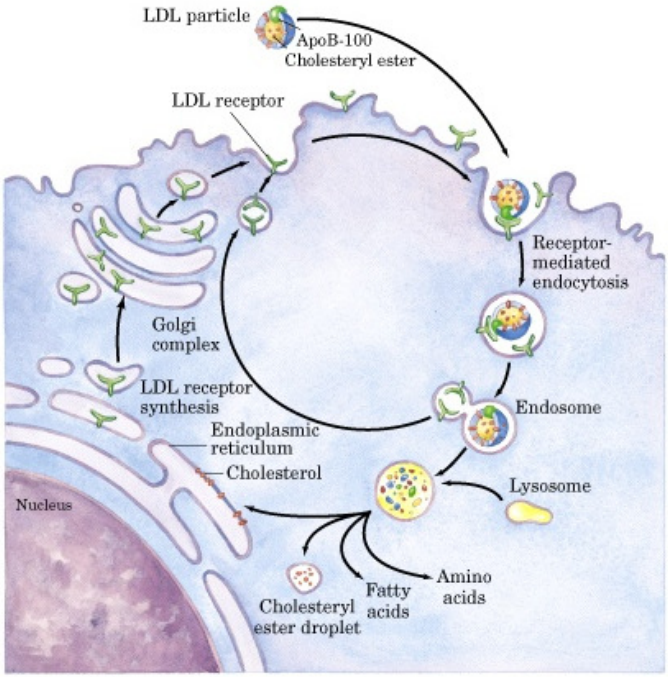


Figura VII – Captação do colesterol por endocitose mediada por receptores. Receptor da lipoproteína de densidade baixa (LDLR); Lipoproteína de densidade baixa (LDL); Apolipoproteína B100 (B-100).
Fonte: Nelson e Cox, 2006.

Quando a célula está repleta de colesterol ocorre redução na expressão do LDL-R na membrana plasmática, tendo um aumento na concentração de LDL na circulação. Em altas concentrações a LDL pode acumular no espaço subendotelial arterial e sofrer modificações químicas, como por exemplo, oxidação por espécies reativas de oxigênio, tornando-se LDL modificada, as quais são atraídas para a íntima das artérias (Gant e Heinecke, 2001). Macrófagos reconhecem essas partículas de LDL modificadas por meio de receptores *scavengers* e por não apresentarem a regulação do colesterol por *feedback* o acumulam, originando as células espumosas responsáveis pela primeira manifestação da placa aterosclerótica (Kunjathoor *et al*., 2002).

Para reduzir este acúmulo de colesterol na corrente sanguínea, o fígado produz e libera a HDL, lipoproteína responsável pelo transporte reverso do colesterol.

Primeiramente, a enzima lecitina-colesterol aciltransferase presente na superfície da HDL esterifica o colesterol livre que está em excesso no plasma e nas células. Este colesterol esterificado é armazenado dentro da HDL e conduzido para o fígado, onde será reciclado ou eliminado (Jonas, 2000; Shah *et al*., 2001). A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese tais como, a proteção da LDL à oxidação por espécies reativas de oxigênio, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e redução na liberação de citocinas inflamatórias (Kontush e Chapman, 2006; Mineo *et al*., 2006; Rye *et al*., 2009).

Os níveis intracelulares do colesterol são controlados por mecanismos que operam ao nível transcricional e pós-transcricional (Brown e Goldstein, 1997; Goldstein e Brown, 1990). Ao nível transcricional, a síntese do colesterol é regulada por fator de transcrição ligado à membrana do retículo endoplasmático, denominado proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol - 2 (SREBP-2) (Brown e Goldstein, 1997).

O SREBP-2 depois de traduzido é inserido à membrana do retículo endoplasmático, onde seu domínio regulatório C-terminal se liga à porção C-terminal da proteína ativadora de clivagem do SREBP denominada SCAP (Horton *et al.,* 2002). Enquanto associado com o SREBP, a SCAP se liga à outra proteína ligada ao retículo endoplasmático a INSIG (Yang *et al.,* 2002). Interações entre SCAP e INSIG mantêm o complexo protéico firmemente conectado ao retículo endoplasmático. Esta interação é sensível ao colesterol que então age como um sensor deste sistema (Brown *et al.,* 2002).

Em condições de abundância de colesterol, os domínios transmembrana da SCAP se ligam ao colesterol causando uma mudança conformacional no domínio citosólico desta, resultando no aumento da afinidade pela INSIG (Brown *et al.,* 2002). Na ausência de colesterol a conformação da SCAP não favorece sua ligação à INSIG deixando o complexo SREBP/SCAP livre para deixar o retículo endoplasmático em vesículas e migrar para o Golgi (Goldstein *et al.,* 2006). Uma vez no Golgi, a porção N-terminal do SREBP é clivada por duas proteases site-1 e site-2 (Nohturfft *et al.,* 2000).

Após clivagem o fator de transcrição SREBP migra para o núcleo e se liga a elementos de resposta a esterol localizados na região promotora de genes alvos relacionados à síntese do colesterol, como o da HMG CoA-R e do LDL-R, ativando a transcrição desses genes e promovendo um aumento na concentração intracelular do colesterol. O SREBP nuclear pode ser ubiquitinado e degradado pelo proteassoma 26S (Rudling, 1992) (Figura VIII).

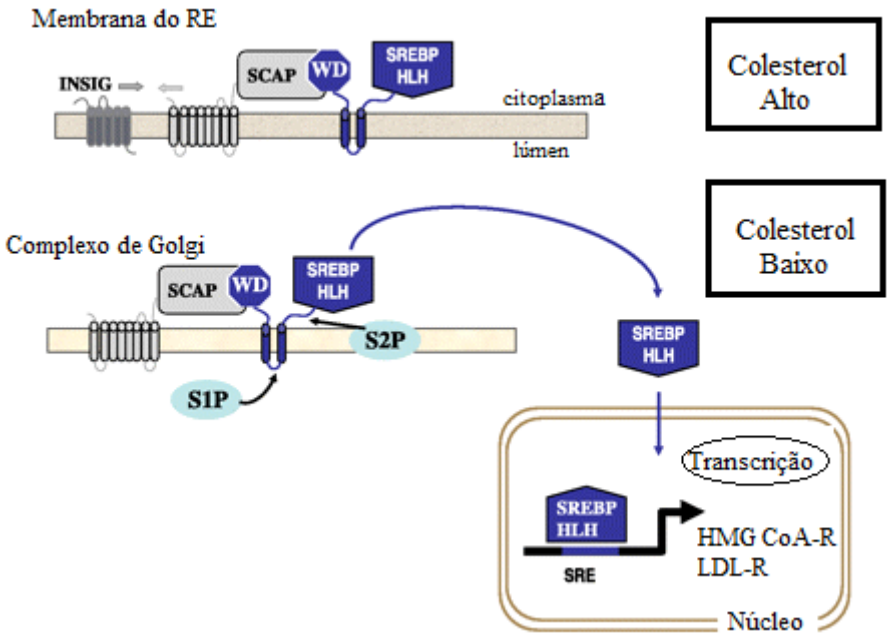


Figura VIII – Ativação da Proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol. Proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol (SREBP); Proteína ativadora de clivagem (SCAP); Gene 1 induzido por insulina (INSIG); Protease site-1 (S1P); Protease site-2 (S2P); Elementos de resposta à esterol (SER); 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG CoA-R); Receptor da lipoproteína de densidade baixa (LDLR).
Fonte: adaptado de http://flipper.diff.org/app/pathways/info/473.

A remoção do excesso de colesterol do corpo é imprescindível para a manutenção da sua homeostase. Neste sentido o fígado regula os processos de eliminação deste esterol, sendo a principal via de eliminação do colesterol a formação e secreção de ácidos biliares. A bile é muito importante para o processo de formação de micelas e emulsificação das gorduras no processo de digestão e absorção dos lipídeos da dieta. Nela o colesterol pode ser eliminado de forma direta como colesterol livre ou pela sua conversão em ácidos biliares, proporcionando assim um meio de eliminação por meio das fezes.

A formação de ácidos biliares a partir do colesterol é catalisada pela enzima colesterol-7α-hidroxilase (CYP7A1). A eliminação de forma direta do colesterol na bile é controlada pelos transportadores ABCG5 e ABCG8- *ATP-binding cassette subfamily G transporters* (Russell e Setchell, 1992). Estes transportadores são expressos exclusivamente na membrana apical dos hepatócitos e no intestino e formam um heterodímero funcional responsável pelo efluxo do colesterol e fitosteróis na bile (Graf

et al., 2003) (Figura IX). Yu *et al*. (2002) mostraram que o aumento na expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 no fígado e no intestino delgado de camundongos promoveu um aumento significativo na secreção de colesterol na bile e uma redução na absorção intestinal deste esterol.

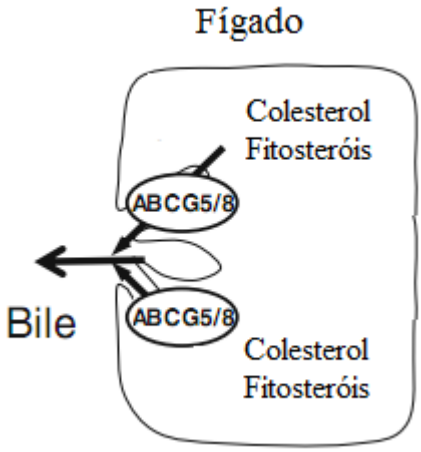


Figura IX – Eliminação do colesterol livre e de fitosteróis na bile. ABCG5 e ABCG8- *ATP-binding cassette subfamily G transporters*
Fonte: adaptado de Kusuhara e Sugiyama, 2007.

2.3 - Adipocinas

Á caracterização do tecido adiposo, fundamentalmente como um órgão de armazenamento de energia, vem sendo acrescida, nos últimos 10 anos, propriedades distintas. Produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocinas, ele apresenta importante função endócrina mantendo intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos (Mohamed-Ali *et al*., 1998; Funahashi *et al*., 1999).

As adipocinas são liberadas pelos adipócitos e outras células presentes no tecido adiposo, devido à diversidade estrutural e a variedade de funções já identificadas, pode-se dizer que elas compreendem desde proteínas relacionadas ao sistema imune – TNF-α e interleucina-6 (IL-6) –, a fatores de crescimento – fator transformador de crescimento-β – e proteínas da via alternativa do complemento – adipsina. Há ainda, adipocinas envolvidas na regulação da pressão – angiotensinogênio–, da coagulação sanguínea – inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1)–, da homeostase glicêmica e da angiogênese – adiponectina, resistina, visfatina, leptina–, além de várias outras (Peelman *et al*., 2004; Bullo-Bonet *et al*., 1999; Ouchi *et al*., 1999; Yudkin *et al*., 2000; Shuldiner *et al*., 2001).

Disfunções no tecido adiposo como, hipertrofia ou hiperplasia, promovem um desequilíbrio nos níveis séricos de algumas adipocinas, o que tem sido sugerido ser o elo entre adiposidade, síndrome metabólica e DCV (Hsueh e Law, 2003; Lyon *et al*., 2003; Rajala e Scherer, 2003). Leptina, TNF-α, IL-6, PAI-1, resistina, proteína-C reativa e angiotensinogênio possuem efeito pró-inflamatório e alterações na secreção dessas adipocinas estão relacionadas à gênese do processo fisiopatológico das DCV, por alterar a função endotelial. Por outro lado, a adiponectina por apresentar propriedades de proteção à injúria vascular, quando em altas concentrações no soro inibe a formação da lesão aterosclerótica (Havel, 2004; Kubota *et al*., 2002) (Figura X).

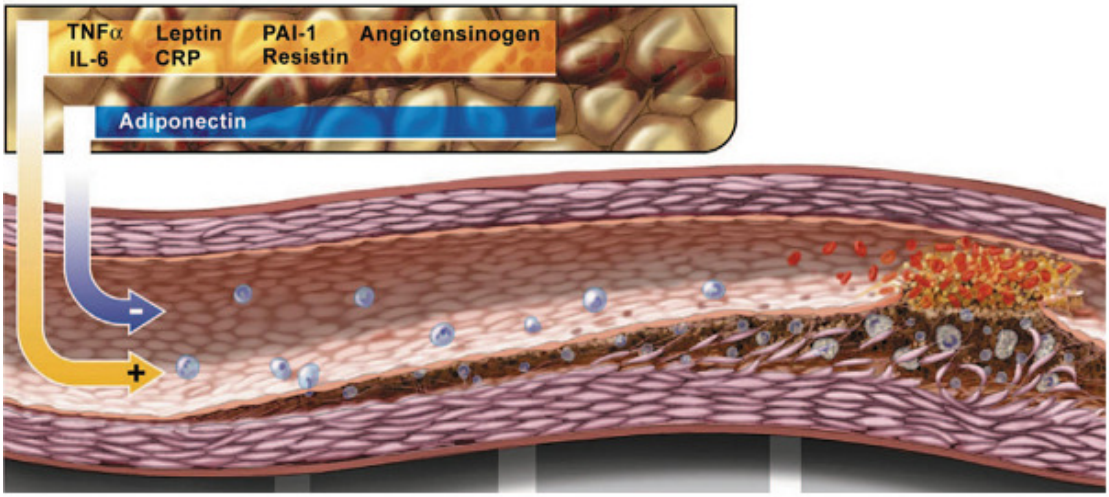


Figura X – Contribuição de adipocinas pró e antiinflamatórias para a disfunção do endotélio e consequente formação da placa de ateroma. Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α); Interleucina-6 (IL-6); Proteína-C reativa (CRP); Inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1).
Fonte: adaptado de Lau *et al.,* 2005.

2.3.1 - Associação entre leptina, adiponectina, TNF-α e DCV

A leptina (do grego Leptos = magro) é uma proteína de 167 aminoácidos, produto do gene *Ob*, que se expressa principalmente no tecido adiposo branco. O gene *Ob* está presente, bem como sua sequência está bastante conservada, em diversas espécies de vertebrados, incluindo o rato e o homem. Os teores circulantes de leptina são proporcionais à massa adiposa, apresentando-se elevados em animais obesos (Halaas *et al*., 1995). A leptina também é produzida por vasos sanguíneos e cardiomiócitos, os quais expressam receptores específicos para essa proteína (Beltowski, 2006).

Esta adipocina é um importante regulador do balanço energético, tendo a região do cérebro associado ao controle central do balanço energético seu maior alvo de ação (Polito *et al*., 2000). Vários outros efeitos fisiológicos vêm sendo atribuídos à leptina, entre eles, envolvimento na função reprodutiva (Cioffi *et al*., 1996), hematopoiese (Cioffi *et al*., 1996), resposta imune (Lord *et al*., 1998), formação óssea (Ducy *et al*., 2000) e angiogênese (Sierra-Honigmann *et al*., 1998). Em humanos, altas concentrações de leptina no soro estão associadas a um maior risco de infarto do miocárdio e calcificação da artéria coronária, mesmo na ausência de obesidade e outros tradicionais fatores de risco das DCV (Iribarren *et al*. 2007; Sierra-Johnson *et al*. 2007).

Agindo sinergicamente com outros mediadores inflamatórios, a leptina possui um importante papel na formação da placa de ateroma (Karaduman *et al*., 2006). O mecanismo proposto para seu efeito pró-aterogênico é a estimulação da proliferação e hipertrofia de células musculares lisas vasculares e endoteliais, da agregação plaquetária e do recrutamento de monócitos para a região íntima das artérias (Yamagishi *et al.* 2001; Beltowski, 2006; Singh *et al*., 2007).

Além disso, a leptina diminui a atividade anti-aterogênica e antioxidante da enzima paraoxonase (Beltowski, 2006). A paraoxonase possui a função de prevenir a oxidação da LDL, da HDL, bem como hidrolisar fosfolipídios oxidados e hidroperóxidos presentes na LDL modificada (Aviram *et al*., 1998). Além disso, sob condições de hiperglicemia uma hiperleptinemia promove o acúmulo de colesterol em macrófagos (O'Rourke *et al*., 2002). Estas ações podem explicar a associação epidemiológica existente entre elevados níveis de leptina e risco cardiovascular.

Em meados de 1990, mais uma proteína expressa exclusivamente pelo tecido adiposo, demonstrando importantes efeitos sobre o metabolismo, foi identificada e denominada de adiponectina (Maeda *et al*., 1996). Em contraste à maioria das proteínas secretadas pelos adipócitos, sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (Ouchi *et al*., 1999).

A adiponectina exerce seus efeitos biológicos por meio de dois receptores, os quais são expressos prevalentemente no músculo esquelético (Receptor 1) e no fígado (Receptor 2), ambos receptores também são expressos em células endoteliais e sua sinalização intracelular é mediada pela ativação da proteína adenosina monofosfato quinase (AMPK), um sensor energético que regula o metabolismo celular (Kadowaki e Yamauchi, 2005).

Efeitos anti-aterogênicos têm sido atribuídos a essa adipocina e concentrações plasmáticas reduzidas de adiponectina se associam significantemente com risco de doenças cardiovasculares em humanos (Funahashi *et al*., 2004). Em camundongos *knockout* para Apo E (modelo de aterosclerose) o aumento na expressão de adiponectina promoveu uma redução das lesões ateroscleróticas. Enquanto camundongos *knockout* para adiponectina apresentaram desordens inflamatórias vasculares com espessamento das artérias e aumento na proliferação de células musculares lisas (Kadowaki e Yamauchi, 2005).

A adiponectina circulante parece proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose, sendo considerado um hormônio antagonizador no desenvolvimento da placa de ateroma e na inflamação vascular (Goldstein *et al*., 2004). Sua ação anti-inflamatória e anti-aterogência se dá pela capacidade de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, por inibir expressão dos receptores *scavenger* em macrófagos e consequente formação das células espumosas e por inibir a expressão de moléculas de adesão, suprimindo, inclusive, a expressão de TNF-α induzida por essas moléculas de adesão (Ouchi *et al*., 2001; Goldstein *et al*., 2004; Fantuzzi, 2005). Além disso, a adiponectina pode inibir as ações do TNF-α por alterar a cascata de sinalização inflamatória mediada pelo fator nuclear κβ (Wang *et al*., 2005) (Figura XI).

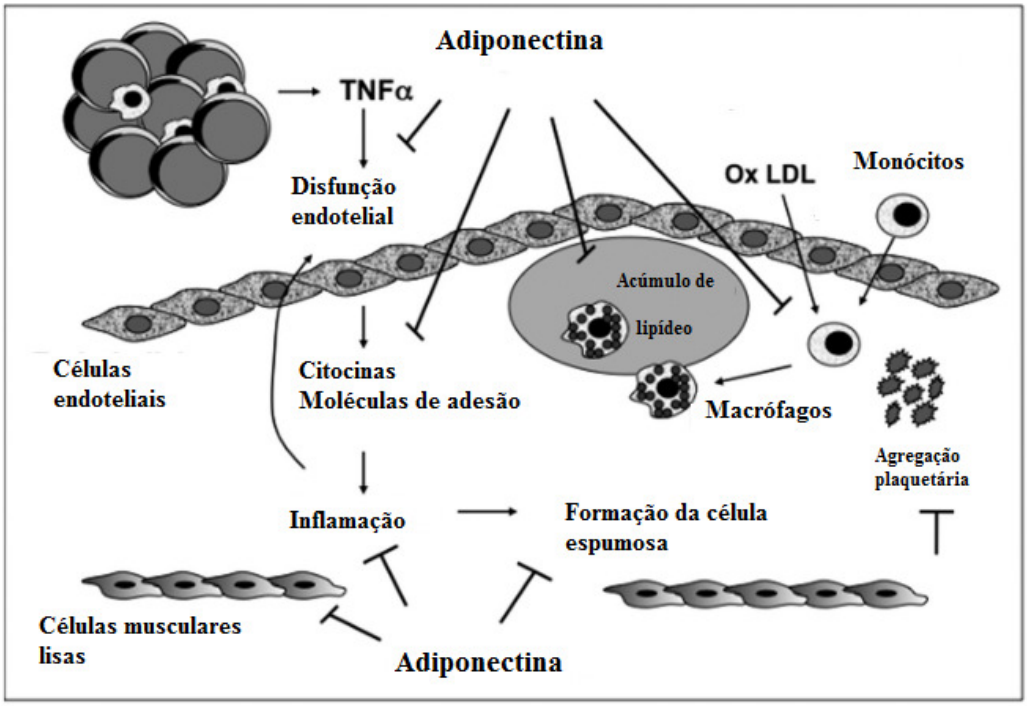


Figura XI – Efeitos anti-aterogênicos da adiponectina. Adiponectina reduz a inflamação ao diminuir a migração e proliferação de moléculas de adesão e prevenir os efeitos deletérios do TNF-α sobre o endotélio vascular. Além disso, previne o recrutamento de macrófagos e a formação das células espumosas. Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); Lipoproteína de densidade baixa oxidada (OxLDL).
Fonte: adaptado de Gustafson, 2010.

O tecido adiposo produz várias citocinas pró-inflamatórias incluindo-se entre estas, TNF-α. As primeiras informações acerca das ações biológicas associadas ao TNF-α definiam um envolvimento na resistência à insulina, perda de peso corporal e

anorexia. Entretanto, investigações mais recentes têm revelado vínculo molecular mais estreito entre o TNF-α e a obesidade, verificando-se que a expressão de TNF-α está aumentada na obesidade e diminui com a perda de peso corporal, melhorando a sensibilidade à insulina (Fruhbeck *et al*., 2001). O TNF-α associado à obesidade além de ser produzido pelos adipócitos é, principalmente secretado por macrófagos acumulados no tecido adiposo de obesos (Xu *et al*., 2002; Weisberg *et al*., 2003).

O TNF-α é uma citocina multifuncional, implicada em inflamação, apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas, como IL-1 e IL-6, e indução de resistência à insulina. Também está envolvida no processo inflamatório da aterogênese atuando no processo de formação da placa de ateroma e na disfunção do endotélio (Mateo *et al*., 2007; Goodwin *et al*., 2007). Ele participa da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na região intima das artérias e no aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Seus efeitos são mediados pelo fator de transcrição nuclear k-β, que modula uma série de mudanças inflamatórias no tecido vascular (Lyon *et al*., 2003).

2.4 - Açaí (*Euterpe oleracea* Martius)

Euterpe oleracea Martius é uma palmeira que alcança em torno de 15 a 20 m de altura e 12 a 18 cm de diâmetro. É uma árvore que prefere os terrenos alagados e áreas úmidas, por isso sua ocorrência é mais frequente às margens dos rios. É encontrada principalmente na região norte do Brasil, nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá, e estende-se para as Guianas e Venezuela. Dela são extraídos o palmito e o fruto para o consumo alimentar (Lorenzi *et al*., 1996; Souza *et al*., 1996).

