



UFOP

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



RENATA REBECA PEREIRA E SILVA

**EFEITO PROTETOR DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) NA DOENÇA  
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA MEDIADO PELO  
AUMENTO DOS NÍVEIS DE PARAOXONASE-1 E REDUÇÃO DA  
OXIDAÇÃO DE LDL EM RATOS**

OURO PRETO – MINAS GERAIS

2017

**RENATA REBECA PEREIRA E SILVA**

**EFEITO PROTETOR DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) NA DOENÇA  
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA MEDIADO PELO  
AUMENTO DOS NÍVEIS DE PARAOXONASE-1 E REDUÇÃO DA  
OXIDAÇÃO DE LDL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Lucia Pedrosa  
**Coorientador:** Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

**OURO PRETO – MINAS GERAIS**

**2017**

S381e

Silva, Renata Rebeca Pereira e.

Efeito protetor do açaf (Euterpe oleracea Mart.) na doença hepática gordurosa não alcoólica mediado pelo aumento dos níveis de paraoxonase-1 e redução da oxidação de LDL em ratos [manuscrito] / Renata Rebeca Pereira e Silva. - 2017. xxiv, 119pf.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Pedrosa.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Açaf. 2. Polifenóis. 3. Esteatose hepática. 4. Stress oxidativo. I. Pedrosa, Maria Lucia. II. Silva, Marcelo Eustáquio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.36

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:**

**“Efeito protetor do açaí (Euterpe oleracea Mart.) na doença hepática gordurosa não alcoólica mediado pelo aumento dos níveis de Paraoxonase-1 e redução da oxidação de LDL em ratos”**

Aos vinte e um dias do mês de abril de 2017, às 13 horas e 30 minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Renata Rebeca Pereira. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Caldeira Costa  
Examinadora (UFOP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Lopes de Brito Magalhães  
Examinadora (UFOP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely Gomes de Figueiredo  
Examinadora (UFES)

Prof. Dr. Rômulo Leite  
Examinador (UFOP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lucia Pedrosa (UFOP)

DATA DA DEFESA: **21/07/2017**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário

Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681

E-mail: [cbiol@nupeb.ufop.br](mailto:cbiol@nupeb.ufop.br) / [www.nupeb.ufop.br/cbiol](http://www.nupeb.ufop.br/cbiol)

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

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Marcolino e Aparecida, pelo amor incondicional.

Ao meu esposo Thiago e à minha filha Sofia,

Obrigado por estarem ao meu lado e por entenderem as minhas ausências.

## AGRADECIMENTOS

À querida professora **Maria Lucia Pedrosa**, minha orientadora, que me recebeu e acolheu com carinho no Laboratório de Bioquímica Metabólica. Obrigada por ter confiado a mim a condução desse trabalho, por ter contribuído de forma tão grandiosa com os seus conhecimentos científicos e por todo o aprendizado que você me proporcionou durante esses quatro anos. Você é um exemplo de profissional e de pessoa que admiro, pois aprendi com você lições de generosidade, humildade e caráter, que muito me ajudaram a evoluir tanto profissional como pessoalmente, que sempre levarei comigo.

Ao professor **Marcelo Eustáquio Silva**, agradeço pela oportunidade, incentivo, por estar sempre à disposição para me ajudar e por todas as sugestões de elevado valor científico, que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para a minha formação.

Agradeço à **Universidade Federal de Ouro Preto** e ao **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas** (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto, pela excelente oportunidade de formação e conhecimentos adquiridos.

À **Isabel Cristina Mallosto Emerich de Abreu**, que me ajudou de uma maneira muito especial para que eu desenvolvesse esse trabalho. Obrigada por me incentivar a conduzir esse trabalho.

À querida professora **Joyce Ferreira da Costa Guerra**, obrigada por dividir comigo os seus conhecimentos, pelo apoio, dedicação, carinho e acima de tudo, sua amizade. Obrigada por tudo, principalmente por me ajudar na realização dos experimentos e estar sempre disposta a ensinar. Tenho por você muito carinho e admiração.

À querida amiga **Nara Nunes**, pela amizade e companheirismo. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos e por compartilhar comigo os momentos vividos na bancada do laboratório. Tenho por você uma enorme gratidão, pois você é uma amiga para todas as horas.

A todos os colegas dos Laboratórios de Bioquímica Metabólica e Nutrição Experimental, em especial, às professoras **Maísa Silva** e **Larissa Bonomo**, às amigas e companheiras **Juliana Lopes**, **Mayara Medeiros**, **Waleska Dornas**, **Ana Maria Viana**, **Alice Paulino**, **Helena Zago**

e **Jaqueline Ferreira**, por dividirem comigo a bancada, as alegrias, as risadas, as angústias e as confraternizações. A minha gratidão e a certeza de que, sem vocês este trabalho não teria sido possível.