Seu fruto é popularmente conhecido como açaí, é redondo e pesa cerca de dois gramas. Somente 17% dele são comestíveis (polpa com casca), o restante representa o caroço, contendo a semente oleaginosa. A cor do fruto maduro é púrpura a quase preta (Oliveira *et al*., 2000) (Figura XII). Os frutos podem ser obtidos por todo o ano, com alta estação entre agosto a dezembro onde apresentam melhor qualidade organoléptica (Rogez, 2000). Por meio do despolpamento, manual ou mecânico, obtêm-se o suco conhecido como "vinho do açaí" consumido em uma variedade de bebidas e preparações alimentares, como cremes, licor, geléia, mingau, sorvetes e doces (Souza *et al*., 1996).

Figura XII – Palmeira *Euterpe oleraceae* Martius e o fruto açaí.
Fonte: Nóbrega *et al*., 2009.

O açaí é um fruto tipicamente brasileiro. Até pouco tempo atrás era um patrimônio exclusivo dos paraenses e, em menor grau, de outros estados da Amazônia. Atualmente, é consumido em quase todos os estados brasileiros e alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China o que gerou, por parte das empresas alimentícias, novas formas de comercialização como, polpa, suco, cápsulas e pó instantâneo (Silva, 2002; Schreckinger *et al*., 2010). O açaí também tem sido utilizado pelas indústrias de cosméticos.

De acordo com *W&G Global Trade*, a comercialização atual do açaí no Brasil foi estimada em US$ 45 milhões por ano. As exportações aproximam de 1000 toneladas por mês, principalmente para os Estados Unidos, Japão, Itália e Holanda. O principal produto de exportação é o suco de açaí misturado com outras frutas como acerola (*Malpighia emarginata*) e guaraná (*Paullinia cupana*) (Food Biz, 2009). O interesse econômico e social pelo açaí está associado às suas características nutricionais, principalmente ao alto conteúdo de antocianinas e à sua propriedade antioxidante. Além do gosto e sabor exóticos (Rogez, 2000; Lichtenthäler *et al*., 2005).

Ao realizar uma pesquisa no site de busca "Google" utilizando as palavras "açaí e antioxidante" têm-se 600.000 resultados (acessado, fevereiro de 2012). É interessante perceber que além de propriedades antioxidantes, vários outros benefícios para a saúde estão relacionados com este fruto. Sua grande popularidade mereceu em 2009 uma publicação no *Journal of the American Dietetic Association* escrito por Wendy Marcason**,** *RD, da American Dietetic Association's Knowledge Center* (Marcason, 2009). De acordo com o autor o açaí ganhou popularidade na América do Norte após ser promovido por Nicholas Perricone, MD, como "Superfood for Age-Defying Beauty" no programa de televisão "The Oprah Winfrey Show''. O autor também ressaltou que o açaí estava sendo comercializado como suplemento dietético e os apelos para a venda incluiam, além de efeito antioxidante, potencial ajuda no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e perda de peso. Ele finalizou chamando atenção para a necessidade da comprovação científica dos efeitos deste fruto.

As primeiras publicações científicas relacionadas ao açaí datam de 2004 e em média dois artigos eram publicados por ano. A partir de 2008, observa-se o crescente interesse da comunidade científica por este fruto tendo em média dez publicações anualmente (Pubmed, acessado em maio de 2012). A capacidade antioxidante e outras bioatividades do açaí foram estudadas em cultura de células, modelos animais e

humanos. Ensaios *in vitro* e realizados em modelos experimentais mostraram que este fruto apresenta ação antioxidante, atividade antiinflamatória, pró-apoptótica e hipocolesterolemiante (Mertens-Talcott *et al*., 2008; Matheus *et al.*, 2006; Del Pozo-Insfran *et al*., 2006; Souza *et al*., 2010).

Schauss *et al.* (2006a) demonstraram a capacidade antioxidante da polpa de açaí utilizando diferentes métodos de avaliação e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A capacidade antioxidante total foi determinada por uma série de ensaios da capacidade de absorbância do radical oxigênio por meios fluorescentes, incluindo hidrofílico, lipofílico, capacidade de eliminar o radical peroxinitrito e capacidade de eliminar o radical hidroxila. Além desses métodos, foram realizadas a avaliação da capacidade de eliminar o ânion superóxido, a avaliação da capacidade antioxidante total e a inibição na formação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de doadores humanos saudáveis Os resultados encontrados mostraram uma significante atividade contra o ânion superóxido e contra o radical peroxil. A atividade em eliminar os radicais peroxinitrito e hidroxila foi considerada moderada. Na avaliação antioxidante total (TAO), os componentes antioxidantes do açaí foram diferenciados em "ação demorada" e "ação rápida". Os componentes de "ação demorada" incluem antioxidantes orgânicos complexos (como os polifenóis) e foram mensurados em 30 minutos, os de "ação rápida" são antioxidantes "semelhantes à vitamina C" mensurados em 30 segundos. A combinação desses valores resulta na TAO. Os resultados obtidos para TAO na polpa de açaí mostraram claramente que a capacidade dos antioxidantes de "ação demorada" é muito mais forte do que os componentes de "ação rápida". O tratamento de neutrófilos humanos incubados anteriormente com o peróxido de hidrogênio com a polpa de açaí resultou em significante redução na formação de espécies reativas de oxigênio.

Mertens-Talcott *et al.* (2008) estudaram a concentração sérica de antocianinas e ácido úrico, a geração de espécies reativas e a capacidade antioxidante no plasma e urina de humanos após o consumo da polpa e do suco clarificado de açaí. Os doze indivíduos participantes desse estudo foram voluntários, saudáveis, não-fumantes com faixa de idade entre 21-31 anos (média de 27,2) e faixa de índice de massa corporal de 17,8 – 25,9 (média 24,6). Os indivíduos receberam uma dose de 7 mL da polpa ou do suco clarificado de açaí por Kg de peso, após jejum noturno. Amostras de sangue eram recolhidas 0.5, 1, 2, 4, 6 e 12 horas após o consumo e amostra de urina nos períodos de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 e 12-24 horas. Os resultados obtidos mostraram que a concentração

de antocianinas no soro dos indivíduos foi significativamente elevada após o consumo de ambos os produtos. A concentração de antocianinas no soro dos participantes após o consumo da polpa de açaí apresentou uma concentração máxima de 2321ng/L no tempo de 2.2 horas. Já após o consumo do suco clarificado a concentração de antocianinas foi de 1138 ng/L no tempo de 2.0 horas. Um aumento na capacidade antioxidante total sérica também foi encontrado após o consumo de açaí, sendo mais pronunciado após a ingestão da polpa. Portanto, antocianinas do açaí são absorvidas e apresentam efeito antioxidante no plasma de humanos após o consumo da polpa e/ou do suco clarificado.

Guerra *et al*. (2011) mostraram que a suplementação da dieta com a polpa de açaí atenuou o estresse oxidativo de ratos diabéticos, promovendo redução hepática na concentração de marcadores da peroxidação lipídica, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e aumento na concentração de glutationa total, peptídeo que participa da eliminação do peróxido de hidrogênio.

Com relação à propriedade antiinflamatória, foi demonstrado que o açaí exerceu forte ação inibitória na atividade das cicloxigenases (COX 1 e COX 2) (Schauss *et al.*, 2006a). Polifenóis presentes no açaí induziram a mortalidade de células leucêmicas HL-60 através de mecanismos pró-apoptóticos, como a ativação de caspase-3 (Del Pozo-Insfran *et al*., 2006).

Além desses efeitos, estudos mostraram que o açaí promoveu uma melhora nos fatores que contribuem para o desenvolvimento das DCV. Elevados níveis séricos de colesterol total e da fração não-HDL de ratas hipercolesterolêmicas foram significativamente reduzidos pela suplementação dietética com a polpa de açaí 2% durante seis semanas. A atividade da enzima paraoxonase também foi aumentada em ratas hipercolesterolêmicas que receberam a polpa de açaí (Souza *et al*., 2010). A administração do extrato obtido da semente do açaí a camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em lipídeos por 12 semanas promoveu uma redução nos níveis séricos de dialdeído-malônico, triacilgliceróis, colesterol total e glicose. Além disso, proporcionou uma redução no peso corporal (de Olveira *et al*., 2010).

Xie *et al*. (2011) mostraram que o suco de açaí promoveu um aumento na concentração sérica de HDL e uma redução na área lesionada da aorta de camundongos hiperlipidêmicos deficientes de apoE. Em humanos com sobrepesos, índice de massa corporal entre 25,0 – 29,9 Kg/m^2, o consumo diário de 200 mL da polpa de açaí

promoveu uma melhora no perfil de lipídeos no soro com, redução do colesterol total e das frações, LDL e VLDL, e atenuou a glicemia pós-prandial (Udani *et al*., 2011).

Diante dos estudos científicos realizados com o açaí podemos sugerir a sua importante função na promoção da saúde e seu valor como alimento funcional, sendo importante destacar que a maioria dos autores relaciona os potenciais efeitos deste fruto à sua composição química. Os constituintes químicos predominantes no açaí são os compostos fenólicos. Segundo Schauss *et al*. (2006b) dentre os fenólicos presentes neste fruto destacam-se os flavonóides, principalmente a classe das antocianinas. Cinco antocianinas foram identificadas no açaí, sendo a cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3–rutinosídeo as mais predominantes. Doze outros flavonóides também foram identificados, tais como, epicatequina, catequina, homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina deoxihexose.

Schauss *et al*. (2006b) também mostraram que este fruto apresenta quantidades bastante expressivas de ácidos graxos insaturados e fitosteróis. Em 100g de peso seco de açaí, 32,5g são gorduras (saturadas e insaturadas). Dessas gorduras totais, 8,5g estão representadas por ácidos graxos saturados, destacando-se a presença do ácido palmítico (C16:0) e, 24g (74%) estão representadas por ácidos graxos insaturados, destacando o ácido oléico (18,3g) e o ácido linoléico (4,1g). Dentre os fitosteróis presentes no açaí, destacam-se o β-sitosterol, campesterol e estigmasterol.

O fruto do açaí também apresenta um potencial relevante como fonte de fibra alimentar, possuindo valores superiores aos relatados para morango, figo e goiaba (Ramulu e Udayasekhara Rao, 2003). Sanabria e Sangronis (2007) ao estudar a composição química da polpa do açaí proveniente de duas colheitas do ano de 2005, mostraram que nas duas colheitas (fevereiro / julho) o conteúdo de fibra alimentar foi bastante alto. É importante ressaltar que o açaí contém aproximadamente 13g de proteína/100g, é fonte de minerais como, potássio, magnésio, cálcio, fósforo e sódio, e vitaminas E e B1(Rogez, 2000).

Diante do exposto, nós formulamos a hipótese que a polpa de açaí, devido sua composição fitoquímica e de nutrientes, poderia modular a expressão de genes que regulam a homeostase hepática do colesterol conduzindo a uma redução sérica deste esterol. Além disso, resolvemos estudar se este fruto poderia alterar a concentração sérica de adipocinas.

Capítulo 3 - Objetivos

3.1 - Objetivo geral

Investigar o efeito da polpa de açaí sobre fatores envolvidos no equílibrio do colesterol hepático e sobre a concentração de adipocinas em ratos com hipercolesterolemia induzida por dieta.

3.2 – Objetivos específicos

Avaliar o efeito da dieta hipercolesterolemiante e da polpa de açaí sobre:

I. O ganho de peso, ingestão alimentar e excreção fecal dos animais;
II. Marcadores bioquímicos séricos da função hepática;
III. Perfil lipídico sérico;
IV. Gordura total e colesterol total no fígado;
V. Gordura total e colesterol total excretado nas fezes;
VI. Expressão de genes que regulam a homeostase hepática do colesterol;
VII. Concentração sérica das adipocinas: leptina, adiponectina e TNF-α.

Capítulo 4 - Material e Métodos

4.1 - Açaí

Foi utilizada polpa de açaí da empresa *Icefruit* Comércio de Alimentos LTDA, São Paulo, Brasil (*Icefruit* Polpa de Açaí Médio, lote: 01/ fabricado: 14/01/2011). Obtida no comércio local da cidade de Ouro Preto. Toda a quantidade de polpa de açaí necessária para o desenvolvimento do projeto foi adquirida em uma única remessa de um mesmo fornecedor garantindo a homogeneidade da polpa durante todo o experimento. De acordo com o fabricante, a polpa de açaí é pasteurizada, embalada a vácuo e mantida à $^{-}18^{o}$C. Também não contêm corantes e conservantes.

Determinou-se a composição bromatológica da polpa utilizada, onde os teores de umidade, proteínas, gorduras totais, cinzas, carboidratos e fibras foram analisados conforme os procedimentos descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Brevemente, a quantificação da umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105ºC, o teor de proteínas pelo método de semimicro *Kjedahl*, utilizando-se o fator de conversão 6,25, gorduras totais foram extraídas com éter de petróleo em extrator de *Soxhlet,* o teor de cinzas foi determinado por meio da calcinação da amostra em mufla entre 550 a 600 ºC por seis horas e a determinação de fibra alimentar total pelo método enzimático-gravimétrico. O conteúdo de carboidratos foi calculado por diferença. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. Verificou-se que a polpa de açaí utilizada possuia um teor de umidade de 90%, e que em cada 100 g de peso seco obteve-se 7,0 g de proteína, 42 g de gorduras totais, 6,9 de cinzas, 1,1 g de carboidrato e 43 g de fibras totais.

4.2 - Animais

Foram utilizados 32 ratas *Fischer*, albinas com aproximadamente 60 dias de idade e peso médio de 140g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais dispostas em ambiente arejado com controle da temperatura, umidade e luminosidade. Durante o experimento, as dietas e água foram oferecidas *ad libitum*. O protocolo experimental relativo ao uso dos animais

foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP, certificado n° 2010/23).

4.3 - Dietas

Foi utilizada dieta padrão AIN-93M, contendo 4% óleo de soja (Reeves *et al*., 1993) ou dieta hipercolesterolemiante com 25% de óleo de soja e 1% de colesterol, suplementadas ou não com polpa de açaí (Tabela I).

A polpa de açaí era descongelada e adicionada à dieta. Para cada quilo de dieta preparada foram utilizados 200 mL da polpa de açaí, 20g de açaí foram adicionados a cada quilo de dieta. Os teores de óleo e colesterol da dieta hipercolesterolemiante foram definidos a partir do trabalho de Turbino-Ribeiro *et al*. (2003) e adaptados à dieta AIN-93M.

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em freezer. A composição das dietas experimentais está descrita na Tabela I. A Tabela II demonstra as calorias provenientes dos macronutrientes das dietas utilizadas.

Tabela I - Composição das dietas experimentais (g / Kg de dieta).

Nutrientes	Dieta Padrão	Dieta Padrão + Açaí	Dieta Hipercoles-terolemiante	Dieta Hipercoles-terolemiante + Açaí
Caseína[1]	140,0	140,0	140,0	140,0
Amido Milho	722,5	702,5	502,5	482,5
Óleo de Soja[2]	40,0	40,0	250,0	250,0
Colesterol[3]	0,0	0,0	10,0	10,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mist. Minerais[4]	35,0	35,0	35,0	35,0
Mist. Vitaminas[5]	10,0	10,0	10,0	10,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Açaí[6]	0,0	20,0	0,0	20,0

[1]Isofar ® (Rio de Janeiro, Brasil), contém 85% de proteína.
[2]Brasil Foods (São Paulo, Brasil).
[3]Vetec Química Fina Ltd. (Rio de Janeiro, Brasil).
[4]Mistura de minerais (expresso por g/kg da mistura): $CaCO_3$: 357; KH_2PO_4: 250; NaCl: 74; K_2SO_4: 46.6; citrato de potássio: 28; MgO: 24; citrato ferroso: 6.06; $ZnCO_3$: 1.65; $MnCO_3$: 0.63; $CuCO_3$: 0.3; KI: 0.01; Na_2SeO_4: 0.01; $(NH_4)6MoO^{24}.4H_2O$: 0.00795 (Reeves *et al*., 1993).
[5]Mistura de vitaminas (expresso por IU ou g/kg da mistura): Niacina: 3.0; Pantotenato de cálcio: 1.6; Piridoxina HCl: 0.7; Tiamina HCl: 0.6; Riboflavina: 0.6; Ácido Folico: 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: quantidade suficiente para 1Kg (Reeves *et al*., 1993).
[6]Conteúdo energético da polpa de açaí: 82 kcal/20g.

Tabela II – Caloria proveniente dos macronutrientes das dietas experimentais (Kcal / Kg de dieta).

Dieta Experimental	Carboidrato (Kcal)	Proteína (Kcal)	Lipídeo (Kcal)	Valor Calórico Total (Kcal)[1]
Padrão	2890	560	360	3810
Padrão + Açaí	2810,9	565,6	435,6	3812
Hipercolesterolemiante	2010	560	2250	4820
Hipercolesterolemiante + Açaí	1930,9	565,6	2325,6	4822

[1]Fatores de conversão: carboidrato 4 kcal/g, proteína 4 kcal/g, lipídeo 9 kcal/g.

4.4 - Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo C recebeu dieta padrão (n=16) e grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiante (n=16). No início do experimento, os grupos apresentavam uniformidade quanto ao peso e a concentração sérica de colesterol total (CT).

Para dosagem de CT no início do experimento, os animais foram deixados 10 horas em jejum e rapidamente anestesiados com isoflurano posteriormente, 0,5 mL de sangue foram coletados do plexo venoso retro ocular utilizando uma pipeta de *Pasteur* contendo heparina. O sangue foi recolhido em tubos de polipropileno (com 1,5 mL de capacidade), centrifugado a 1500 g por 15 minutos e o plasma coletado e utilizado para a dosagem de CT inicial.

Após 14 dias de experimento uma nova dosagem de CT foi realizada (conforme descrito anteriormente) e os grupos foram subdivididos aleatoriamente. Do grupo C, 8 animais continuaram a receber a dieta padrão e 8 passaram a receber a mesma dieta padrão suplementada com a polpa de açaí 2% (grupo CA). Do grupo H, 8 ratas continuaram a receber a dieta hipercolesterolemiante e 8 começaram a receber a mesma dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí 2% (grupo HA) (Figura XIII). Os quatro grupos experimentais receberam seus respectivos tratamentos por 42 dias e durante todo o experimento os animais foram pesados semanalmente. Diariamente era realizado o controle da ingestão alimentar e o conteúdo fecal eliminado pelos animais era recolhido e pesado.

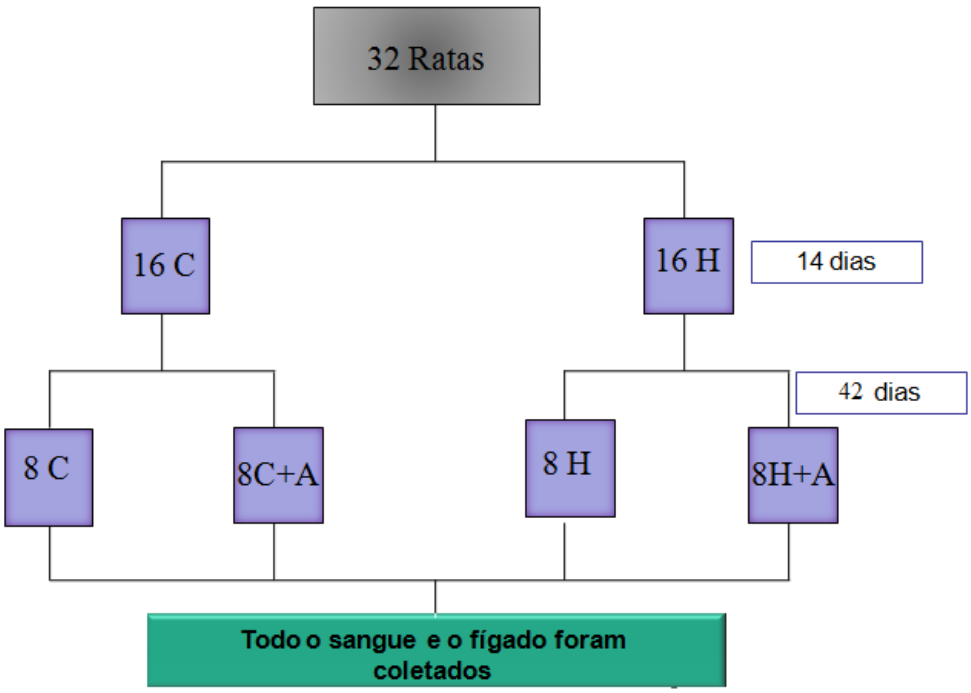


Figura XIII – Delineamento Experimental. Grupo que recebeu dieta padrão (C); Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí 2% (CA); Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante (H); Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí 2% (HA).

Ao final dos 56 dias experimentais os animais foram deixados 10 horas em jejum e após anestesia com isoflurano foram eutanasiados. O sangue foi coletado por incisão da artéria braquial e recolhido em tubos de polipropileno (com 2,0 mL de capacidade) centrifugado a 1.5000 g por 15 minutos e o soro coletado. O soro foi devidamente aliquotado e estocado a -80°C para a posterior realização das dosagens bioquímicas.

Os fígados dos animais foram extraídos, lavados em solução salina, pesados, imersos em nitrogênio líquido e imediatamente estocado a -80°C para posteriores análises. O conteúdo fecal foi removido do ceco dos animais, seco em estufa ventilada a 60°C, macerado, pesado e utilizado para extrair a gordura total.

4.5 - Dosagens dos parâmetros bioquímicos séricos

Realizaram-se dosagens bioquímicas séricas utilizando kits Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil): Alanina Aminotransferase (ALT) (74-4/30), Aspartato Aminotransferase (AST) (75-4/30), Colesterol-HDL (13) e Colesterol Total (76-2/100). Os princípios dos métodos e seus respectivos protocolos estão descritos no Anexo I.

Para determinação da concentração do colesterol não-HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL. O colesterol não-HDL é usado para estimar a concentração de partículas potencialmente aterogênicas no soro, tais como LDL, IDL e VLDL.

Para obtenção do índice aterogênico foi calculada a razão colesterol não-HDL / colesterol HDL.

Os níveis séricos de leptina, adiponectina e TNF-α foram determinados pelo método de imunoensaio do tipo Elisa utilizando os kits Crystal Chem Inc. Rat Leptin ELISA (catálogo # 90040; Downers Grove, USA), Invitrogen Immunoassay Rat Adiponectin (catálogo # KRP004; Carlsbad, CA, USA) e Invitrogen ELISA Rat TNF-α (catálogo # KRC3011; Carlsbad, CA, USA), respectivamente. O princípio destas dosagens e os respectivos protocolos estão descritos no Anexo II deste trabalho.

4.6 - Extração e dosagem da gordura retida no conteúdo fecal

A gordura retida no conteúdo fecal foi extraída conforme descrito por Folch *et al*. (1957), usando uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1, v/v). Posteriormente, o colesterol total foi mensurado no extrato lipídico.

Procedimento de dosagem da extração da gordura fecal:

Uma amostra de 100 mg de fezes maceradas foram colocadas em tubos de vidro pré-lavados com éter de petróleo. Em seguida, 1,9 mL da mistura clorofórmio-metanol (2:1) e 0,4 mL de metanol puro foram adicionados. Os tubos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo de vidro previamente pesado e identificado. Foram acrescentados 0,8 mL de clorofórmio puro e 0,64 mL da solução de NaCl 0,73%, nova centrifugação foi realizada e a fase superior desprezada. Posteriormente, a parede interna do tubo de vidro foi lavada com 0,9 mL da solução de *Folch* - clorofórmio/metanol/água (3: 48: 47). A fase superior foi desprezada e os tubos com extratos lipídicos foram secos em estufa semi-aberta a 40ºC e após total evaporação do solvente foram resfriados no dessecador e pesados novamente.

Cálculo

Quantidade de Gordura nas Fezes (mg) = (peso do tubo final – peso do tubo inicial) x 1000

4.6.1 - Dosagem de colesterol total na gordura extraída do conteúdo fecal:

Primeiramente, a gordura extraída do conteúdo fecal foi diluída com isopropanol. Em um tubo de polipropileno adicionaram-se 10 µL da gordura e 490 µL de isopropanol. Em seguida, foi determinada a concentração de colesterol total nessa amostra diluída, utilizando o kit para colesterol total da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de colesterol total excretada por 1 grama de fezes.

4.7 – Extração e dosagem da gordura hepática

Determinamos a quantidade de gordura nos fígados dos animais conforme descrito por Folch *et al*. (1957), usando uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1, v/v). Posteriormente, o colesterol total foi mensurado no extrato lipídico.

Procedimento de dosagem da extração da gordura hepática:

Uma amostra de 400 mg de fígado foram colocados em tubos de vidro pré-lavados com éter de petróleo e macerados com 8 mL da mistura clorofórmio-metanol (2:1). Os tubos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo de vidro previamente pesado e identificado. Foram acrescentados 2 mL da solução de NaCl 0,73%, nova centrifugação foi realizada e a fase superior desprezada. Posteriormente, a parede interna do tubo de vidro foi lavada com 3 mL da solução de *Folch* - clorofórmio/metanol/água (3: 48: 47). A fase superior foi desprezada e os tubos com os extratos lipídicos foram secos em estufa semi-aberta a 40ºC e após total evaporação do solvente foram resfriados no dessecador e pesados novamente.

Cálculo

Quantidade de Gordura no Fígado (mg) = (peso do tubo final – peso do tubo inicial) x 1000

4.7.1 - Dosagem de colesterol total na gordura hepática:

Primeiramente, a gordura extraída do fígado foi diluída com isopropanol. Em um tubo de polipropileno adicionou-se 10 µL da gordura e 490 µL de isopropanol. Em seguida, foi determinada a concentração de colesterol total nessa amostra diluída, utilizando o kit para colesterol total da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de colesterol total presente em 1 grama de fígado.

4.8 - Ensaio da reacão em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR)

4.8.1- Extração do RNA total

O RNA total do tecido hepático foi isolado utilizando o sistema *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Como se segue, cerca de 60 mg do fígado foram homogeneizados com 350 μL do tampão de lise (*RNA Lysis Buffer*). Uma alíquota de 175 μL do homogenato foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 350 μL do tampão de diluição (*RNA Dilution Buffer*). A mistura foi colocada em banho-maria 70°C por 3 minutos e centrifugada a 1500 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 μL de etanol 95% que posteriormente foram transferidos para a membrana da coluna do *Spin Basket Assembly* e centrifugados a 1500 g por 1 minuto. À membrana dessa coluna foram adicionados 600 μL de *RNA Wash Solution*, seguida por centrifugação a 1500 g por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 50 μL do mix de incubação de DNAse o qual foi incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, 200μL de *DNAse Stop Solution* foram adicionados `a coluna e centrifugados a 1500 g por 1 minuto. Foi realizada uma primeira lavagem com 600 μL de *RNA Wash Solution*, seguida por centrifugação a 1500 g por 1 minuto. A segunda lavagem foi feita com 250 μL de *RNA Wash Solution*, seguida por centrifugação a 1500 g por 2 minutos. A coluna foi transferida para o tubo de eluição e sobre sua membrana foram adicionados 100 μL de *Nuclease Free Water*, que foram posteriormente centrifugados a 1500 g por 1 minuto. A concentração e pureza do RNA total foram verificadas no espectrofotômetro na razão A260/A280 nm (Nano Vue da GE Healthcare, Reino Unido) (Anexo III).

4.8.2- Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA Total utilizando o kit *Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 μL de tampão 10x (500 mM de KCl, 100 mM deTris-HCl, 25 mM de MgCl2, pH 8,3), 0,8 μL da mistura de 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+.

4.8.3 – Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores utilizados para amplificar o gene de referência endógena, o Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPDH) foram sintetizados como proposto anteriormente (Xiong *et al*., 2010).

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de nucleotídeos publicadas por Reena *et al*. (2011) para SREBP-2 e CYP7A1, Li *et al*. (2009) para HMG CoA-R e LDL-R, Yu *et al*. (2003) para ABCG5 e ABCG8. As sequências dos iniciadores para amplificação do ApoB100 (forward primer 5`- AGTAGTGGTGCGTCTTGGATCCA-3` e reverse primer 5`- ACTCTGCAGCAAGCTGTTGAATGT-3`) foram desenhadas com base na sequência de *Rattus norvegicus* disponível no banco de dados *GenBank* (número de acesso NM_019287). Os iniciadores foram construídos usando o programa Primer-BLAST, disponível na página do *National Center for Biotechnology* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Todos iniciadores foram sintetizados pela empresa *Invitrogen Life Technologies* (São Paulo, Brazil).

4.8.4 - Curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene para controle de referência endógena foram construídas curvas padrões para cada amplificado, a partir de diluições seriadas do cDNA (100, 10, 1, 0,1 nanogramas do cDNA preparado) de uma mesma amostra. A análise de regressão linear dos valores de *Threshold Cycle* (CT) em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em y = ax+b) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos iniciadores, conforme equação abaixo:

$$Ef = \left(10^{-1/coeficiente\ angular} - 1\right) \times 100$$

A curva padrão e a curva de dissociação de todos oligonucleotídeos iniciadores estão apresentadas no Anexo IV deste trabalho. Também foi avaliado se a dieta hipercolesteroleminate e a polpa de açaí poderiam ter algum efeito na expressão gênica de GAPDH. Os resultados mostraram que, nos diferentes tratamentos, não houve alteração na expressão desse gene, sendo portanto escolhido como gene de referência endógena.

4.8.5 – 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). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços, em volume final de 12 µL, dos quais 2 µL de cDNA (50 ng), 0,5 µL de cada primer (*forward e reverse*, 10 µM), 6 µL de *SYBR® Green Master Mix* e água livre de DNAse, quantidade suficiente para 12 µL. As reações foram realizadas no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems, CA, USA) nas seguintes condições, 50°C por 2mintos, 95° C por 10 minutos e então 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento dos iniciadores e extensão dos produtos). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7000 System SDS Software (Applied Biosystems*). Todas as análises foram realizadas em triplicata. 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 (CT comparativo ou ΔΔCT), 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 endógena,

GAPDH e uma amostra calibradora (grupo C) foram utilizadas como base para os resultados de expressão comparativa.

De posse dos valores de CT, que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial do PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔCT de cada amostra, onde o valor do CT do gene de referência endógena (GAPDH) foi subtraído do CT do gene alvo.

$$\Delta C_T = C_T \, do \, gene \, alvo - C_T \, do \, gene \, controle \, endógeno$$

Em seguida foram calculados os valores de ΔΔCT, onde o valor do ΔCT da amostra calibradora (grupo C) foi subtraído do ΔCT das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \, da \, amostra \, teste - \Delta C_T \, da \, amostra \, calibradora$$

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

4.9 - Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste *Kolmogorov–Smirnov*. Dados de ganho de peso, excreção fecal, ingestão alimentar, indicadores da função hepática, lipídeos séricos, índice aterogênico, gordura nas fezes e no fígado, colesterol total nas fezes e no fígado (Tabelas IV, V, VI, VII) que seguiram distribuição normal, foram submetidos à análise bivariada (TWO-WAY), os fatores de classificação foram dieta [(C + CA) X (H + HA)] e açaí [(CA + HA) X (C + H)], bem como a interação entre dieta e açaí (C X CA X H X HA). Quando ocorreu interação entre dieta e açaí, foi utilizado o *post teste de Bonferroni* para determinar diferenças entre os quatro grupos. Dados que não seguiram distribuição normal foram analisados pelos testes não-paramétricos *Kruskal-Wallis* e *post teste de Dunns*.

Dados de CT inicial, CT com 14 dias de experimento, peso inicial, expressão gênica e concentração sérica das adipocinas (Tabela III e Figuras XIV e XV) que seguiram distribuição normal foram analisados pelo teste-t de *Student's* não-pareado. Dados que não seguiram distribuição normal foram analisados pelo o teste Mann-Whitney.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (San Diego, California, USA). Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. Os dados que seguiram uma distribuição normal foram expressos como média ± desvio padrão e os outros como mediana e intervalo interquartil. Foi utilizada a correlação de *Pearson's* para rastrear a associação entre o colesterol total e as adipocinas (Tabela VIII).

Capítulo 5 - Resultados

5.1 - Colesterol total e peso corporal inicial e com 14 dias de experimento

Avaliamos a concentração sérica de CT no início do experimento e após 14 dias a fim de homogeneizar os grupos experimentais em relação a este parâmetro e avaliar a efetividade da dieta rica em colesterol em promover hipercolesterolemia (Tabela III).

Tabela III. Colesterol total e peso corporal inicial e com 14 dias de experimento de ratos tratados com dieta padrão e hipercolesterolemiante.

Variáveis	Grupos Experimentais	
	C	H
CT inicial (mmol/L)	1,75 ± 0,26	1,76 ± 0,22
Peso inicial (g)	139,0 ± 11,24	139,1 ± 12,08
CT 14 dias (mmol/L)	2,40 ± 0,28	3,68 ± 1,80**
Peso 14 dias (g)	158,3 ± 14,14	163,6 ± 12,64

CT, Colesterol total; C, Grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=16 por grupo. Dados foram testados por teste t Student's não-pareado. ** $P < 0,01$ em relação ao grupo C.

No início do experimento todos os grupos C e H apresentavam uniformidade em relação aos valores séricos de CT, aproximadamente 1,75 mmol/L e peso inicial, em média 140 g.

Após 14 dias recebendo dieta padrão ou hipercolesterolemiante, observa-se que a concentração sérica de CT nos animais hipercolesterolêmicos (grupos H) foi 1,5 vezes maior comparado aos que receberam a dieta padrão (grupos C). Em relação ao peso corporal não foi encontrado diferença significativa entre os grupos (Tabela III).

5.2 - Ganho de peso, excreção fecal e ingestão alimentar

Primeiramente avaliamos como a dieta hipercolesterolemiante e a adição da polpa de açaí às dietas experimentais (padrão e hipercolesterolemiante) afetavam o ganho de peso final, excreção fecal e ingestão alimentar dos animais (Tabela IV).

Tabela IV. Ganho de peso final, excreção fecal diária e ingestão alimentar diária de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí.

Variáveis	**Grupos Experimentais**				Anova: *Valor P*		
	C	**CA**	**H**	**HA**	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
Ganho de peso final (g)	55,66 ± 7,12	55,85 ± 7,36	64,81 ± 12,8	66,94 ± 6,59	0,0031	0,7141	0,7588
Excreção fecal (g/dia)	0,58 ± 0,07	0,83 ± 0,11	0,55 ± 0,07	0,69 ± 0,10	0,016	P<0,0001	0,1051
Ingestão alimentar (g/dia)*	14,29 / 13,11/ 15,68[a]	13,92 / 12,64 / 17,06[a]	10,62 / 9.86/ 11.00[b]	13,11 / 11,01/ 14,24[a]	----	----	----

ANOVA, Análise de variância; C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí; n=8 por grupo. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Dados foram testados por ANOVA Two-way. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. *Dados submetidos ao teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes ($P < 0,05$), dados expressos com mediana e intervalo interquartil.

A tabela IV mostra que o ganho de peso final dos animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiante (H e HA) foi 1,2 vezes maior comparado aos que receberam a dieta padrão (C e CA). A adição da polpa de açaí às dietas experimentais não afetou o ganho de peso final.

A dieta hipercolesterolemiante (grupos H e HA) promoveu uma redução na excreção fecal comparado à dieta padrão (grupos C e CA). Em contrapartida, os animais que receberam a suplementação de açaí nas dietas (CA e HA) tiveram um aumento de 1,3 vezes na excreção fecal diária comparado aos grupos C e H.

Os animais do grupo H apresentaram uma redução na ingestão alimentar em relação aos controles. A polpa de açaí não afetou a ingestão alimentar dos animais alimentados com a dieta padrão (CA) por outro lado, aumentou significativamente a dos animais do grupo HA (Tabela IV).

5.3 - Indicadores da função hepática

Para avaliar o efeito da dieta hipercolesterolemiante e da polpa de açaí no fígado dos animais determinamos a atividade sérica das transaminases (Tabela V).

Tabela V. Peso do fígado, atividade sérica da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí.

Variáveis	**Grupos Experimentais**				Anova: *Valor P*		
	C	**CA**	**H**	**HA**	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
ALT (UI)	11,35 ± 1,8	12,26 ± 1,6	18,70 ± 4,5	17,67 ± 3,5	P<0,0001	0,9571	0,3957
AST (UI)	35,9 ± 1,80	38,3 ± 4,0	49,9 ± 9,19	47,6 ± 4,7	P<0,0001	0,9995	0,2510
Peso fígado (g)	5,82 ± 0,50	5,60 ± 0,43	8,87 ± 0,62	9,31 ± 0,96	P<0,0001	0,6537	0,1685

ANOVA, Análise de variância; C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí; n=8 por grupo. ALT, Alanina aminotransferase; AST, Aspartato aminotransferase. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Dados foram testados por ANOVA Two-way. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

A dieta hipercolesterolemiante (grupos H e HA) promoveu um aumento na atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) comparado à dieta padrão (grupos C e CA). Além disso, promoveu um pronunciado aumento no peso do fígado. A adição da polpa de açaí 2% às dietas experimentais não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros hepáticos, seja no peso do fígado ou na atividade das transaminases (Tabela V).

5.4 - Lipídeos séricos e índice aterogênico

Os animais que receberam a dieta hipercolesterolemiante apresentaram baixos níveis da fração HDL do colesterol e aumento na concentração sérica do CT, colesterol não-HDL e índice aterogênico (Tabela VI).

Ao final dos 56 dias experimentais, os animais do grupo H mantiveram os níveis de CT altos (4,24 ± 1,08 mmo/L) em relação aos grupos C (2,20 ± 0,16) e CA (2,24 ± 0,16) e a adição de 2% da polpa de açaí à dieta hipercolesterolemiante (grupo HA – 3,25 ± 0,69 mmo/L) reduziu significativamente a concentração sérica de CT.

Tabela VI. Colesterol total final, Colesterol - HDL, colesterol não-HDL e índice aterogênico de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí.

Variáveis	Grupos Experimentais				Anova: *Valor P*		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
CT final (mmol/L)	$2,20 \pm 0,16^{c}$	$2,24 \pm 0,16^{c}$	$4,24 \pm 1,08^{a}$	$3,25 \pm 0,69^{b}$	P<0,0001	0,0497	0,0353
Colesterol HDL (mmol/L)	$1,49 \pm 0,14$	$1,66 \pm 0,18$	$0,13 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	P<0,0001	0,0259	0,0638
Colesterol não-HDL (mmol/L)	$0,71 \pm 0,20$	$0,57 \pm 0,28$	$4,11 \pm 1,08$	$3,10 \pm 0,71$	P<0,0001	0,0232	0,0802
Índice aterogênico	$0,48 \pm 0,16^{c}$	$0,36 \pm 0,21^{c}$	$31,19 \pm 9,13^{a}$	$21,56 \pm 8,26^{b}$	P<0,0001	0,0332	0,0377

ANOVA, Análise de variância; C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí; n=8 por grupo. CT, colesterol total; HDL, lipoproteína de alta densidade. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Dados foram testados por ANOVA Two-way. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. Quando ocorreu interação foi utilizado o *post teste de Bonferroni* para determinar diferenças entre os quatro grupos. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha, utilizadas quando a interação foi observada.

A polpa de açaí significativamente aumentou a fração HDL e reduziu a não-HDL independente da dieta que foi suplementada (grupos CA e HA).

A adição da polpa de açaí 2% à dieta hipercolesterolemiante (grupo HA) promoveu uma redução de 31% no índice aterogênico comparado ao grupo H (Tabela VI).

5.5 - Gordura total e colesterol total no fígado e excretado nas fezes

Avaliamos se a quantidade de gordura, bem como de a CT presente no fígado e nas fezes dos animais experimentais eram alteradas pela dieta rica em gordura e pela polpa de açaí (Tabela VII).

A quantidade de gordura presente no fígado e nas fezes dos animais que receberam a dieta hipercolesterolemiante (grupos H e HA) foi 5,7 e 1,9 vezes maior, respectivamente, comparado aos animais que receberam dieta padrão (grupos C e CA). A suplementação das dietas experimentais com açaí não alterou a quantidade de gordura no fígado e nas fezes.

Tabela VII. Gordura total e colesterol total no fígado e excretada nas fezes de ratos tratados com dieta padrão, padrão suplementada com açaí, hipercolesterolemiante e hipercolesterolemiante suplementada com açaí.

Variáveis	Grupos Experimentais				Anova: *Valor P*		
	C	**CA**	**H**	**HA**	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
Gordura no fígado (mg de gordura / g de fígado)	46,46 ± 10,95	49,05 ± 11,15	275,1 ± 28,48	267,8 ± 33,64	P<0,0001	0,8102	0,6124
Colesterol total no fígado (mg colesterol / g fígado)	$1,83 \pm 0,14^{c}$	$1,65 \pm 0,27^{c}$	$64,94 \pm 5,80^{a}$	$53,83 \pm 3,01^{b}$	P<0,0001	0,0004	0,0006
Gordura fezes (mg de gordura / g de fezes)	82,59 ± 41,85	89,74 ± 29,35	168,5 ± 26,89	157,2 ± 24,91	P<0,0001	0,8724	0,4804
Colesterol total fezes (mg colesterol / g fezes)	$1,61 \pm 0,67^{c}$	$1,10 \pm 0,50^{c}$	$9,14 \pm 2,09^{b}$	$16,16 \pm 6,6^{a}$	P<0,0001	0,0138	0,0051

ANOVA, Análise de variância; C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí; n=8 por grupo. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Dados foram testados por ANOVA Two-way. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. Quando ocorreu interação foi utilizado o *post teste de Bonferroni* para determinar diferenças entre os quatro grupos. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha, utilizadas quando a interação foi observada.

Os animais do grupo H apresentaram um aumento significativo na quantidade de CT presente no fígado e nas fezes quando comparado ao grupo C. Em relação a estes parâmetros o grupo CA foi estatisticamente semelhante ao grupo C. Por outro lado, a adição da polpa de açaí 2% à dieta hipercolesterolemiante (grupo HA) promoveu uma redução de 17% na quantidade de CT presente no fígado e um aumento de 44% na quantidade de CT excretado nas fezes comparado ao grupo H (Tabela VII).

5.6 - Expressão do mRNA de genes que regulam o metabolismo hepático do colesterol

A expressão de genes envolvidos na homeostase hepática do colesterol, HMG CoA-R, LDL-R, SREBP-2, ApoB100, CYP7A1, ABCG5 e ABCG8 foi avaliada por PCR em tempo real (Figura XIV).

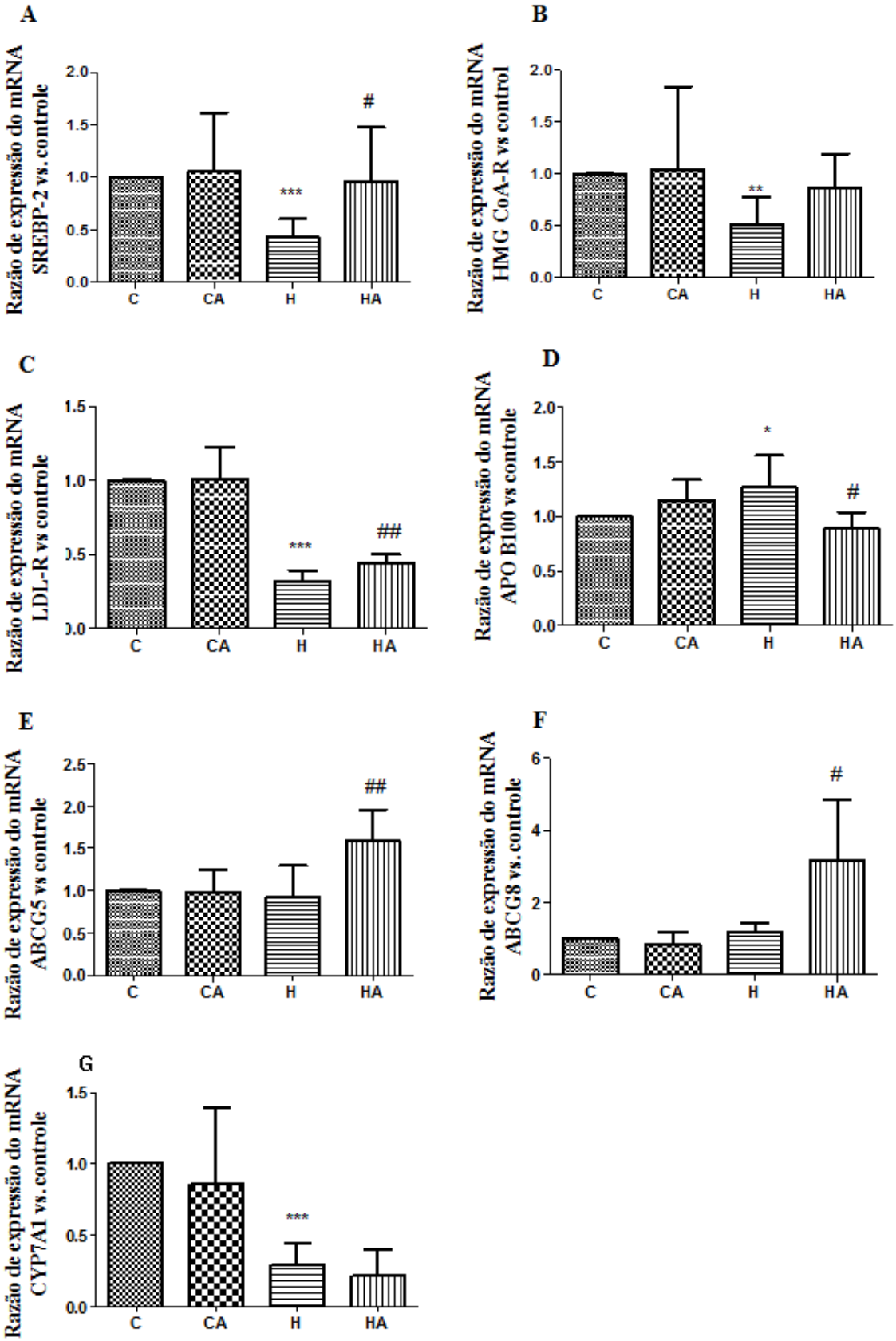


Figura XIV - Efeito da suplementação com açaí sobre a expressão do mRNA de genes que regulam o metabolismo hepático do colesterol em ratos controles e hipercolesterolêmicos.