Ao professor **Wanderson Geraldo de Lima**, agradeço pela atenção, ajuda nas análises histológicas desse trabalho e por todos os ensinamentos.

À **Mariana Siqueira Lacerda Mamede**, agradeço pela ajuda na dosagem de proteínas para análise da expressão proteica.

Aos professores **Luis Carlos Crocco Afonso, William de Castro Borges e Ieso de Miranda Castro**, agradeço pela disponibilidade em me ajudar e por gentilmente disponibilizarem os seus laboratórios para o desenvolvimento de algumas metodologias.

Ao professor **Rogelio Lopes Brandão**, agradeço por ter me dado a oportunidade de iniciar na carreira científica e por todos os ensinamentos.

À professora **Daniela Caldeira Costa**, agradeço pela disponibilidade em me ajudar, pelo carinho e atenção.

À professora **Uyrá Zama**, muito obrigada pelo incentivo, carinho e disponibilidade em me ensinar.

Ao **Jair Pastor Mota e Clodoaldo Pereira dos Santos**, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta fase.

Obrigada **Ana Carolina Silveira, Karine Pádua, Sttefany e Pedro**, pela amizade e excelente convívio no laboratório.

A todos os **professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas**, agradeço por todos os ensinamentos.



Aos secretários do NUPEB, **Robson Santiago Viol, Cláudia Alves e Josino José Barbosa**, pela disponibilidade que sempre me atenderam.

Ao apoio financeiro do **CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFOP**;

E a todos os amigos e pessoas que de certa forma me incentivaram e contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A **Deus**, por todas as dádivas que me concedeu durante a vida, pela fortaleza e esperança nos momentos mais difíceis, por sempre guiar os meus passos e colocar ao meu lado pessoas maravilhosas, que me ajudaram a realizar esse trabalho.

Aos meus pais, **Marcolino** e **Maria Aparecida**, agradeço por serem exemplos de amor, respeito e carinho. Sou grata a vocês pela educação, pelos valores e por tudo que fizeram por mim para que eu tivesse uma formação de qualidade.

Ao meu esposo **Thiago** e à minha filha **Sofia**, obrigada por dividirem comigo as alegrias, angústias, desafios e preocupações. Vocês estiveram ao meu lado com paciência e amor, me incentivando e apoiando sempre.

Aos meus irmãos, **Eleonardo** e **Edernom**, por me incentivarem a buscar os meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES**

Laboratório de Biologia Celular e Molecular;

Laboratório de Enzimologia e Proteômica;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Laboratório de Morfopatologia;

Laboratório de Nutrição Experimental.

Muito obrigada pelo suporte necessário!

Das Utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!

(Mário Quintana)

## RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) abrange um largo espectro de alterações no fígado, que inclui desde esteatose até esteato-hepatite (NASH), a qual pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. A NAFLD é considerada a doença hepática mais comum na atualidade, com prevalência mundial alarmante. Embora sua patogênese exata permaneça desconhecida, a hipótese mais aceita aponta o estresse oxidativo como um dos principais mecanismos responsáveis pela progressão da esteatose para NASH. Compostos bioativos presentes em alimentos, principalmente os polifenóis, têm sido considerados promissores na prevenção de distúrbios metabólicos. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) ganhou reconhecimento internacional devido ao seu alto conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com açaí sobre o estresse oxidativo e inflamação na NAFLD, induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica em ratos. Trinta e dois ratos *Fischer*, fêmeas, foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais, um grupo (C) recebeu dieta padrão AIN-93M, e o outro grupo (H) recebeu dieta hiperlipídica por duas semanas. Após este período, os grupos C e H foram subdivididos, no total de quatro grupos, (C), (CA) e (H), (HA). Os grupos C e CA receberam dieta padrão e os grupos H e HA receberam dieta hiperlipídica. Os grupos CA e HA receberam tratamento com polpa filtrada de açaí (2g/dia), administrada por gavagem por seis semanas. Ratos do grupo H apresentaram alterações no perfil lipídico sérico e hepático, hepatomegalia, aumento de dano hepático, alterações no perfil de adiponectina, TNF e IL-6, aumento do estresse oxidativo e esteatose hepática. O tratamento com a polpa filtrada de açaí promoveu uma melhora no balanço oxidante/antioxidante, com aumento da atividade sérica e hepática de PON1, aumento da expressão gênica de PON1 e ApoA-I e aumento na expressão proteica de PON1 no fígado, impedindo a oxidação da LDL. Também promoveu uma melhora na inflamação hepática com redução nos níveis de TNF e diminuição na expressão de CD36, um importante receptor envolvido com a formação de células espumosas no fígado. Concomitante a esses efeitos, o açaí promoveu uma redução da infiltração de gordura e conteúdo de triacilgliceróis no fígado. Estes resultados sugerem que o açaí pode representar uma estratégia dietética viável, associada a prevenção e/ou tratamento de injúrias hepáticas.