C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí. (A) SREBP-2, Proteínas ligadoras aos elementos de resposta a esterol - 2; (B) HMG CoA-R, 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA redutase; (C) LDL-R, Receptor da lipoproteína de densidade baixa; (D) ApoB100, Apolipoproteína B100; (E) ABCG5 and (F) ABCG8, Transportadores *ATP-binding cassette subfamily G*; (G) CYP7A1, colesterol-7α-hidroxilase. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=6 por grupo. Dados foram testados por teste-t de *Student's* não-pareado. * $p < 0.05$ comparado ao C, ** $p < 0.01$ comparado ao C, *** $p < 0.001$ comparado ao C, # $p < 0.05$ comparado ao H, ## $p < 0.01$ comparado ao H, ### $p < 0.001$ comparado ao H.

A figura XIV mostra que o grupo H apresentou uma redução na expressão de genes envolvidos na biossíntese hepática do colesterol, SREBP-2, HMG CoA-R e LDL-R, em relação ao grupo C. A adição da polpa de açaí à dieta hipercolesterolemiante (grupo HA) promoveu um aumento de 1,3 vezes e 2,2 vezes na expressão de LDL-R e SREBP-2, respectivamente, comparado ao grupo H. A polpa de açaí não afetou a expressão da enzima HMG CoA-R.

O grupo H apresentou um aumento na expressão da ApoB100 e uma redução na expressão da enzima CYP7A1 em relação ao grupo C. Os níveis do mRNA para a enzima CYP7A1 em animais hipercolesterolêmicos que receberam a suplementação com polpa de açaí (grupo HA) não foram diferentes do grupo H. Entretanto, a expressão da ApoB100 foi significativamente menor no grupo HA comparado ao grupo H.

A adição da polpa de açaí 2% na dieta hipercolesterolemiante (grupo HA) promoveu um pronunciado aumento na expressão do mRNA dos transportadores ABCG5 e ABCG8 comparado ao grupo H (Figura XIV).

5.7 - Concentração sérica das adipocinas

O possível efeito da dieta hipercolesterolemiante e da polpa de açaí sobre a disfunção do tecido adiposo foi avaliado pela concentração sérica da leptina, adiponectina e TNF-α (Figura XV).

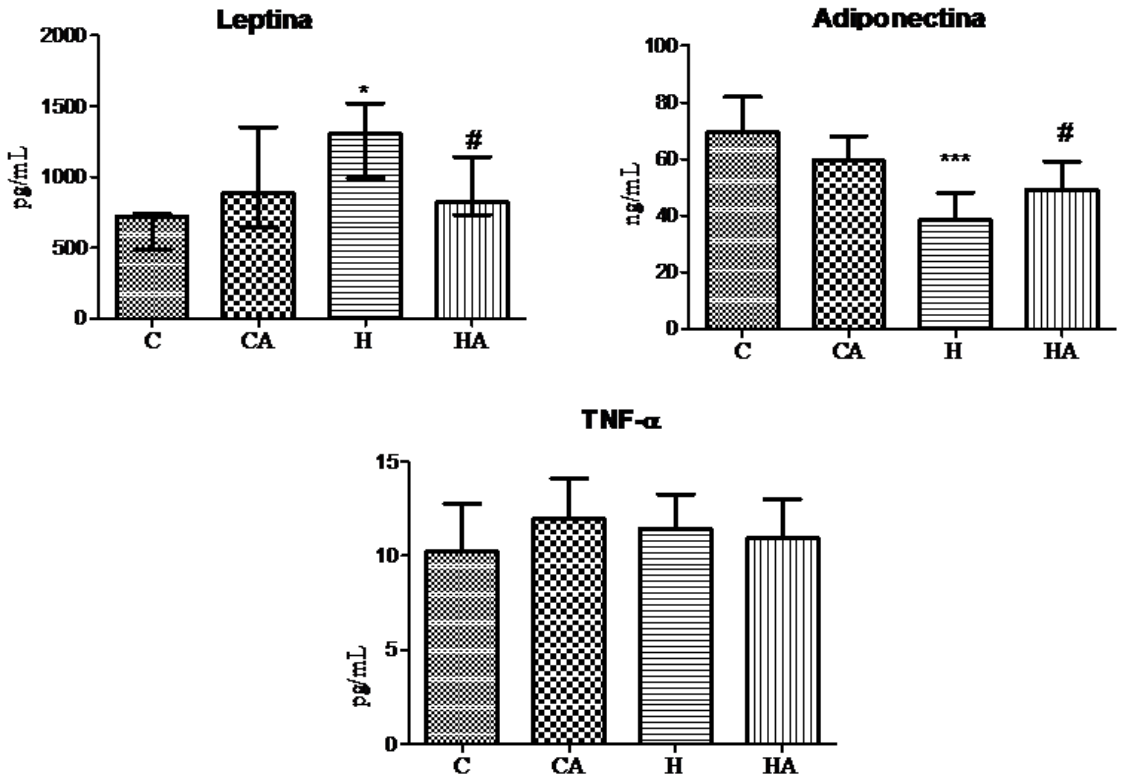


Figura XV. Efeito da suplementação com açaí na concentração sérica de adipocinas. C, Grupo que recebeu dieta padrão; CA, Grupo que recebeu dieta padrão suplementada com a polpa de açaí; H, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante; HA, Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada com a polpa de açaí; n=8 por grupo. Os valores de leptina foram analisados pelo o teste-t não paramétrico de *Student's* (Mann-Whitney) e estão expressos como mediana e intervalo interquartil. Adiponectina e TNF-α estão apresentados como média ± desvio padrão;. Dados foram testados por teste-t de *Student's* não-pareado. * $p < 0.05$ comparado ao C, *** $p < 0.001$ comparado ao C, # $p < 0.05$ comparado ao H.

Os animais do grupo H apresentaram um aumento de 1,8 vezes na concentração de leptina e uma redução de 45% nos níveis de adiponectina comparado aos animais que receberam a dieta padrão (grupo C). Em relação à concentração sérica de leptina e adiponectina o grupo CA foi estatisticamente semelhante ao grupo C.

A adição da polpa de açaí a dieta hipercolesterolemiante (grupo HA) reduziu em aproximadamente 34% a concentração de leptina e aumentou em 1,3 vezes os níveis de adiponectina quando comparado aos animais do grupo H.

A concentração sérica de TNF-α não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos experimentais (Figura XV).

5.8 - Correlação entre CT e adipocinas

Investigamos a associação entre o colesterol total e as adipocinas estudadas (Tabela VIII).

Tabela VIII. Coeficientes de correlação entre colesterol total e leptina, adiponectina e TNF-α dos animais experimentais.

Variáveis	Leptina	Adiponectina	TNF-α	Estatística
CT	0,0039	<0,0001	0,0094	Valor de *P*
	0,5364	-0,7804	0,4819	Valor de *r*

Coeficientes de correlação de *Pearson's* foram usados para analisar a associação entre as variáveis. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. Os dados de todos os grupos experimentais foram analisados juntos.

Os níveis de CT foram positivamente associados a leptina ($r = 0,5364$; $P < 0,05$) e TNF-α ($r = 0,4819$; $P < 0,05$). Entretanto, foram inversamente relacionados a adiponectina ($r = -0,7804$; $P < 0,0001$) (Tabela VIII).

Capítulo 6 - Discussão

O desequilíbrio na homeostase lipídica está associado a múltiplas doenças, incluindo desordens metabólicas e inflamatórias (Mittra *et al*., 2008). Altas concentrações de colesterol ligado à LDL possuem importante função na formação das células espumosas e na progressão da lesão aterosclerótica (Ross, 1993). Por outro lado, o colesterol ligado à HDL está associado a um mecanismo protetor ao desenvolvimento da aterosclerose (Olson, 1998). Dado o interesse público na prevenção e/ou tratamento das DCV e outras doenças metabólicas, estudos têm sido realizados para identificar produtos naturais que possam regular a dislipidemia. Uma vez que, a modulação dietética tem sido proposta como uma estratégia efetiva para reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (Yeon *et al*., 2012).

Estudos, em humanos e modelos experimentais, mostraram que o consumo de açaí promoveu uma melhora significante nos níveis séricos de colesterol (De Olveira *et al*., 2010; Souza *et al*., 2010; Udani *et al*., 2011; Xie *et al.,* 2011). É interessante ressaltar que a composição química deste fruto o indica com alto potencial para prevenção das DCV, sendo fonte de fibras alimentares, fitosteróis, ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos (Schauss *et al*., 2006b; Sanabria e Sangronis, 2007). Os componentes do açaí contribuem para a modulação do colesterol sérico através de vários mecanismos.

O efeito hipolipidêmico e os benefícios cardioprotetores associados ao consumo de fibras solúveis são comprovados em estudos realizados em modelos animais (Van Bennekum *et al*., 2005; Venkatesan *et al*., 2007) e em humanos (Braaten *et al*., 1994; Naumann *et al*., 2006). É amplamente aceito que as fibras solúveis agem diretamente no lúmen intestinal, promovendo respostas secundárias no fígado e na circulação periférica (Fernandez *et al*., 1997; Schneeman, 1999). As fibras promovem uma redução na absorção intestinal do colesterol dietético e consequente menor liberação deste esterol via quilomícrom (Fernandez, 2001). Além disso, agem como quelantes de sais biliares, bloqueando parcialmente a circulação entero-hepática e evitando a reutilização de ácidos biliares pelo fígado. Assim, ocorre um aumento na atividade da enzima CYP7A1 e maior produção de ácidos biliares a partir do colesterol livre hepático (Van Bennekum *et al*., 2005). Uma das estratégias observadas no fígado e que contribui para manutenção do *pool* do colesterol é propiciar um aumento na expressão de LDL-R, o que conduz a uma redução na concentração sérica desta lipoproteína aterogênica (Fernandez, 1995; Fukishima *et al*., 2001). As fibras solúveis realçam seu efeito hipocolesterolêmico por

promoverem um aumento na concentração de colesterol livre liberado na bile via ativação dos transportadores ABCG5 e ABCG8 (Rideout e Fan, 2008). Apesar das fibras alimentares não serem absorvidas pelo trato gastrointestinal, acredita-se que elas regulam diretamente a transcrição de genes hepáticos envolvidos no metabolismo do colesterol através de sinalizações secundárias geradas por metabólitos produzidos durante a fermentação das fibras solúveis por bactérias no intestino grosso (Fernandez, 1995; Rideout *et al*., 2008).

Os fitosteróis também estão entre as opções dietéticas disponíveis para ajudar na regulação da hipercolesterolemia uma vez que seu consumo está associado com uma redução de 30 - 40% na absorção intestinal deste lipídeo (Miettinen e Gylling, 2004; Perisee, 2005; Demonty *et al*., 2009). Os fitosteróis podem atuar por diversos caminhos como, competir com o colesterol durante a absorção intestinal, diminuir a solubilidade do colesterol nas micelas mistas e aumentar a excreção fecal de ácidos biliares (Christiansen *et al*., 2001; Ostlund Jr., 2004; Rozner *et al*., 2009).

A adição de ácidos graxos insaturados na dieta promove uma significativa redução na concentração sérica de colesterol total, este efeito pode ser visto em estudos clínicos (Temme *et al*., 1996; Kris-Etherton e Yu, 1997) e em estudos realizados com diferentes modelos animais (Woollett *et al*., 1992; Fernandez e McNamara, 1994; Nicolosi, 1997). O mecanismo proposto para explicar o efeito hipocolesterolêmico dos ácidos graxos insaturados refere-se à capacidade dessas gorduras em propiciar um aumento na expressão e atividade do LDL-R no fígado (Fernandez e West, 2005). Além disso, os ácidos graxos poliinsaturados podem agir como potentes ativadores de uma família de receptores nucleares, os receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs) (Kliewer *et al*., 1997). Estes receptores regulam diferentes genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas, tendo como efeito principal, o aumento na hidrólise das lipoprotéinas ricas em triacilgliceróis (VLDL).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito hipocolesterolemiante dos compostos fenólicos, um deles é a redução na absorção intestinal. Estes compostos promovem a redução da absorção do colesterol, ou por interagirem com moléculas transportadoras na borda em escova ou por promoverem um aumento na excreção fecal de ácidos biliares. Esta redução na absorção conduz ao aumento na expressão de LDL-R no fígado, o que resulta em uma redução sérica desta lipoproteína (Loest *et al*., 2002; Raederstorff *et al*., 2003; Hardin-Fanning, 2008). Tem

sido demonstrado que o flavonóide naringenina, regula a atividade de fatores de transcrição, PPARα, PPARy e LXR, envolvidos no metabolismo lipídico celular (Di Fabiani *et al*., 2004). Além disso, polifenóis modificam a liberação hepática da lipoproteína VLDL, através da redução na produção da ApoB100 (Pal *et al*., 2003).

Considerando que a polpa de açaí possui todos os componentes relacionados acima, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade hipocolesterolêmica da polpa de açaí em um modelo animal de hipercolesterolemia induzida por dieta. Utilizamos uma dose de 2% da polpa de açaí por mimetizar a adição de uma porção de fruta na alimentação diária em humanos.

Corroborando com recentes resultados do nosso grupo (Souza *et al*., 2010), a dieta hipercolesterolemiante utilizada (25% de óleo de soja e 1% de colesterol) foi capaz de alterar o metabolismo do colesterol, propiciando um quadro de hipercolesterolemia em ratas. E a polpa de açaí 2% apresentou significante atividade hipocolesterolêmica, sendo capaz de reduzir o colesterol total, o colesterol não-HDL e o índice aterogênico, bem como aumentar a fração HDL de ratas hipercolesterolêmicas. Em ratas alimentadas com a dieta padrão também aumentou a fração HDL e reduziu a não-HDL. Além disso, encontramos hepatomegalia, acúmulo de gordura no fígado e alterações na atividade sérica das transaminases em animais alimentados com a dieta rica em gordura, o que vai ao encontro dos estudos de Turbino-Ribeiro *et al*. (2003), Silva *et al*. (2008) e De Paula *et al*. (2009).

Foi avaliado se a polpa de açaí poderia atuar sobre a expressão de genes que regulam o metabolismo hepático do colesterol e sobre a quantidade de colesterol eliminado nas fezes e acumulado no fígado dos animais. O fígado é o principal órgão envolvido na regulação do metabolismo do colesterol, sendo a conversão do colesterol a ácidos biliares o caminho principal de catabolismo deste esterol. Nós encontramos uma redução na expressão da enzima CYP7A1 nos animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiante, ao encontro desse dado têm-se os estudos de Rudel *et al*. (1994) e Xu *et al*. (1995). Entretanto, outros têm demonstrado que a atividade e a expressão do mRNA da enzima CYP7A1 são aumentados pela presença de colesterol na dieta (Guo *et al*., 2011; Yiu *et al*., 2011; Boone *et al*., 2011). Esta diferença na regulação da CYP7A1 pelo colesterol dietético pode ser explicada pela interferência de outros componentes da dieta, tais como a quantidade e o tipo de gordura e também pelo modelo animal utilizado. A polpa de açaí não teve efeito sobre a expressão dessa enzima.

Apesar da atividade da CYP7A1 ter um importante impacto no catabolismo do colesterol, outros processos metabólicos também favorecem a eliminação deste esterol pelo corpo, como a eliminação direta na bile via transportadores ABCG5 e ABCG8 (Peet *et al*., 1998; Graf *et al*., 2002). Yu *et al.* (2002) mostraram que camundongos com um aumento na expressão desses transportadores no fígado e no intestino delgado apresentaram alterações importantes no metabolismo do colesterol como, aumento na concentração de colesterol na bile, redução na absorção do colesterol e aumento na síntese hepática deste esterol. Nós encontramos que a suplementação da dieta hipercolesterolemiante com a polpa de açaí 2% promoveu um aumento significativo na expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 no fígado. Este dado corelaciona e justifica, pelo menos em parte, o aumento na quantidade de colesterol eliminado nas fezes encontrado para os animais do grupo HA. Recentemente, Nishimoto *et al*. (2009) demonstraram que a suplementação dietética com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados, aumentou significativamente a expressão hepática dos transportadores ABCG5 e ABCG8 e a quantidade de colesterol excretada nas fezes de camundongos.

Como citado anteriormente Yu *et al.* (2002), mostraram que o aumento na expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 no fígado e no intestino delgado promoveu alterações na síntese hepática do colesterol, assim também decidimos investigar se a polpa de açaí teria influencia na transcrição de genes relacionados à síntese hepática do colesterol.

As concentrações séricas e intracelulares de colesterol são principalmente reguladas pelo fator de transcrição SREBP-2. Os animais hipercolesterolêmicos apresentaram uma redução na expressão do SREBP-2, provavelmente a dieta hipercolesterolemiante promoveu uma saturação nos níveis de colesterol nos hepatócitos o que resultou em inibição da síntese endógena no fígado e consequente redução na expressão do SREBP-2. Por outro lado, a polpa de açaí aumentou a expressão deste fator de transcrição em animais hipercolesterolêmicos, provavelmente por diminuir a concentração hepática deste esterol. A nossa hipótese é confirmada pelos resultados encontrados em relação à concentração de colesterol no fígado.

O SREBP-2 ativa a síntese endógena do colesterol por se ligar a elementos de resposta à esterol localizados na região promotora de genes alvos e promover a transcrição da HMG CoA-R e do LDL-R. Rudling (1992), Guo *et al*. (2011) e Shibata *et al*. (2007) mostraram uma redução na expressão hepática da HMG CoA-R em ratos

alimentados com uma dieta hipercolesterolemiante, semelhante aos resultados encontrados no presente estudo. Um aumento na expressão do LDL-R no fígado resulta em uma maior captação da LDL plasmática e está associado a um menor risco de desenvolvimento de DCV (Ansell, 1999). Nós encontramos um aumento na expressão deste receptor em animais hipercolesterolêmicos que receberam a polpa de açaí, o que pode justificar a redução sérica do colesterol total e das frações aterogênicas nesses animais. O extrato de *Curcuma longa*, melhor conhecido como turmérico, previne a hipercolesterolemia de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura ao promover um aumento significativo do LDL-R hepático (Yiu *et al*., 2011).

A Apo B100 participa da formação das lipoproteínas VLDL, IDL e LDL, sendo considerado um fator de risco emergente para as DCV. Sabe-se que polifenóis podem afetar a expressão desta apolipoproteína (Del Bas *et al*., 2005; Zern e Fernandez 2005). Assim, dado o efeito positivo da polpa de açaí em reduzir os níveis séricos das lipoproteínas LDL + VLDL, além da expressão do LDL-R, decidimos avaliar a expressão da Apo B100. A suplementação com a polpa de açaí diminuiu significativamente a expressão da Apo B100, sugerindo que a redução das frações aterogênicas também pode ser devido a uma modificação na formação e liberação da VLDL pelo fígado. O que corrobora com o estudo de Pal *et al*. (2003) que encontraram uma redução na produção de Apo B100 em culturas de células hepáticas humanas, HepG2, tratadas com o extrato de uva vermelha, rico em polifenóis. Diante do nosso objetivo de investigar a atividade hipocolesterolêmica da polpa de açaí, tem-se como limitação do nosso estudo a avaliação somente da expressão gênica, sendo importante confirmar se as alterações encontradas são refletidas ao nível das proteínas.

Uma dieta rica em frutas e hortaliças apresenta efeitos positivos sobre o desenvolvimento das DCV, não apenas por exercer propriedades hipocolesterolemiantes, mas também por apresentar efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (Hu *et al*., 2003; Galassetti e Pontello, 2006; Dauchet *et al*., 2009). Xie *et al*. (2011) demonstraram que o açaí apresenta efeitos antiinflamatórios. Camundongos deficientes na Apo E (apoE$^{-/-}$) que receberam o suco de açaí por 5 semanas apresentaram uma redução significativa nos níveis séricos das citocinas TNF-α e IL-6. Além disso, a expressão dos genes e os níveis de proteínas de TNF-α e IL-6 foram reduzidos nos macrófagos desses animais. Os autores sugerem que o açaí pode

proteger contra o desenvolvimento da aterosclerose por regular mediadores inflamatórios.

A inflamação tem um papel importante no desenvolvimento e na progressão das lesões ateroscleróticas (Ross, 1993). O tecido adiposo produz e secreta fatores inflamatórios denominados adipocinas (Ahima e Flier, 2000). Como descrito anteriormente, o desequilíbrio nas concentrações séricas dessas adipocinas contribuem para o aparecimento das DCV e outras doenças metabólicas. Por isso, neste trabalho também avaliamos se a polpa de açaí poderia regular a secreção das adipocinas, leptina, adiponectina e TNF-α.

A leptina pode desempenhar ações pró-aterogênicas como, estimular a proliferação e hipertrofia de células musculares lisas vasculares e induzir a expressão da proteína C-reativa em células endoteliais de artérias coronárias (Singh *et al*. 2007). Por outro lado, níveis circulantes de adiponectina são inversamente proporcionais à gravidade da aterosclerose (Trujillo e Scherer, 2006). Um aumento na expressão do gene da adiponectina em modelos animais de aterosclerose como, camundongos apoE$^{-/-}$, promove uma redução de 30% nas lesões ateroscleróticas (Okomoto *et al*., 2002). A ação anti-inflamatória e anti-aterogênica da adiponectina se dá pela diminuição na expressão da molécula de adesão-1, diminuição da quimiotaxia do macrófago para formação de células espumosas e inibição da sinalização inflamatória no tecido endotelial (Arner, 1995; Frayn *et al*., 2003; Kawanami *et al*., 2004).

A dieta hipercolesterolemiante promoveu um desequilíbrio na concentração sérica das adipocinas caracterizado por hiperleptinemia e hipoadiponectinemia, ao encontro desse dado têm-se os estudos de Roberts *et al,* (2002), Ribot *et al*. (2008) e Velkoska *et al*. (2010). De forma interessante, o consumo da polpa de açaí por animais hipercolesterolêmicos foi capaz de promover uma melhora nos níveis séricos de leptina e adiponectina.

Assim como descrito anteriormente, para a ação hipocolesterolemiante este efeito do açaí também pode ser atribuído aos seus nutrientes que possuem propriedades relevantes à saúde cardiovascular. Foi demonstrado, que o tratamento de adipócitos com a principal antocianina do açaí (cianidina 3-glicosídeo) promoveu uma regulação na expressão gênica e na secreção de leptina e adiponectina. O estudo também verificou um aumento na expressão do gene da adiponectina em camundongos que receberam a antocianina (Tsuda *et al*., 2004).

A dieta hipercolesterolemiante e a polpa de açaí não alteraram os níveis séricos de TNF-α. O TNF-α é uma adipocina pró-inflamatória que possui forte associação com a obesidade (Ruan e Lodish, 2003), quadro não apresentado pelo modelo experimental utilizado. Além disso, a falta de eficácia em aumentar a concentração plasmática de TNF-α pela dieta hipercolesterolemiante pode ser devido ao pequeno período de intervenção. Apesar de não observarmos diferenças nos níveis plasmáticos dessa adipocina, encontramos uma correlação positiva entre os níveis de colesterol e TNF-α, sugerindo que uma prolongada ingestão de uma dieta rica em gordura poderia aumentar a produção desta adipocina inflamatória.

O efeito da polpa de açaí em normalizar o perfil de secreção de leptina e adiponectina somado à sua propriedade hipocolesterolemiante indicam que o consumo deste fruto pode exercer papel protetor contra a formação da lesão aterosclerótica.

Capítulo 7 - Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e sob as condições experimentais empregadas no presente estudo, podemos concluir que a presença da polpa de açaí em dieta hipercolesterolemiante contribui para a redução do colesterol sérico e este efeito pode ser atribuído à expressão alterada de genes que regulam a homeostase hepática do colesterol propiciando uma maior excreção fecal deste esterol.

Desde que observamos nos animais que receberam dieta hipercolesterolemiante e açaí:

- aumento da expressão de mRNA do gene ABCG5
- aumento da expressão de mRNA do gene ABCG8
- aumento da expressão de mRNA do gene LDL-R

Os resultados sugerem como possível mecanismo: o aumento na expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8 propiciariam um maior efluxo do colesterol livre do fígado para a bile. Consequentemente, com menor concentração hepática de colesterol, haveria um aumento da expressão de LDL-R e a uma maior captação pelo fígado do colesterol- LDL plasmático.

Em relação às adipocinas os resultados mostraram que a suplementação com a polpa de açaí em ratos hipercolesterolêmicos pode ter um importante papel na manutenção da homeostase metabólica, uma vez que favoravelmente alterou os níveis de leptina e adiponectina, restabelecendo o equilíbrio sérico das mesmas.

Nossos resultados ampliam a compreensão dos mecanismos envolvidos nas bioatividades do açaí e reforçam o seu reconhecimento como alimento funcional e seu importante papel na nutrição humana, como por exemplo, na prevenção das DCV.

Capítulo 8 - Artigos

Artigo submetido à publicação

Dietary açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) improves serum concentration of adipocytokines in hypercholesterolemic rats.

Melina Oliveira de Souza, Rinaldo Cardoso dos Santos, Marcelo Eustáquio Silva, Maria Lúcia Pedrosa.

Submetido em dezembro de 2012 à revista Nutrition.

Artigo aceito para publicação

The hypocholesterolemic activity of açaí (Euterpe Oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ABCG5, ABCG8 and LDL-R genes in rats.

Souza, M. O., Silva, L. S., Magalhães, C. L.B., Figuereido, B. B., Costa, D. C., Silva, M. E., Pedrosa, M. L.

Nutrition Research. 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2012.10.001.

Artigo publicado

Açaí (Euterpe Oleraceae Martius): chemical composition and bioactivity.

Souza, M. O., Santos, R. C., Silva, M. E., Pedrosa, M. L. *Nutrire: rev.Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr*. 2011; 36(2): 161-169.

Capítulo 9 - Referências Bibliográficas

Ahima, R. S.; Flier, J. S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 11: 327–332.

Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM. (1999). An evidence-based assessment of the NCEP Adult Treatment Panel II guidelines. National Cholesterol Education Program. *JAMA*. 282: 2051-7.

Arner, P. (1995). Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*. 27 (7): 435-8.

Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C.; et al. (1998). Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 101: 1581–1590.

Beaglehole, R. (2001). Global cardiovascular disease prevention: time to get serious. *Lancet*. 358: 661-3.

Beltowski, J. (2006). Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 189: 47–60.

Boone LR, Brooks PA, Niesen MI, Ness GC. 2011. Mechanism of resistance to dietary cholesterol. J Lipids 2011: 9 pages.

Braaten, J. T.; Wood, P. J.; Scott, F. W.; Wolynetz, M. S.; Lowe, M. K.; Bradley-White, P.; Collins, M. W. (1994). Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr*. 48:465–74.

Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 89: 331-40.

Brown, M. S.; Goldstein, J. L.; Kita, T. (1983). Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. In Est*. 72, 743–747.

Brown, A. J.; Sun, L.; Feramisco, J. D.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell*. 10(2): 237-245.

Bullo-Bonet, M.; Garcia-Lorda, P.; Lopez-Soriano, F. J.; Argiles, J. M.; Salas-Salvado, J. (1999). Tumour necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Lett*. 451: 215–219.

Burg, J. S.; Espenshade, P. J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res*. 50(4): 403–410.

Calabro, P.; Golia, E.; Maddaloni, V.; Malvezzi, M.; Casillo, B.; Marotta, C.; Calabro, R.; Golino, P. (2009). Adipose tissue-mediated inflammation: the missing link between obesity and cardiovascular disease? *Intern Emerg Med*. 4:25–34.

Champe, P. C.; Harvey, R. A. (2002). Metabolismo de Colesterol e Lipídios e Metabolismo dos Lipídios da Dieta. Bioquímica Ilustrada 20, 211-234. Porto Alegre, Brazil, Artmed.

Christiansen, L.; Karjalainen, N.; Serimaa, A.; Lonnroth, N.; Paakkari, T.; Yliruusi, J. (2001). Phase behaviour of b-sitosterol-cholesterol and bsitostanol-cholesterol co-precipitates. *Stp Pharma Sci*. 11: 167-173.
Cioffi, J. A.; Shafer, A. W.; Zupancic, T. J.; Smith-Gbur, J.; Mikhail, A.; Platika, D.; et al. (1996). Novel B219/OB receptorisoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*. 2 (5): 585-9.

Coltro, R. S.; Mizutani, B. M.; Mutti, A.; Délia, M. P. B.; Martinelli, L. M. B.; Cogni, A. L.; et al. (2009). Frequência de fatores de risco cardiovascular em voluntários participantes de evento de educação em saúde. *Rev Assoc Med Bras*. 55(5): 606-10.

Daniels, T.F.; Killinger, K. M.; Michal, J. J.; Wright Jr., R. W.; Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. Int J Biol Sci. 5(5): 474-488.

Dauchet, L.; Amouyel, P.; Dallongeville, J. (2009). Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 6: 599–608.

Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay M, Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C. (2005). Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J*. 19: 479-81.

Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. (2004). Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). *J Agric Food Chem.* 52: 1539-1545.

Del Pozo-Insfran, D.; Percival, S. S.; Talcott, S. T. (2006). Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J Agric Food Chem. 54*: 1222–1229.

De Oliveira, P. R.; da Costa, C. A.; de Bem, G. F.; de Cavalho, L. C.; de Souza, M. A.; de Lemos Neto, M.; da Cunha Sousa, P. J.; de Moura, R. S.; Resende, A. C. (2010). Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol*. 56: 619-26.

Demonty, I.; Ras, R. T.; Van der Knaap, H. C. M.; Duchateau, G. M. S. J. E.; Meijer, L.; Zock, P. L.; Geleijnse, J. M.; Trautwein, E. A. (2009). Continuous Dose-Response Relationship of the LDL-Cholesterol–Lowering Effect of Phytosterol Intake. *J Nutr*. 139: 271–284.

De Paula H, Pedrosa ML, Rossoni Júnior JV, Haraguchi FK, Santos R C, Silva ME. (2009). Effect of an Aqueous Extract of Annatto (Bixa orellana) Seeds on Lipid Profile and Biochemical Markers of Renal and Hepatic Function in Hipercholesterolemic Rats. *Braz Arch Biol Technol*. 529 (6): 1373-1378.

Di Fabiani, E.; Crestani, M.; Mitro, N. (2004). Lipid-activated nuclear receptors: from gene transcription to the control of cellular metabolism. *Eur J Lipid Sci Technol*. 106: 432–450.

Ducy, P.; Amling, M.; Takeda, S.; Priemel, M.; Schilling, A. F.; Beil, F. T.; et al. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control ofbone mass. *Cell*. 100 (2): 197-207.

Emerging Risk Factors Collaboration; Kaptoge S; Ray KK; Thompson A; Wood AM; Lewington S; Sattar N; Packard CJ; Collins R; Thompson SG; Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. JAMA 2009;302;1993–2000.

Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 115 (5): 911-9.

Fernandez, M. L. (1995). Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fi ber in the guinea pig: specifi c effects of pectin, guar gum, and psyllium. *J Lipid Res*. 36:2394–404.

Fernandez, M. L. (2001). Soluble fiber and indigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risks. *Curr Opin in Lipidol*. 12:35–40.

Fernandez, M. L.; Vergara-Jimenez, M.; Conde, K.; Behr, T.; Abdel-Fattah, G. (1997). Regulation of apolipoprotein B-containing lipoproteins by dietary soluble fiber in guinea pigs. *Am J Clin Nutr.* 65:814–22.

Fernandez, M. L.; McNamara, D. J. (1994). Dietary fat saturation and chain length modulate guinea pig hepatic cholesterol metabolism. *J Nutr*. 124:331–9.

Fernandez, M. L.; West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr*. 135: 2075-2078.

Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., et al.. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci*. 12: 3117–3132.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226: 497–509.

Frayn, K. N.; Karpe, F.; Fielding, B. A.; MacDonald, I. A.; Coppack, S. W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes*. 27: 875-88.

Fruhbeck, G.; Gomez-Ambrosi, J.; Muruzabal, F. J.; Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280(6): E827-47.

Fukushima, M.; Ohashi, T.; Fujiwara, Y.; Sonoyama, K.; Nakano, M. (2001).Cholesterol-lowering effects of maitake (Grifola frondosa) fi ber, shiitake (Lentinus edodes) fiber, and enokitake (Flammulina velutipes) fi ber in rats. *Exp Biol Med*. 226:758–65.

Funahashi, T.; Matsuzawa, Y.; Kihara, S. (2004). Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. *Int Congress Series.* 1262: 368-71.

Funahashi, T.; Nakamura, T.; Shimomura, I.; et al. (1999). Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 38: 202–6.

Galassetti, P.; Pontello, A. (2006). Dietary effects on oxidation of low-density lipoprotein and atherogenesis. *Curr Atheroscl Rep*. 8: 523–9.

Gant, J. P.; Heinecke, J. W. (2001). Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 11: 103–112.

Gimbrone M. A.; Cybulsky, M. I.; Kume, N.; Collins, T.; Resnick, N. (1995). Vascular endothelium: an integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 748:122-31.

Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343(6257):425–430.

Goldstein, J.L.; Debose-Boyd, R.A.; Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124(1): 35-46.

Goldstein, B. J.; Scalia, R. (2004). Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 2563–2568.

Goodwin, B.; Pendleton, L.; Levy, M.; et al. (2007).Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression andnitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293: H1115–H1121.

Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 110: 659-69.

Graf, G. A.; Yu, L.; Li, W. P.; Gerard, R.; Tuma, P. L.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H. (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*. 278: 48275-82.

Guerra, J. F. C.; Magalhães, C. L. B.; Costa, D. C.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. (2011). Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr.* 49: 188-194.

Guo J, Bei W, Hu Y, Tang C, He W, Liu X, Huang L, Cao Y, Hu X, Zhong X, Cao L. (2011). A new TCM formula FTZ lowers serum cholesterol by regulating HMG-CoA reductase and CYP7A1 in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol*. 135: 299–307.

Gustafson, B. (2010). Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J Atheros Tromb*. 17: 332-341.

Halaas, J. L.; Gajiwala, K. S.; Maffei, M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; Rabinowitz, D.; et al. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269 (5223): 543-6.

Haller, H. (1997). Endothelial function. General considerations. *Drugs.* 53: 1–10.

Hardie, D. G.; Hawley, S. A.; Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*. 574: 7–15.

Hardin-Fanning, F. (2008). The Effects of a Mediterranean-Style Dietary Pattern on Cardiovascular Disease Risk. *Nurs Clin N Am*. 43: 105–115.

Havel, P.J. (2004). Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 53(Suppl 1):S143-51.

Horton, J.D.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 109, 9: 1125-1131.

Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-α: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 259: 87–91.

Hsueh, W. A.; Law, R. (2003). The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-g on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 92:3j-9j.

Hu, F. B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr*. 78: 544S–51S.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). (1985). Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3 ed. V. 1, São Paulo; 1985.

Iribarren, C.; Husson, G.; Go, A. S.; et al. (2007). Plasma leptin levels and coronary artery calcification in older adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 729–732.

Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1529 (1–3): 245–256.

Kadowaki, T.; Yamauchi, T.; (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 26: 439–451.

Karaduman, M.; Oktenli, C.; Musabak, U.; et al. (2006). Leptin, soluble interleukin-6 receptor, C-reactive protein and soluble vascular cell adhesion molecule-1 levels in human coronary atherosclerotic plaque. *Clin Exp Immunol*. 143: 452–457.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. (2004). Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin

on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytocine-endothelial cell interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 314: 415-9.

Kontush, A.; Chapman, M. J. (2006). Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidaemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 58: 342–374.

Kliewer, S. A.; Sundseth, S. S.; Jones, S. A.; Brown, P. J.; Wisely, G. B.; Koble, C. S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T. M.; Lenhard, J. M.; Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci*. 94(9): 4318-4323.

Kris-Etherton, P.; Yu, S. (1997). Individual fatty acids on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 65 Suppl:1628–44S.

Kubota, N.; Terauchi, Y.; Yamauchi, T.; Kubota, T.; Moroi, M.; Matsui, J.; Eto, K.; Yamashita, T.; Kamon, J.; Satoh, H.; Yano, W.; Froguel, P.; Nagai, R.; Kimura, S.; Kadowaki, T.; Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*. 277: 25863–25866.

Kunjathoor, V. V.; Febbraio, M.; Podrez, E. A.; et al. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 277(4): 9982–9988.

Kusuhara, H.; Sugiyama, H. (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Eur J Physiol* 453: 735–744.

Lau, D. C. W.; Dhillon, B.; Yan, H.; Szmitko, P. E.; Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atheroslcerosis. *J Physiol Heart Circ Physiol*. 288: H2031–H2041.

Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R. B.; Maia, J. G.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleraceae Mart. (Acai) fruits. Int *J Food Sci Nutr*. 56: 53–64.

Li, G.; Liu, X.; Zhu, H.; Huang, L.; Liu, Y.; Ma, C.; Qin, C. (2009). Insulin Resistance in Insulin-Resistant and Diabetic Hamsters (Mesocricetus auratus) Is Associated with Abnormal Hepatic Expression of Genes Involved in Lipid and Glucose Metabolism. *Comp Med*. 59: 449–458.

Loest, H. B.; Noh, S. K.; Koo, S. I. (2002). Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and alpha-tocopherol in ovariectomized rats. *J Nutr*. 132: 1282–1288.

Lord, G. M.; Matarese, G.; Howard, J. K.; Baker, R. J.; Bloom, S. R.; Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 394 (6696): 897-901.

Lorenzi, H.; Souza, H. M.; Medeiros Costa, J. T.; Cerqueira, L. S. C.; Van Behr, N. (1996). Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas. s.l.: *Ed. Plantarum Ltda*. 303p.

Lyon, C. J.; Law, R. E.; Hsueh, W. (2003). Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 144 (6): 2195-200.

Maeda, K.;, Okubo, K.; Shimomura, I.; et al. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose-specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 221: 286–9.

Maeda, K.; Okubo, K.; Shimomura, I.; et al. (1997). Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 190:227–35.

Marcason, W. (2009). What Is the Açaí Berry and Are There Health Benefits? *J Am Diet Assoc.* 109(11): 1968p.

Martin, S.S., Qasim, A., Reilly, M.P. (2008). Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol*. 52: 1201–1210.

Mateo, T.; Naim, A.; Nabah, Y.; Losada, M.; et al (2007). A critical role for TNF{alpha} in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II–stimulated arterioles. *Blood*. 110:1895–1902.

Matheus, M.E.; de Oliveira Fernandes, S.B.; Silveira, C.S.; Rodrigues, V. P.; de Sousa Menenzes, F.; Fernandes, P. D. (2006). Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol.* 107: 291–296.

Mendes, M. J. F. L.; Alves, J. G. B.; Alves, A. V.; Siqueira, P. P.; Freire, E. F. C. (2006). Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 6(supl. 1):S49-54.

Menezes, F. S.; Falcão, D. Q.; Mendonça Filho, R. F. W.; Silveira, C. S.; Rennó, M. N.; *et al*. (2005). Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacological information as a tool. *Acta Horticulturae.* 675: 89–95.

Mertens-Talcott, S. U.; Rios, J.; Jilma-Stohlawetz, P.; Pacheco- Palencia, L A.; Meibohm, B.; Talcott, S T.; Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *J Agric Food Chem.* 56(10): 7796–7802.

Miettinen, T. A.; Gylling, H. (2004). Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann Med* 36: 126–134.

Mineo, C.; Deguchi, H.; Griffin, J. H.; Shaul, P. A. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 98:1352–1364.

Mittra S, Bansal VS, Bhatnagar PK. (2008). From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discovery Today.* 13: 211–218.

Mohamed-Ali, V.; Pinkney, J. H.; Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 22: 1145–1158.

Naumann, E.; van Rees, A. B.; Onning, G.; Oste, R.; Wydra, M.; Mensink, R. P. (2006). Beta-glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr.* 83:601–5.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2006). Biossíntese do colesterol, dos esteróides e dos isoprenóides. Lehninger Princípios de Bioquímica. Cap.21, 807-820. 4 ed. São Paulo: SARVIER.

Nicolosi, R. J. (1997). Dietary fat saturation effects on low density lipoprotein concentration and metabolism in various animal models. *Am J Clin Nutr*. 65 Suppl:1617–27S.

Nishimoto, T.; Pellizzon, M. A.; Aihara, M.; Stylianou, I. M.; Billheimer, J. T.; Rothblat, G.; Rader, D. J. (2009). Fish Oil Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1502-1508.

Nóbrega, A. A.; Garcia, M. H.; Tatto, E.; Obara, M. T.; Costa, E.; Sobel, J.; Araujo, W. N. (2009). Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 4, April.

Nohturfft, A.; Yabe, D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2000). Espenshade PJ.Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell*. 102(3): 315-323.

Okomoto, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; et al. (2002). Adiponectin reduces atherosclersosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 106: 2767–70.

Oliveira, M. S. P.; Carvalho, J. E. U.; Nascimento, W. M. O. (2000). Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). *Jaboticabal: FUNEP*. 52p.

Olson RE. (1998). Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr.* 128: 439S–43.

O'Rourke, L.; Gronning, L. M.; Yeaman, S.J.; Shepherd, P. R. (2002). Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem.* 277: 42557–42562.

Osterud, B.; Bjorklid, E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*. 83: 1069 –1112.

Ostlund Jr., R. E (2004). Phytosterols and cholesterol metabolism. Curr Opin Lipidol. 15: 37-41.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Maeda, K.; Kuriyama, H.; Okamoto, Y.; Hotta, K.; Nishida, M.; Takahashi, M.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100: 2473–2476.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; et al. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 103: 1057– 63.

Pal, S.; Ho, N.; Santos, C.; Dubois, P.; Mamo, J.; Croft, K.; Allister, E. (2003). Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of apoB 100 from human Hep G2 cells. *J Nutr*. 133:700–6.

Peelman, F.; Waelput, W.; Iserentant, H.; Lavens, D.; Eyckerman, S.; Zabeau, L.; Tavernier, J. (2004) Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res*. 43: 283–301.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 93: 693-704.

Perisee, D. M. (2005). Food fortification with plant sterol/stanol for hyperlipidemia: management in free-living populations. *J Am Diet Assoc.* 105: 52–53.

Polito, A.; Fabrri, A.; Ferro-Luzzi, A.; Cuzzolaro, M.; Censi, L.; Ciarapica, D.; et al. (2000). Basal metabolic rate in anorexia nervosa: relation to body composition and leptin concentrations. *Am J Clin Nutr.* 71: 1495-502.

Rajala, M. W.; Scherer, P. E. (2003). Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Neuroendocrinol*. 144 (9) : 3 765 – 73.

Raederstorff, D. G.; Schlachter, M. F.; Elste, V.; Weber, P. (2003). Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem*. 14: 326–332.

Ramulu, P.; Udayasekhara Rao, P. (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *J Food Comp Anal*. 16: 677–685.

Reena, M. B.; Gowda, L.R.; Lokesh, B. R. (2011). Enhanced Hypocholesterolemic Effects of unteresterified Oils Are Mediated by Upregulating LDL Receptor and Cholesterol 7-α - Hydroxylase Gene Expression in Rats. *J Nutr*. 141: 24–30.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993). 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.* 123(11): 467-472.

Ribot J, Rodriguez AM, Rodriguez E, Palou A. (2008). Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring).* 16: 723–730.

Rideout, T. C.; Fan, M. Z. (2008). Guar gum consumption enhances hepatic ABCG5/G8 expression and increases ileal cholesterol excretion in pigs. *FASEB J*. 22:1092–13.

Rideout, T., Harding, S. V., Jones, P. J. H., Fan, M. Z. (2008). Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: Current understandings and future research priorities. *Vascular Health and Risk Management.* 4(5): 1023–1033.