**Palavras-chave:** Açaí, polifenóis, esteatose hepática, estresse oxidativo, inflamação, Paraoxonase-1 (PON1).

## ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) covers a wide spectrum of liver alterations, including simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which can progress to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. NAFLD is currently the most common liver disease, with an alarming prevalence worldwide. Although its exact pathogenesis is still unknown, the most accepted hypothesis points to oxidative stress as one of the major mechanisms responsible for the progression of steatosis to NASH. Phytochemicals in foods, especially polyphenols, have been considered promising in preventing metabolic disorders. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has gained international popularity due to its high polyphenol content and antioxidant properties. Thus, this study was designed to investigate the effects of açai treatment on oxidative stress and inflammation in NAFLD induced by the consumption of high-fat diet in rats. Thirty-two female Fischer rats were divided into two experimental groups, one group (C) received standard diet AIN-93M, and the other group (H) received high-fat diet (25% soybean oil and 1% cholesterol) for two weeks. After this period, the C and H groups were subdivided into four groups, (C), (CA) e (H), (HA). The C and CA groups received the same standard diet, and H and HA groups received the same high-fat diet. The CA and HA were treated with filtered açai, administered as a single dose (2g/day) by gavage for six weeks. Rats fed with high-fat diet presented alterations in serum and hepatic lipid profile, hepatomegaly, increased liver damage, changes in adiponectin, TNF and IL-6 profile, increased oxidative stress and hepatic steatosis. The treatment with the filtered açai pulp promoted an improvement in the oxidative / antioxidant balance, with increased serum and hepatic PON1 activity, upregulated the expression of PON1 and ApoA-I, and increased PON1 protein in the liver, preventing LDL oxidation. It also promoted an improvement in liver inflammation with a reduction in TNF levels and a downregulation in expression of CD36, a major receptor involved in the formation of liver foam cells. Concomitant to these effects, açai promoted a reduction of fat infiltration trygliceride content. These results suggest that açai may represent a viable dietary strategy associated with prevention and/or treatment of liver injury.

**Key words:** Acai, polyphenols, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, paraoxonase-1 (PON1).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta). .....	38
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos aligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de qRT-PCR. .....	50
<b>Tabela 3.</b> Composição centesimal e fitoquímica da polpa filtrada de açaí.....	55
<b>Tabela 4.</b> Massa corpórea, massa relativa do fígado e indicadores da ingestão alimentar e excreção fecal de ratos que receberam dieta padrão e hiperlipídica tratados com açaí. ...	57
<b>Tabela 5.</b> Lipídios totais, concentração de colesterol e triacilgliceróis hepático e excretado nas fezes de ratos que receberam dieta padrão e hiperlipídica tratados com açaí. ....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espectro da doença hepática gordurosa não alcoólica.....	5
<b>Figura 2.</b> Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica.....	8
<b>Figura 3.</b> Papel do estresse oxidativo nos mecanismos envolvidos na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica.....	13
<b>Figura 4.</b> Captação de lipoproteínas oxidadas pelas células de Kupffer (KCs).....	15
<b>Figura 5.</b> Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	17
<b>Figura 6.</b> Possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na regulação gênica de PON1 por receptores nucleares.....	21
<b>Figura 7.</b> Via de sinalização do AhR.....	22
<b>Figura 8.</b> Fotos do Açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> Martius).....	25
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do delineamento experimental.....	37
<b>Figura 10.</b> Princípio do ensaio de determinação da atividade da Superóxido dismutase.....	46
<b>Figura 11.</b> Percentual de atividade antioxidante da polpa filtrada de açaí e do antioxidante de referência Trolox em diferentes concentrações.....	56
<b>Figura 12.</b> Lipídios séricos de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	58
<b>Figura 13.</b> Atividade sérica da alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	60
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografias representativas de secções do fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	61
<b>Figura 15.</b> Concentração sérica de adipocinas e concentração hepática de citocinas inflamatórias de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	63
<b>Figura 16.</b> Expressão de RNAm de genes que codificam para CD36 e SR-A no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	64
<b>Figura 17.</b> Concentração sérica de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	65
<b>Figura 18.</b> Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de proteína carbonilada em homogenato do fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	66