Rique, A. B. R.; Soares, E. A.; Meirelles, C. M. (2002). Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte*. 8(6):244-54.

Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ. (2002). Long-term effects of diet on leptin, energy a intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol.* 93: 887–893.

Rogez, H. (2000). Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. *EDUFPA: Belém, Brazil*. 313p.

Ross R. (1993). Update on atherosclerosis. *Nature*. 362: 801–809.

Ross, R. (1999). Mechanisms of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340: 115–126.

Rozner, S.; Kogan, A.; Mehta, S.; Somasundaran, P.; Aserin, A.; Garti, N.; Ottaviani, M. F. (2009). Characterization of Nonionic Microemulsions by EPR. Part II. The Effect of Competitive Solubilization of Cholesterol and Phytosterols on the Nanostructure. *J Phys Chem B*. 113: 700-707.

Ruan H, Lodish HF. (2003). Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-α. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 447–455.

Rudel L, Deckelman C, Wilson M, Scobey M, Anderson R. (1994). Dietary cholesterol and downregulation of cholesterol 7α-hydroxylase and cholesterol absorption in African green monkeys. *J Clin Invest.* 93: 2463- 2472.

Rudling, M. (1992). Hepatic mRNA levels for the LDL receptor and HMG CoA reductase show coordinate regulation in vivo. *J Lipid Res* 33:493–501.

Russell, D. W.; Setchell, K. D. R. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistly*. 31: 4737-4749.

Rye, K.A.; Bursill, C. A.; Lambert, G.; Tabet, F.; Barter, P. J. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 50(suppl): S195–S200.

Sanabria, N.; Sangronis, E. (2007). Caracterización del acai o manaca (*Euterpe olerácea* Mart.): Un fruto del Amazonas. *Arch Latinoam Nutr*. 57(1): 94-98.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G. S.; Hart, A. N.; Shanbrom, E. (2006a). Antioxidant capacity and other

bioactivities of the freeze-dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem.* 54: 8604-8610.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. P. (2006b). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian Palm Berry, Euterpe oleraceae Mart. (Acai). *J Agric Food Chem*. 54: 8598-8603.
Schneeman, B. O. (1999). Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *J Nutr.* 129:1424S–7S.

Schreckinger, M. E.; Lotton, J.; Lila, M. A.; de Mejia, E. G. (2010). Berries from south america: A comprehensive review on chemistry, health potential and commercialization. *J Med Food*. 13(2): 233-46.
Sever, N.; Song, B. L.; Yabe, D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; DeBose-Boyd, R. A. (2003). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem*. 278: 52479–90.

Shah, P. K.; Kaul, S.; Nilsson, J.; Cercek, B.; (2001). Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation*. 104(19):2376-2383.

Shibata S, Hayakawa K, Egashira Y, Sanada H. (2007). Hypocholesterolemic mechanism of Chlorella: Chlorella and its indigestible fraction enhance hepatic cholesterol catabolism through up-regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71: 916-25.

Shimomura, I.; Funahashi, T.; Takahashi, M.; et al. (1996). Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*. 2: 800–3.

Shuldiner, A. R.; Yang, R.; Gong, D. W. (2001). Resistin, obesity and insulin resistance—the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med*. 345: 1345–1346.

Sierra-Honigmann, M. R.; Nath, A. K.; Murakami, C.; Garcia-Cardena, G.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C.; et al. (1998). Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 281 (5383): 1683-6.

Sierra-Johnson, J.; Romero-Corral, A.; López-Jiménez, F.; et al. (2007). Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *Am J Cardiol.* 100: 234–239.

Sikaris, K.A. (2004). The clinical biochemistry of obesity. *Clin. Biochem. Rev*. 25: 165–181.

Silva M, Silva ME, de Paula H, Carneiro CM, Pedrosa ML. (2008). Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutr Res*. 28 (6): 391-8.

Silva, P. R. (2002). Novidades na Fruticultura Paraense. *Fruticultura em Revista.* Belém, Pará. 27-31.

Singh, P.; Hoffmann, M.; Wolk, R.; et al. (2007). Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27: e302–e307.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. (2007). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileitos de Cardiologia* - 88, Suplemento I.

Song, B. L.; Sever, N.; DeBose-Boyd, R. A. (2005). Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell.* 19: 829–40.

Souza, A.; Souza, N. R.; Silva S. E. L.; Nunes, C. D. M.; Canto, A. C.; Cruz, L. A. A. (1996). Fruteiras da Amazônia. Brasília: *Embrapa–SPI.* 204p.

Souza, M. O.; Silva, M.; Silva, M. E.; Oliveira, R. P.; Pedrosa, M. L. (2010). Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 26: 804-10.

Spiegelman, B. M.; Choy, L.; Hotamisligil, G. S.; Graves, R. A.; Tontonoz, P. (1993). Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem*. 268: 6823–6.

Steppan, C. M.; Bailey, S. T.; Bhat, S.; et al. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 409: 307–12.

Tabernero, L.; Bochar, D. A.; Rodwell, V. W.; Stauffacher, C. V. (1999). Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 7167–71.

Temme, E.; Mensik, R. P.; Hornstra, G. (1996). Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr.* 63:897–903.

Trujillo, M. E.; Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 27: 762–778.

Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, Koda T, Horio F, Takahashi N, Kawada T, Osawa T. (2004). Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(1): 149-57.

Turbino-Ribeiro, S. M.; Silva, M. E.; Chianca, D. A. Jr.; De Paula, H.; Cardoso, L. M.; Colombari, E.; Pedrosa, M. L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr.* 133(1): 15-20.

Udani, J. K.; Singh, B. B.; Singh, V. J.; Barrett, M. L. (2011). Effects of Açai (Euterpe oleracea Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J*. 12: 45.

Van Bennekum, A. M.; Nguyen, D. V.; Schulthess, G.; Hauser, H.; Phillips, M. C. (2005). Mechanisms of cholesterol-lowering effects of dietary insoluble fibres: relationships with intestinal and hepatic cholesterol parameters. *Br J Nutr*. 94:331–7.

Velkoska E, Warner FJ, Cole TJ, Smith I, Morris MJ. (2010). Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 20: 49–55.

Venkatesan, N.; Devaraj, S. N.; Devaraj, H. (2007). A fibre cocktail of fenugreek, guar gum and wheat bran reduces oxidative modification of LDL induced by an atherogenic diet in rats. *Mol Cell Biochem*. 294:145–53.

Xie, C.; Kang, J.; Burris, R.; Ferguson, M. E.; Schauss, A. G.; Nagarajan, S.; Wu, X. (2011). Açaí juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*. 216:327-33.

Xiong, Q.; Xie, P.; Li, H.; Hao, L.; Li, G.; Qiu, T.; Liu, Y. (2010). Acute Effects of Microcystins Exposure on the Transcription of Antioxidant Enzyme Genes in Three Organs (Liver, Kidney, and Testis) of Male Wistar Rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 24: 361-367.

Xu, H.; Uysal, K. T.; Becherer, J. D.; Arner, P.; Hotamisligil, G. S. (2002). Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes*. 51: 1876–1883.

Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Nguyen LB, Parker TS, Chen TS, Zhao Z, Donnelly TM, Tint GS. (1995). Unexpected inhibition of cholesterol 7 α hdroxylase by cholesterol in New Zealand white and Wata-nabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest.* 95: 1497-1504.

Yamagishi, S. I.; Edelstein, D.; Du, X. L.; et al. (2001). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem.* 276: 25096–25100.

Yang, T.; Espenshade, P. J.; Wright, M. E.; Yabe, D.; Gong, Y.; Aebersold, R.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. Cell. 110(4):489-500.

Yeon, J.Y.; Kim, H.; Sung, M. (2012). Diets rich in fruits and vegetables suppress blood biomarkers of metabolic stress in overweight women. *Prev. Med.* doi:10.1016/j.ypmed.2011.12.026

Yiu, W. F.; Kwan, P. L.; Wong, C. H.; Kam, T. S.; Chiu, S. M.; Chan, S. W.; Chan, R. (2011). Attenuation of fatty liver and prevention of hypercholesterolemia by extract of Curcuma longa through regulating the expression of CYP7A1, LDL-receptor, HO-1, and HMG-CoA reductase. *J Food Sci*. 76: H80-9.

Yudkin, J. S.; Kumari, M.; Humphries, S. E.; Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 148: 209–214.

Yu, L.; Li-Hawkins, J.; Hammer, R. E.; Berge, K. E.; Horton, J. D.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*. 110: 671–680.

Yu, H.; Pandit, B.; Klett, E.; Lee, M. H.; Lu, K.; Helou, K.; Ikeda, I.; Egashira, N.; Sato, M.; Klein, R.; Batta, A.; Salen, G.; Patel, S. B. (2003). The rat STSL locus: characterization, chromosomal assignment, and genetic variations in sitosterolemic hypertensive rats. *BMC Cardiovasc Disord* 3:4–23.

Walker, R. (1994). Hyperlipidaemia. In Clinical Pharmacy and Therapeutics; Walter, R., Edwards, C., Eds.; Churchill Livingstone: New York, 1994; pp 309 325.

Wang, B.; Jenkins, J. R.; Trayhurn, P. (2005). Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: Integrated response to TNF-{alpha}. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288: E731–E740.

Wang, T.; Palucci, D.; Law, K.; Yanagawa, B.; Yam J.; Butany, J. (2012). Atherosclerosis: pathogenesis and pathology. *Diagnostic Histopathology*. article in press; doi.org/10.1016/j.mpdhp.2012.09.004.

Weisberg, S. P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R. L.; Ferrante, A.W. Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112: 1796–1808.
White, D.A.; Bennett, A. J.; Billett, M.A.; Salter, A. M. (1998). The assembly of triacylglycerol-rich lipoproteins: an essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr*. 80: 219-29.

Williams, K. J.; Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 551–561.

Woollett, L. A.; Spady, D. K.; Dietschy, J. M. (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res*. 33:77–88.

World Health Organization. (2008). Causes of death 2008. Geneva. http://www.who.int/healthinfo/ global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf.

Zern TL, Fernandez ML. 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. J Nutr 135: 2291-4.

http://foodbizdaily.com/archive/2009/08/10/91816-the-acai-berry-trade-opportunity-a-quick-report.aspx (acessado em Novembro de 2009).

http://www.google.com.br/ (acessado em Fevereiro de 2012).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (acessado em Maio de 2012).

http://flipper.diff.org/app/pathways/info/473 (acessado dia 31 de março de 2012).

Ministério da Saúde. URL:http://www.datasus.gov. (acessado em 29 de novembro de 2012).

Capítulo 10 - Anexos

Anexo I – Protocolos das dosagens bioquímicas séricas

I.1 - Alanina Aminotransferase

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

$$\text{L-Alanina} + \text{Cetoglutarato} \xrightarrow{ALT} \text{Piruvato} + \text{L-Glutamato}$$

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} \xrightarrow{LDH} \text{L-Lactato} + \text{NAD}$$

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 ºC e por 2 semanas a 10 ºC negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 ºC e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmo/L, NADH 180

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 ºC capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37ºC com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.
1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.

3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 ºC.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto (ΔA/minuto) e utilizar para calcular o resultado.
ALT/GPT (U/L) 340 nm = Δ A/minuto x 1746
Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

I.2 - Aspartato Aminotransferase

Princípio

A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

$$\text{L-Aspartato} + \text{Cetoglutarato} \xrightarrow{AST} \text{Oxalacetato} + \text{L-Glutamato}$$

$$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} \xrightarrow{MDH} \text{L-Malato} + \text{NAD}$$

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmo/l, NADH 180 µmol/l, LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 ºC capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37ºC com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 ºC.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto (ΔA/minuto) e utilizar para calcular o resultado.
AST/GOT (U/L) 340 nm = Δ A/minuto x 1746
Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

I.3 - Colesterol HDL

Princípio

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8ºC.

Produto Utilizado

Colesterol HDL, Catálogo 13 - ANVISA - 10009010026
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.
Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

Procedimento

Precipitação das VLDL e LDL: Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria a 37 ºC durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\textit{Absorbância do Teste}}{\textit{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

I.4 - Colesterol Total

Princípio

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:

$$\text{Ésteres de colesterol} \xrightarrow{\textit{Colesterol Esterase}} \text{Colesterol} + \text{Ácidos graxos}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow{\textit{Colesterol Oxidase}} \text{Colest-4-en-ona} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Fenol} + \text{4-Aminoantipirina} \xrightarrow{\textit{Peroxidase}} \text{Antipirilquinonimina} + 4H_2O$$

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 ºC e vários meses a 10 ºC negativos.

Produto Utilizado

Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.
Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria 37 ºC 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026.

Anexo II – Protocolo das dosagens de imunoensaio do tipo Elisa

II.1 - Leptina

Rat Leptin Elisa Kit (Crystal Chem. Inc., Downers Grove, IL., USA)
(Catálogo # 90040)

Princípio da técnica

1° reação

A leptina de rato na amostra é simultaneamente ligada ao anticorpo de coelho anti-leptina imobilizado na microplaca e o anticorpo anti-leptina IgG de porco é adicionada a cada poço.

Lavagem

O material não ligado é removido através da lavagem.

2° reação

O anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti IgG de porco) é ligado ao complexo leptina / anticorpo primário imobilizado na microplaca.

Lavagem

O Excesso de anticorpo conjugado é removido através da lavagem.

Reação Enzimática

O anticorpo conjugado ligado ao anticorpo primário na microplaca é detectado pela adição da solução substrato 3, 3', 5, 5'-tetramethybenzidine (TMB).

Preparo dos reagentes

Solução estoque de leptina de rato

Reconstitua o padrão de leptina de rato liofilizado pela adição cuidadosa de 100 µL do diluente da amostra ao frasco. Gentilmente agite por inversão o frasco até o

conteúdo estar completamente dissolvido. Esta solução estoque contém 25,6 ng/mL de leptina de rato.

Conjugado enzima anti IgG de porco

Prepare o volume necessário da solução enzima anticorpo conjugado misturando o conteúdo do frasco solução estoque "conjugado enzima anti IgG de porco" com o do "diluente enzima conjugado" e misture até obter uma solução homogênea e clara.

Tampão de Lavagem

Na solução estoque tampão de lavagem deve ser adicionado 1L de água destilada ou deionizada. Misture bem antes do uso.

Soluções fornecidas prontas para uso:

Microplaca com anticorpo ligado, anticorpo anti leptina de porco, solução substrato enzimático, solução de parada da reação enzimática (1N ácido sulfúrico) e diluente da amostra.

Preparo dos padrões de trabalho de leptina de rato

Primeiramente, pipete 50 µL do diluente da amostra e 50 µL da solução estoque de leptina (25,6ng/mL) em um microtubo de polipropileno marcado 12,8 ng/mL e misture;

Distribua 50 µL do diluente da amostra em seis tubos marcados 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 ng/mL respectivamente.

Pipete 50 µL do padrão 12,8 ng/mL dentro do tubo 6,4 ng/mL e misture;

Pipete 50 µL do padrão 6,4 ng/mL dentro do tubo 3,2 ng/mL e misture;

Repita este esquema de diluição com os tubos remanescentes;

Pipete 50 µL do diluente da amostra em um tubo marcado com 0ng/mL.

Procedimento do teste:

Primeira Reação

1. Lave a microplaca 2 vezes usando 300µL do tampão de lavagem por poço. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
2. Em cada poço da microplaca coloque 45µL do diluente da amostra;
3. Em cada poço da microplaca coloque 50µL do anicorpo anti-leptina de porco;
4. Em cada poço da microplaca adicione 5 µL do soro (ou os padrões de trabalho 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 ng/mL de leptina);
5. Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 16 a 20hs a 4°C;

Segunda Reação

6. Aspire o conteúdo dos poços e lave 5 vezes usando 300 µL do tampão de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
7. Adicione 100 µL do conjugado enzima anticorpo anti IgG;
8. Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 3hs a 4°C;

Terceira Reação

9. Aspire o conteúdo dos poços e lave 7 vezes usando 300 µL do tampão de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
10. Imediatamente coloque 100 µL da solução substrato enzimático e deixe reagir por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante a reação evite exposição da microplaca à luz;
11. Pare a reação enzimática através da adição de 100 µL da solução de parada da reação enzimática;
12. Determine a absorbância dentro de 30 minutos (Determine os valores A_{450} e substraia os valores A_{630}).

Avaliação dos resultados

A concentração sérica de leptina é determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de leptina de rato.

II.2 - Adiponectina

Kit Rat Adiponectin Kit (Invitrogen Immunoassay, Carlsbad, CA, USA)
(Catálogo # KRP004)

Princípio da técnica

1° reação

A adiponectina de rato presente na amostra é ligada ao anticorpo anti-adiponectina de rato imobilizado na microplaca.

Lavagem

O material não ligado é removido através da lavagem.

2° reação

O anticorpo secundário conjugado (anti IgG de camundongo) é ligado ao complexo adiponectina / anticorpo primário imobilizado na microplaca

Lavagem

O Excesso de anticorpo conjugado é removido através da lavagem.

Reação Enzimática

O anticorpo conjugado ligado ao anticorpo primário na microplaca é detectado pela adição da solução substrato.

Preparo dos reagentes

Solução de lavagem

O concentrado de lavagem deve ser diluído com água deionizada na proporção 1:5. Misture bem antes do uso.

Diluente

Dilua o diluente em água deionizada na proporção 1:5.

Detector

Dilua o detector com o diluente previamente preparado na proporção 1:100. Misture cuidadosamente.

Solução Substrato

Prepare a solução substrato adicionando uma parte de "substrato I" a uma parte de "substrato II" (reagentes cromogênicos).

Soluções fornecidas prontas para uso:

Microplaca com anticorpo ligado, anticorpo anti adiponectina de rato e solução de parada da reação enzimática (MH_3PO_4).

Preparo dos padrões de trabalho de adiponectina de rato

Primeiramente, adicione 1 mL de água deionizada no frasco do padrão para o preparo de uma solução estoque de adiponectina na concentração 48 ng/mL e misture;

Em seguida, marque 8 microtubos de 0 a 7 e adicione 200 µL do diluente em todos os tubos;

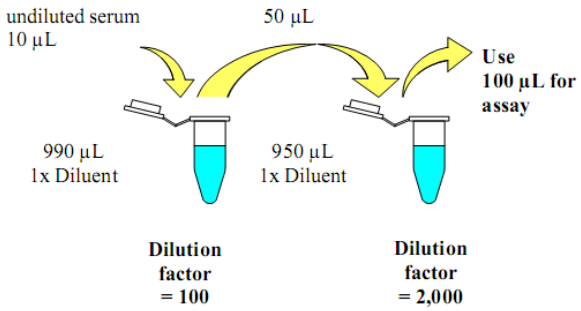
Adicione 200 µL da solução estoque padrão ao tubo 7 e misture. O tubo padrão 7 tem concentração de 24 ng/mL;

Os tubos padrões 6 a 1 são preparados pela adição de 200 µL do tubo anterior;

No tubo com a concentração 0 ng/mL não é adicionado a solução padrão.

Preparo da amostra

Dilua o soro com o diluente previamente preparado na proporção 1:100 e misture bem. Em seguida, dilua novamente a amostra com o diluente na proporção 1:20. Conforme o esquema abaixo.



Procedimento do teste:

1. Em cada poço da microplaca pipete 100 µL dos padrões de trabalho 0 a 7 e da amostra diluída. Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 1 h a 37°C;
2. Aspire o conteúdo dos poços e lave 3 vezes com 250 µL da solução de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
3. Em seguida, adicione 100 µL do anticorpo secundário a cada poço da microplaca. Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 1 h a 37°C;
4. Aspire o conteúdo dos poços e lave 3 vezes com 250 µL de solução de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
5. Adicione 100 µL do detector a cada poço. Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 1 h a 37°C;

6. Aspire o conteúdo dos poços e lave 5 vezes com 250 µL da solução de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
7. Imediatamente coloque 100 µL da solução substrato e deixe agir por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante a reação evite exposição da microplaca da luz;
8. Pare a reação enzimática através de adição de 100 µL da solução de parada da reação enzimática;
9. Determine a absorbância dentro de 30 minutos a 450 nm.

Avaliação dos resultados

A concentração de adiponectina é determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de adiponectina de rato.

II.3 – TNF-α

Rat TNF-α Elisa Kit (Invitrogen Immunoassay, Carlsbad, CA, USA)
(Catálogo # KRC3011)

Princípio da técnica

1° reação

O TNF-α de rato presente na amostra é ligada ao anticorpo anti-TNF-α de rato imobilizado na microplaca.

Lavagem

O material não ligado é removido através da lavagem.

2° reação

O anticorpo secundário conjugado (específico para TNF-α de rato) é ligado ao complexo TNF-α / anticorpo primário imobilizado na microplaca

Lavagem

O Excesso de anticorpo conjugado é removido através da lavagem.

Reação Enzimática

A enzima Streptavidina-Peroxidase é adicionada e se liga ao anticorpo conjugado ligado ao anticorpo primário na microplaca. Em seguida, adiciona-se a solução substrato que se liga a enzima e produz cor.

Preparo dos reagentes

Tampão de lavagem diluído:

Dilua 1 volume da "Solução de lavagem concentrada (25X)" com 24 volumes de água deionizada, por exemplo, 50 ml da solução de lavagem concentrada pode ser diluída para 1,25 litros de água deionizada.

Streptavidina-HRP Solução de trabalho

Dilua 10 ml da solução de *Sreptavidin-HRP* concentrada 100X em 1 ml da solução *Streptavidin-HRP* Diluente. Misture delicadamente e a utilize em no máximo 15 minutos.

Soluções fornecidas prontas para uso:

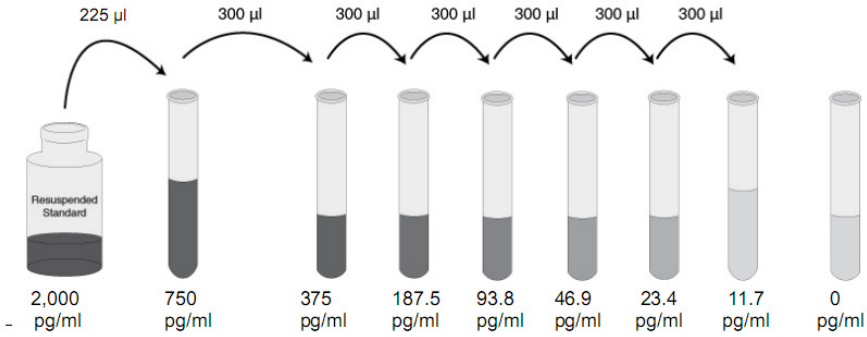
Microplaca com anticorpo ligado, anticorpo secundário conjugado, tampão diluente do padrão, tampão de incubação, solução substrato e solução de parada da reação enzimática.

Preparo dos padrões de trabalho de TNF-α de rato

Primeiramente, reconstitua o padrão fornecido com a adição cuidadosa do tampão diluente do padrão. Misture delicadamente por inversão o frasco até o conteúdo estar completamente dissolvido. Esta solução estoque contém 2.000 pg/ml de TNF-α de rato.

Em seguida, adicione 0,225 ml dessa suloção estoque em um microtubo de polipropileno contendo 0,375 ml de tampão diluente do padrão. Misture delicadamente e marque o microtubo como 750 pg/ml de TNF-α de rato.

Adicione 0,300 ml de tampão diluente do padrão em 6 microtubos rotulados 375, 187,5, 93,8, 46,9, 23,4 e 11,7 pg/ml de TNF-α de rato. Faça diluições seriadas do padrão como descrito no diagrama. Misturar bem entre as etapas e no microtubo zero pipete 0,300 mL tampão diluente padrão.



Preparo da amostra

Dilua o soro com o tampão de incubação na proporção 1:2 e misture bem.

Procedimento do teste

1) Em cada poço da microplaca adicione 100 µL da amostra e dos padrões de trabalho de 0 a 7;
2) Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 2hs a temperatura ambiente;
3) Aspire o conteúdo dos poços e lave 4 vezes usando 400 µL do tampão de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;

4) Adicione 100 µl do anticorpo secundário conjugado em todos os poços da microplaca, exceto nos brancos.
5) Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 1h a temperatura ambiente;
6) Aspire o conteúdo dos poços e lave 4 vezes usando 400 µL do tampão de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
7) Adicione 100 µl da streptavidina-HRP Solução de trabalho em todos os poços da microplaca, exceto nos brancos;
8) Cubra a microplaca com a tampa de plástico e incube por 30 minutos a temperatura ambiente;
9) Aspire o conteúdo dos poços e lave 4 vezes usando 400 µL do tampão de lavagem. Após cada lavagem remova qualquer solução remanescente por inversão e cubra a placa firmemente com um papel toalha;
10) Imediatamente coloque 100 µL da solução substrato e deixe agir por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante a reação evite exposição da microplaca da luz;
11) Pare a reação enzimática através de adição de 100 µL da solução de parada da reação enzimática;
12) Determine a absorbância dentro de 30 minutos a 450 nm.

Avaliação dos resultados

A concentração de TNF-α é determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de TNF-α de rato.

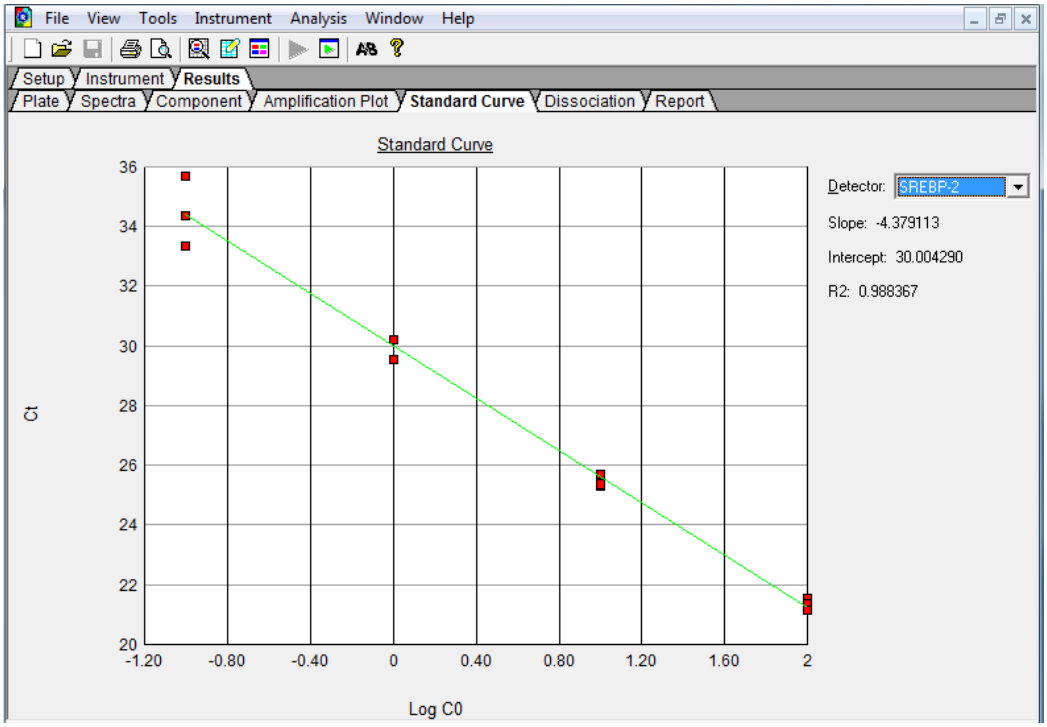
Anexo III – Concentração e pureza do RNA extraído do fígado

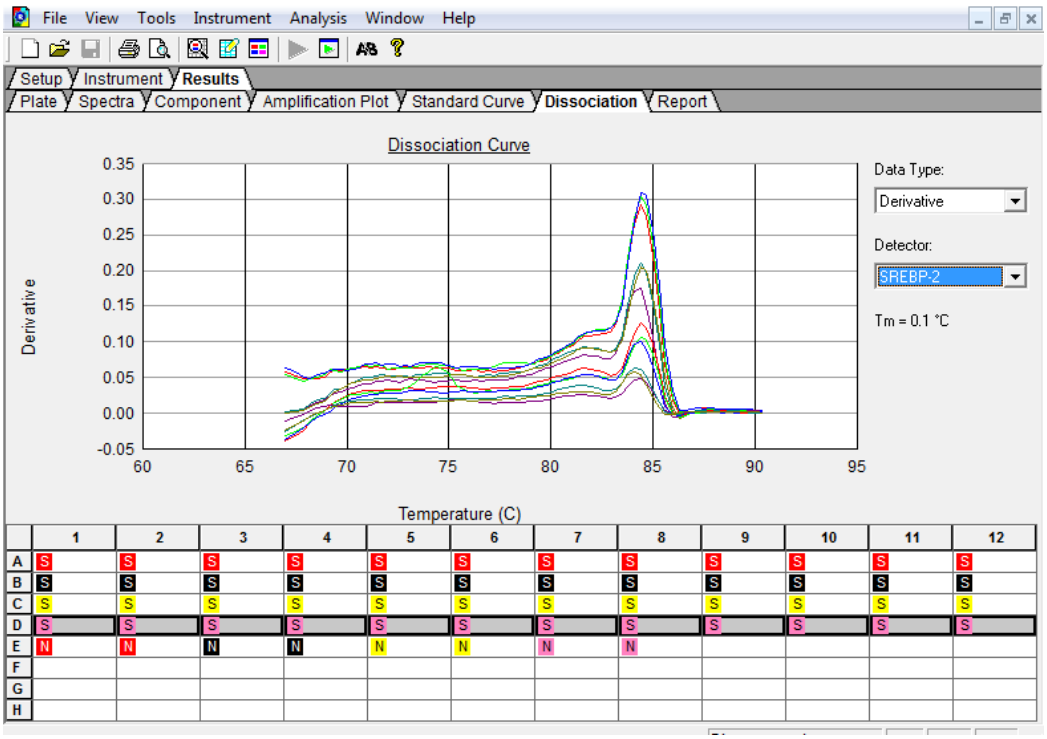
Animais	Concentração (micrograma/microlitro)	Razão A260/A280 nm
1	3,426	2,033
2	4,154	1,953
3	4,241	1,806
4	3,852	1,99
5	2,618	1,972
6	3,361	1,974
7	4,219	1,924
8	3,598	2,035
9	3,268	2,031
10	3,315	2,033
11	3,706	1,974
12	2,283	1,967
13	1,32	2,048
14	0,72	2,055
15	3,253	1,999
16	0,6928	1,948
17	0,654	1,946
18	1,078	2,003
19	1,175	2,044
20	0,6124	2,033
21	1,061	2,053
22	0,7664	1,963
23	0,7812	2,03
24	1,075	2,043

Grupo Controle: 1-6; Grupo Controle + Açaí: 7-12; Grupo Hipercolesterolêmico: 13-18; Grupo Hipercolesterolêmico + Açaí: 19-24.

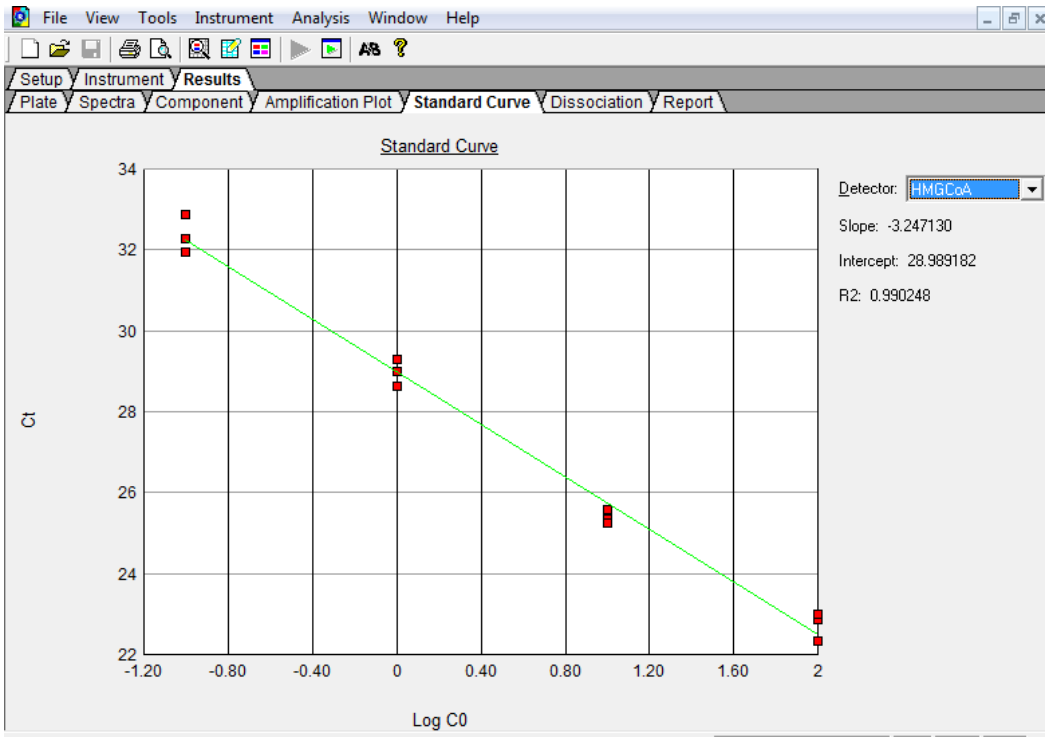
Anexo IV – Curva padrão e curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores

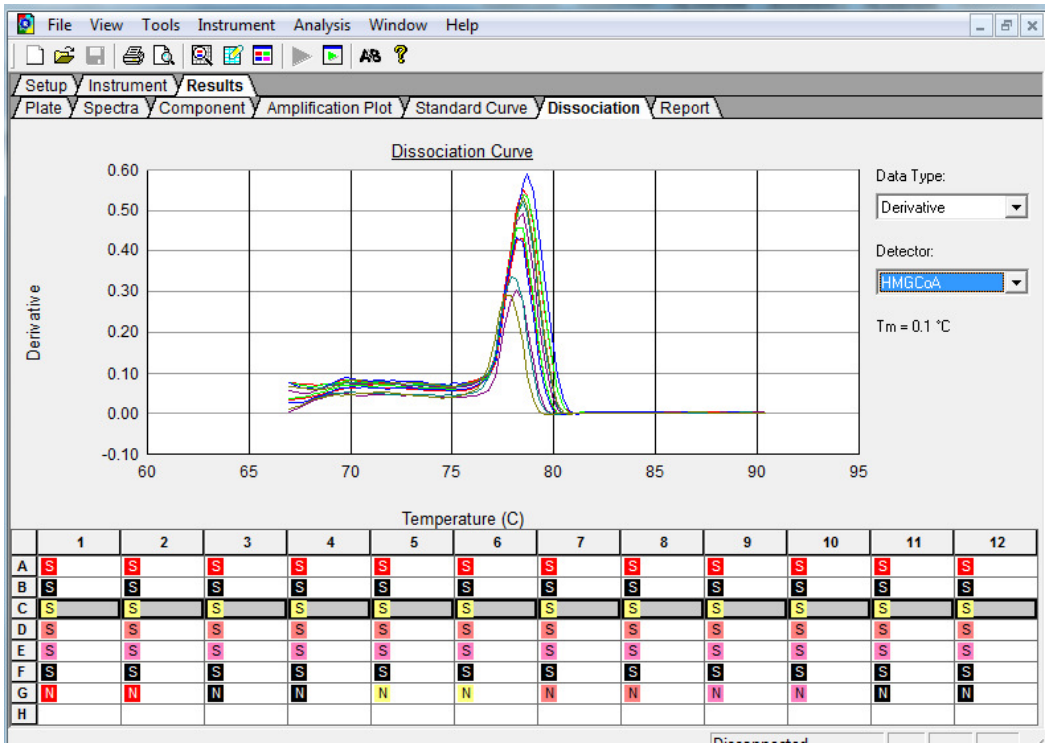
IV.1 - SREBP-2



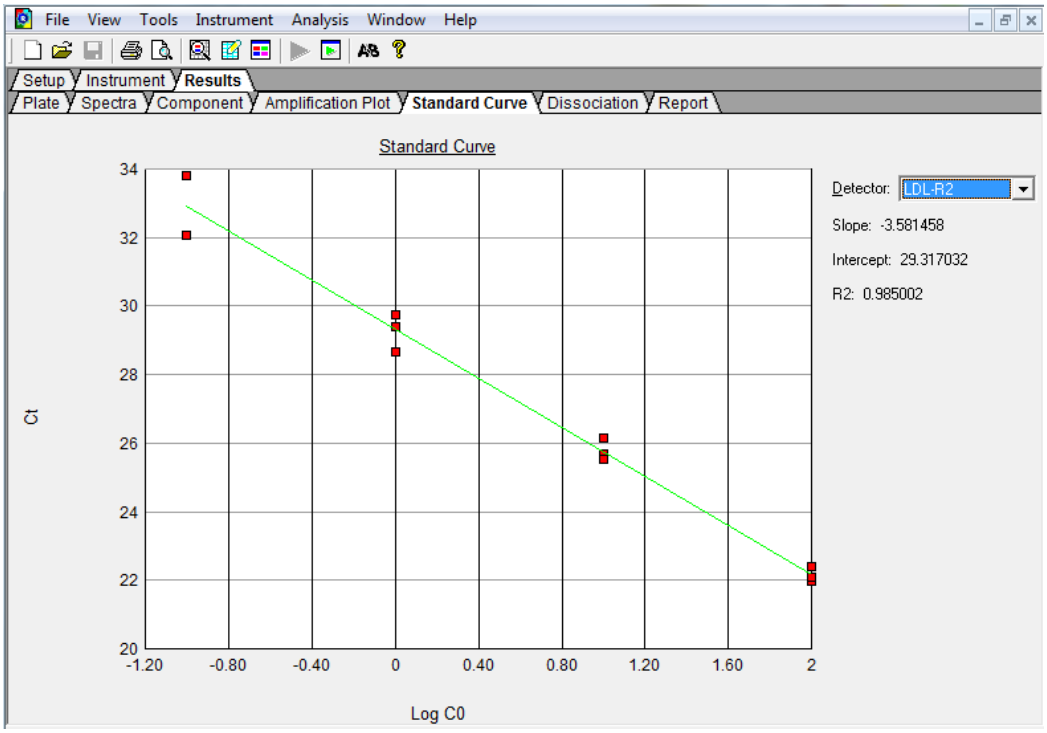


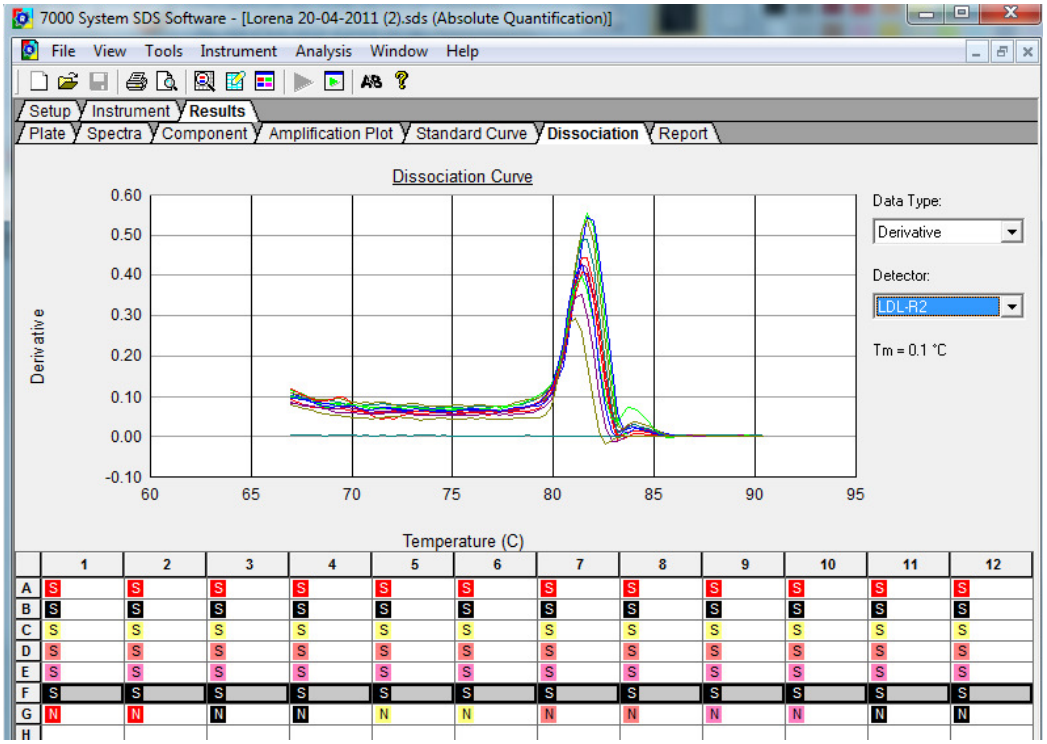
IV.2 - HMG CoA-R


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: HMGCoA
Slope: -3.247130
Intercept: 28.989182
R2: 0.990248
Ct
Log C0

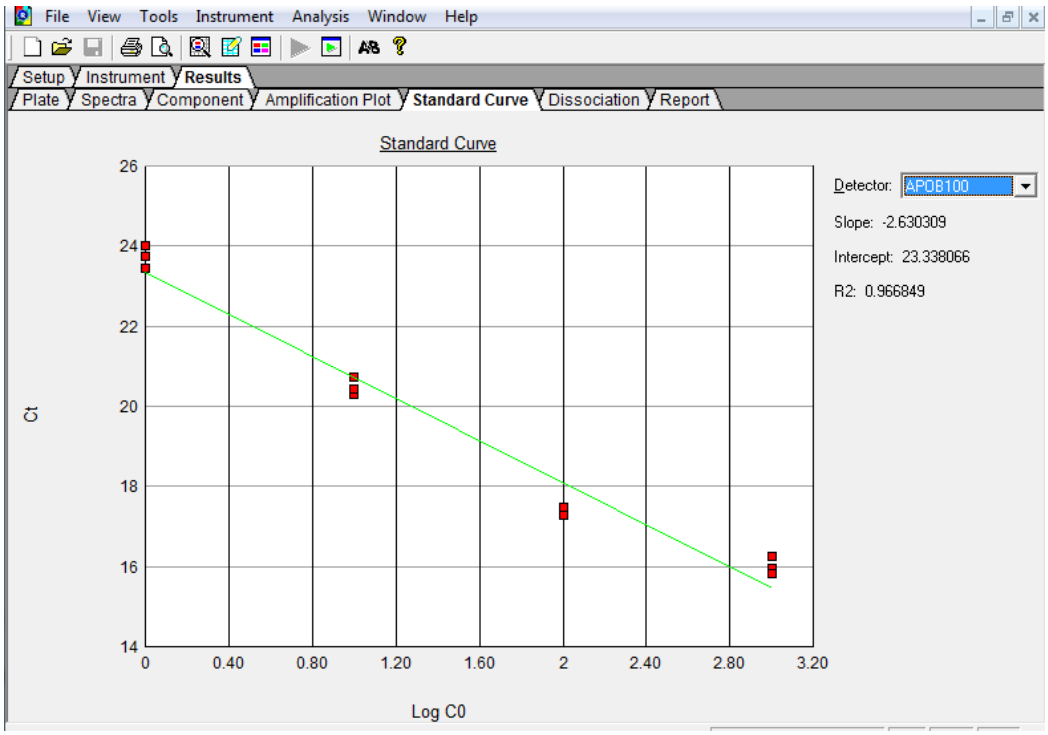

File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
HMGCoA
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)

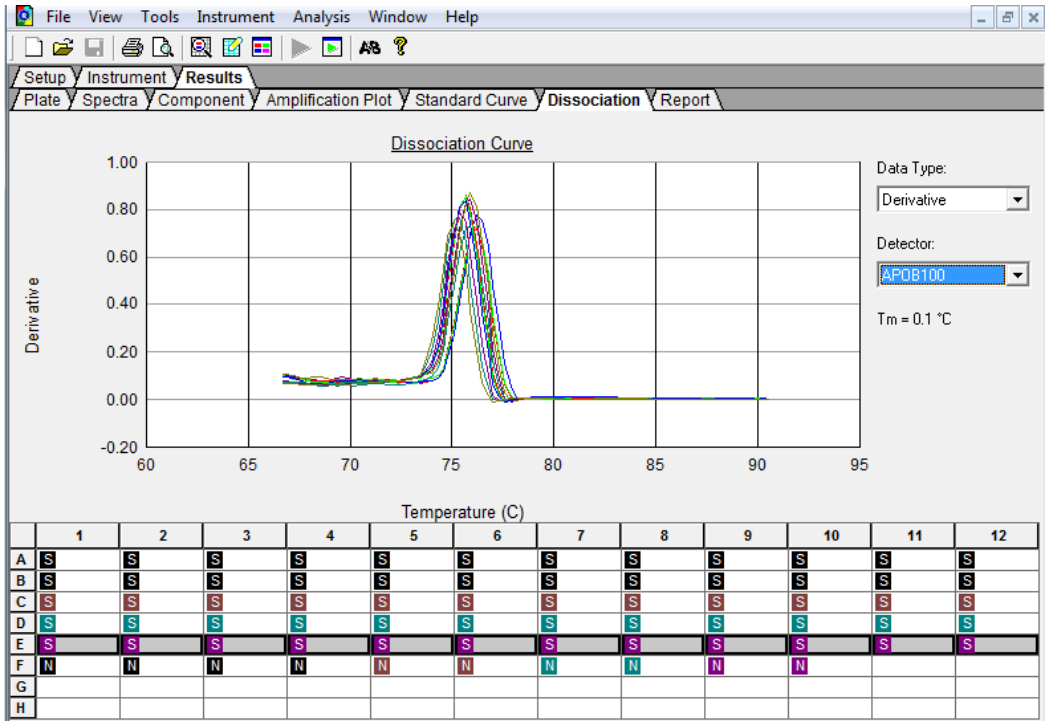
IV.3 - LDL-R


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: LDL-R2
Slope: -3.581458
Intercept: 29.317032
R2: 0.985002
Ct
Log C0

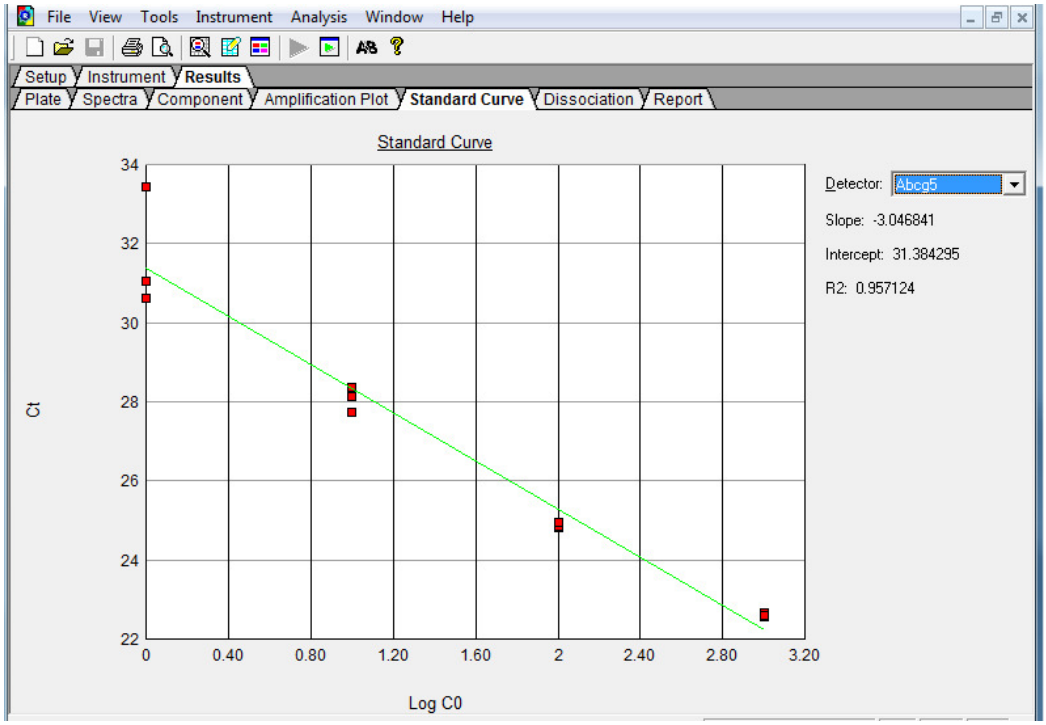

7000 System SDS Software - [Lorena 20-04-2011 (2).sds (Absolute Quantification)]
File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
LDL-R2
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)

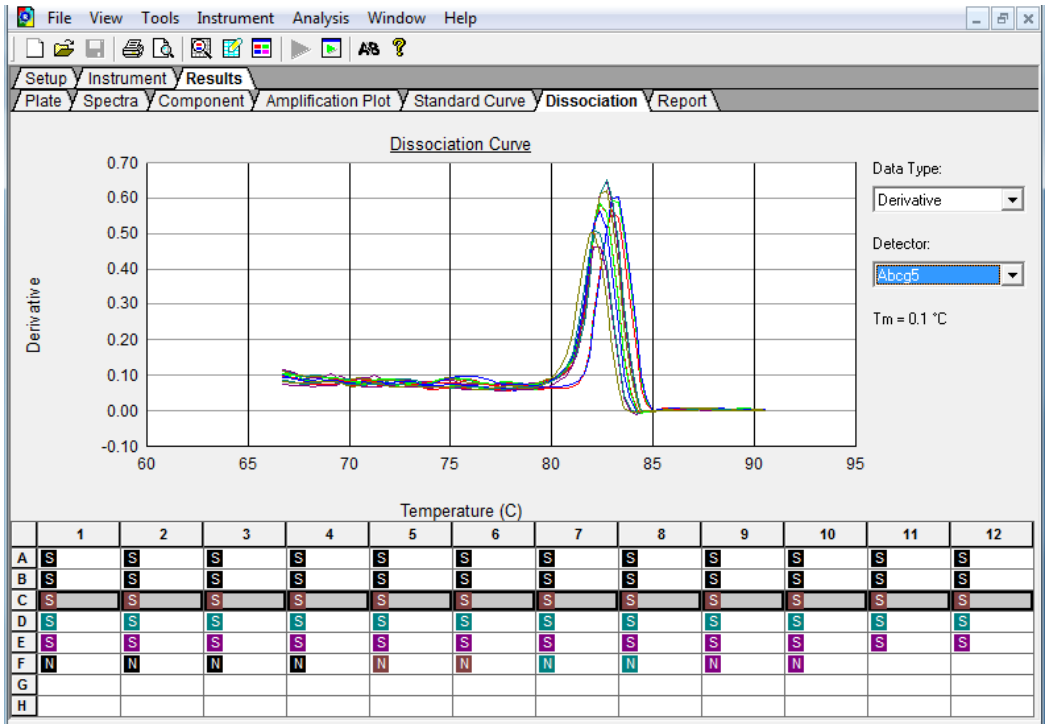
IV.4 – Apo B100


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: APOB100
Slope: -2.630309
Intercept: 23.338066
R2: 0.966849
Ct
Log C0
26
24
22
20
18
16
14
0
0.40
0.80
1.20
1.60
2
2.40
2.80
3.20

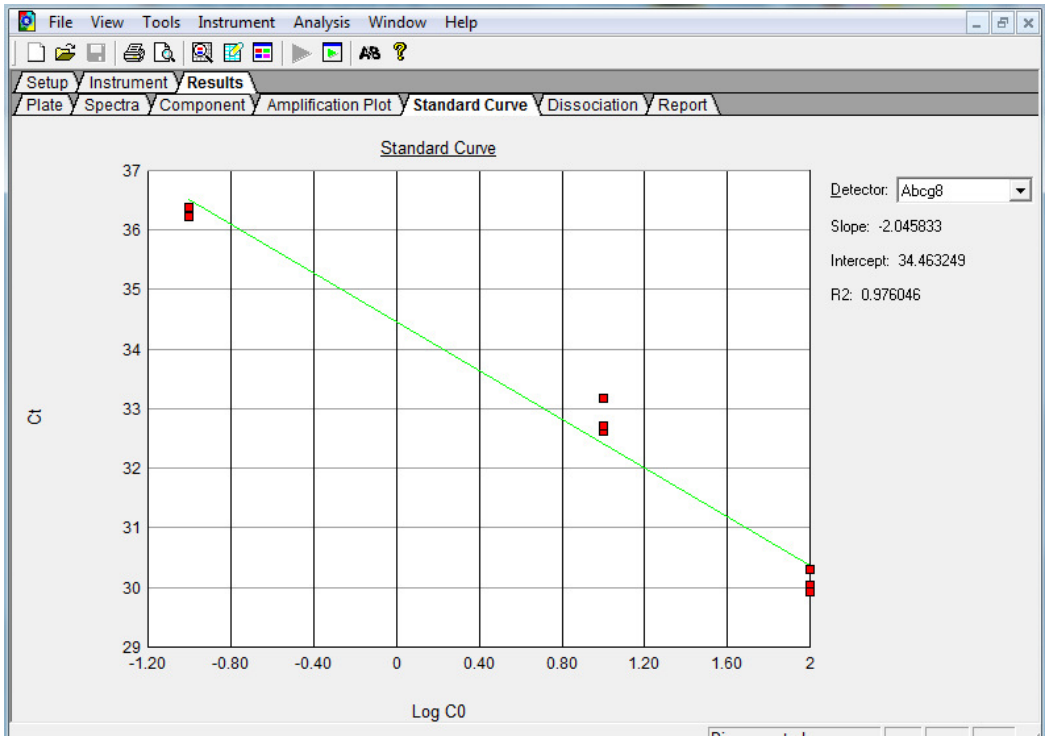

File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
APOB100
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
60
65
70
75
80
85
90
95

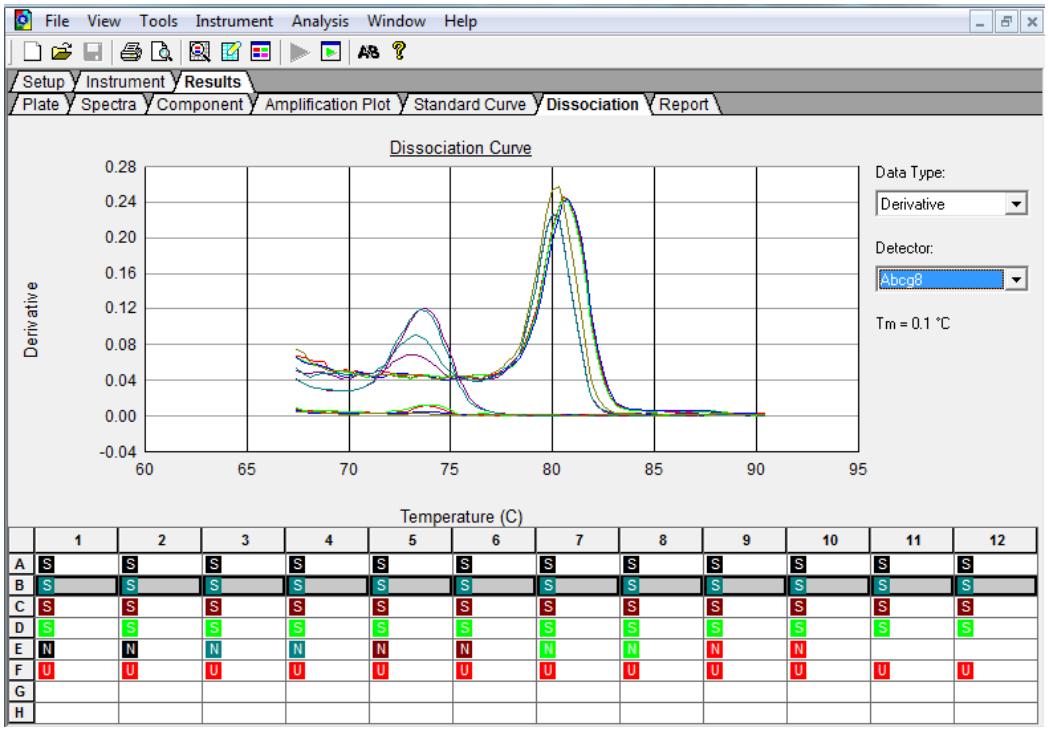
IV.5 - ABCG5


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: Abcg5
Slope: -3.046841
Intercept: 31.384295
R2: 0.957124
Ct
Log C0
34
32
30
28
26
24
22
0
0.40
0.80
1.20
1.60
2
2.40
2.80
3.20

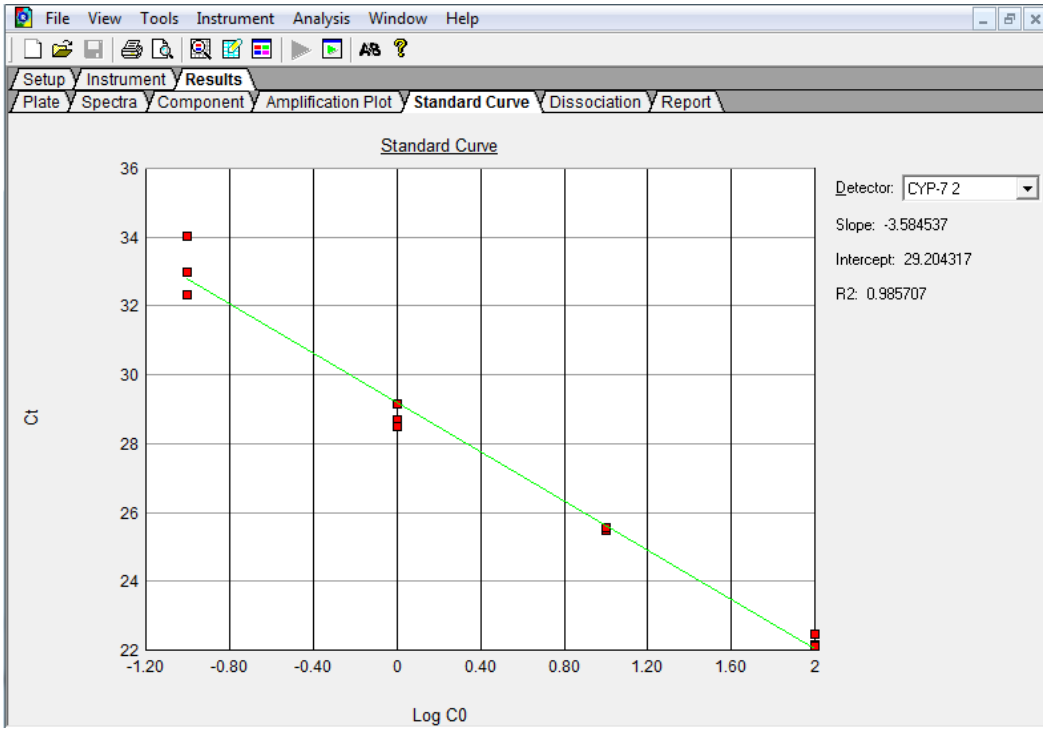

File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
Abcg5
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
-0.10
60
65
70
75
80
85
90
95
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A B C D E F G H

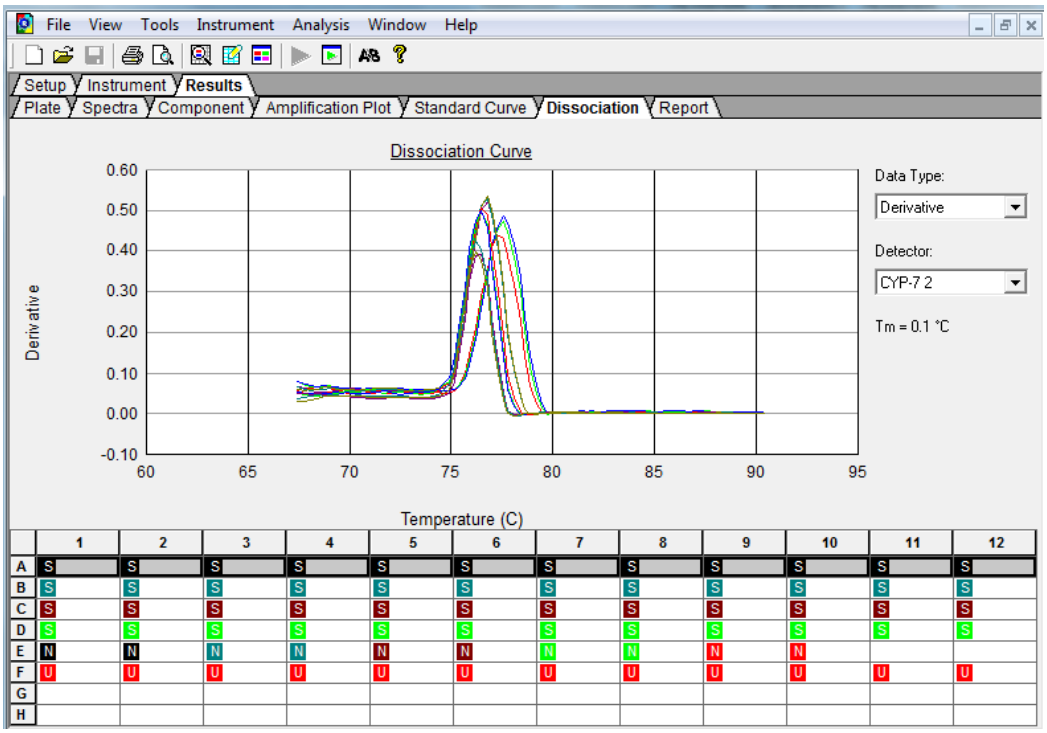
IV.6 - ABCG8


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: Abcg8
Slope: -2.045833
Intercept: 34.463249
R2: 0.976046
Ct
Log C0

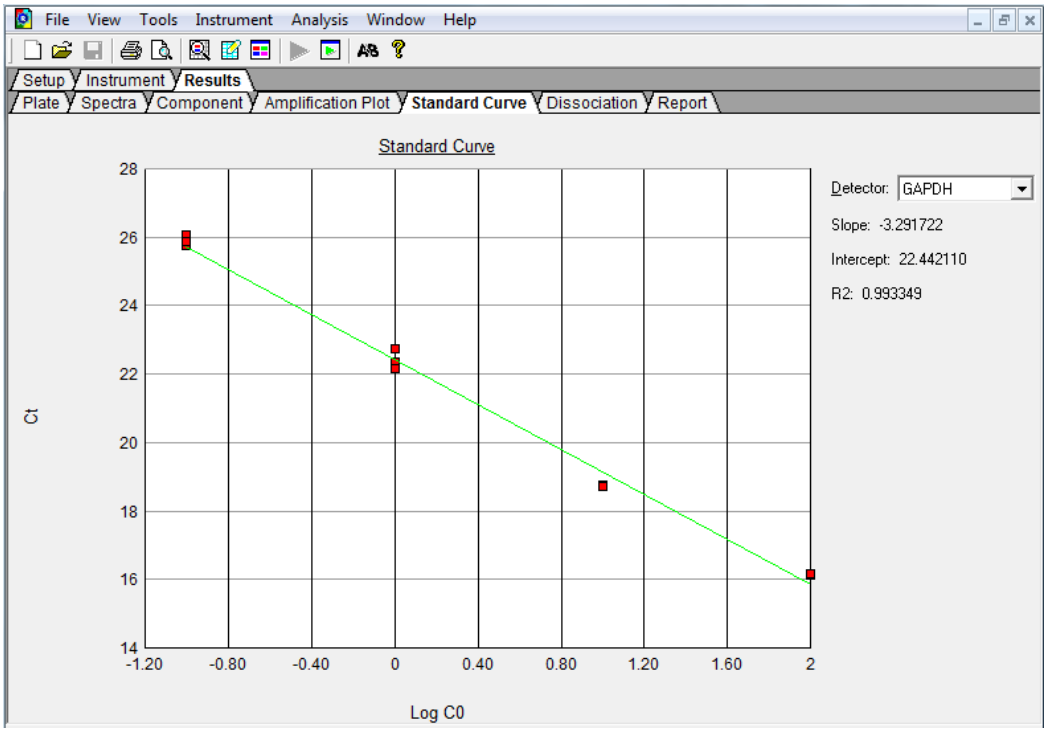

File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
Abcg8
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)

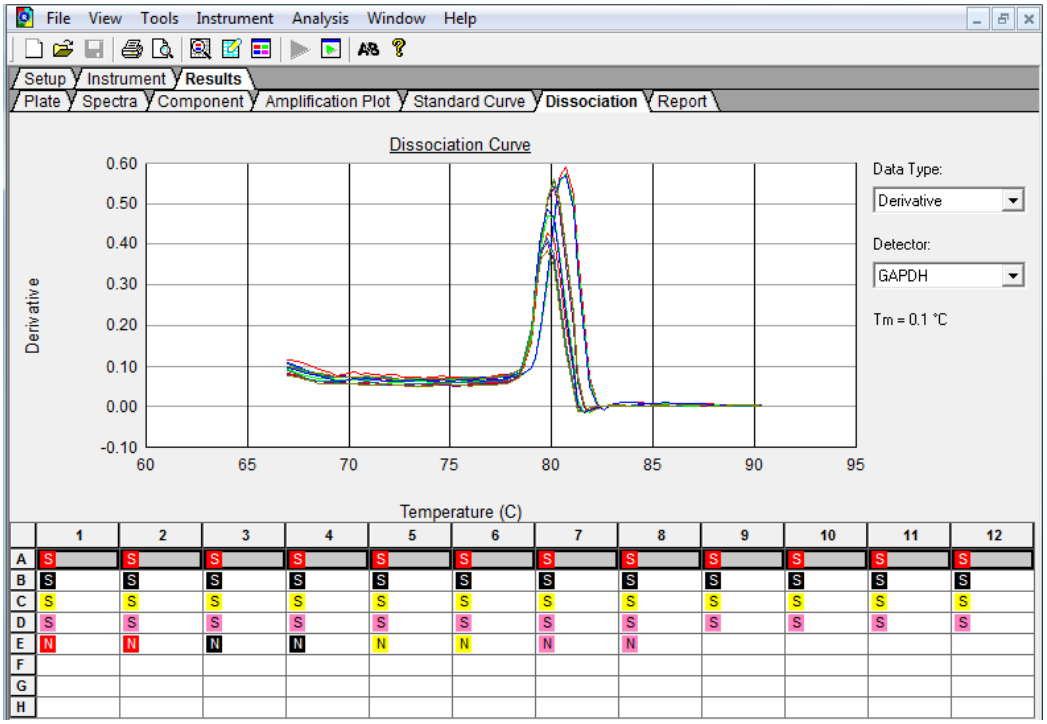
IV.7 - CYP7A1


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: CYP-7 2
Slope: -3.584537
Intercept: 29.204317
R2: 0.985707
Ct
Log C0


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
CYP-7 2
Tm = 0.1 °C
Derivative
Temperature (C)

IV.8 - GAPDH


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Standard Curve
Detector: GAPDH
Slope: -3.291722
Intercept: 22.442110
R2: 0.993349
Ct
28
26
24
22
20
18
16
14
-1.20 -0.80 -0.40 0 0.40 0.80 1.20 1.60 2
Log C0


File View Tools Instrument Analysis Window Help
Setup Instrument Results
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report
Dissociation Curve
Data Type:
Derivative
Detector:
GAPDH
Tm = 0.1 °C
Derivative
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
-0.10
60 65 70 75 80 85 90 95
Temperature (C)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A S S S S S S S S S S S S
B S S S S S S S S S S S S
C S S S S S S S S S S S S
D S S S S S S S S S S S S
E N N N N N N N N
F
G
H