<b>Figura 19.</b> Conteúdo hepático de glutathiona total, glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e a razão GSH/GSSG no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	67
<b>Figura 20.</b> Atividade arilesterásica da enzima PON1 no soro e no fígado de ratos que receberam dieta padrão ou dieta hiperlipídica tratados com açaí. ....	68
<b>Figura 21.</b> Atividade da catalase e da superóxido dismutase no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí .....	69
<b>Figura 22.</b> Expressão de RNAm de genes que codificam para as isoformas da paraoxonase e para proteínas envolvidas com a regulação da sua expressão no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí.....	71
<b>Figura 23.</b> Avaliação semiquantitativa da expressão proteica da paraoxonase-1 (PON1) no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. ....	72
<b>Figura 24.</b> Resumo dos efeitos do tratamento com açaí sobre o estresse oxidativo, inflamação e esteatose hepática induzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica em ratos.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
AhR	receptor aril hidrocarboneto
AIN	do inglês, <i>American Institute of Nutrition</i>
ALT	alanina aminotransferase
ApoA-I	apolipoproteína A-I
ARNT	translocador nuclear de AhR
AST	aspartato aminotransferase
ATP	trifosfato de adenosine
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CD36	receptor <i>scavenger</i> classe B
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
COX-1	ciclo-oxigenase-1
COX-2	ciclo-oxigenase-2
Cq	do inglês, <i>Quantification cycle</i>
CYP1A1	complexo citocromo P4501A1
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPPH•	2,2-difenil-1- picril-hidrazil
DPP-IV	dipeptidil peptidase -IV
DTNB	ácido 5,5' ditio-bis (2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EAG	equivalentes de ácido gálico
ERO	espécies reativas de oxigênio
FDN	fibra detergente neutron
FXR	receptor X farsenóide
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase

GR	receptor de glicocorticoides
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HOCl	ácido hipocloroso
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	proteína <i>Heat shock</i>
ICAM-1	molécula-1 de adesão intracelular
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
Kcal	Quilocalorias
KCs	Células de Kupffer
kDa	Quilodalton
LB	do inglês, <i>loading buffer</i>
LCAT	lecitina colesterol acil transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL <sub>ox</sub>	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
MSR1	receptor <i>scavenger</i> de macrófago 1
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAFLD	do inglês, <i>Nonalcoholic fatty liver disease</i> , doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	do inglês, <i>Nonalcoholic steatohepatitis</i> , esteato-hepatite não alcoólica
NF-1	fator nuclear 1
NF-kb	fator nuclear kappa B
NO•	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> •-	radical superóxido

OH•	radical hidroxila
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMNs	células polimorfonucleares
PON1	Paraoxonase-1
PON2	Paraoxonase-2
PON3	Paraoxonase-3
PONs	Paraoxonases
PPAR	receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR- $\alpha$	receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR- $\gamma$	receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PRX	receptor pregnano X
qRT-PCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RXR	receptor retinóide X
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SER	elementos responsivos a esteróis
SGLT-2	cotransportador sódio-glicose tipo 2
SOD	superóxido dismutase
Sp1	proteína de especificidade 1
SR-A	receptor <i>scavenger</i> classe A
SREBP-2	proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol-2
SRs	<i>scavenger receptors</i>
TAG	Triacilgliceróis
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- $\beta$	fator de transformação do crescimento beta
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TMP	1,3,3-tetrametoxipropano
TNB	ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF	fator de necrose tumoral
VCAM-1	molécula-1 de adesão vascular

VDR	receptor de vitamina D
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
XAP2	proteína de interação
XRE	elementos de resposta a xenobióticos
$\gamma$ -GCS	gama-glutamilcisteína sintetase

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Certificado do protocolo aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da UFOP.....	106
<b>ANEXO 2.</b> Trabalho publicado na <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i> . .....	107

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xvii
LISTA DE ANEXOS .....	xxi
SUMÁRIO .....	xxii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD) .....	4
2.1.1. DEFINIÇÃO .....	4
2.1.2. Epidemiologia .....	6
2.1.3. Patogênese .....	7
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA NAFLD .....	10
2.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE .....	15
2.3.1. Paraoxonases .....	16
2.4. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO .....	19
2.5. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA NAFLD .....	23
2.6. O FRUTO DO AÇAÍ E SEU PAPEL COMO ALIMENTO FUNCIONAL .....	23
2.6.1. Composição química e compostos bioativos da polpa do açaí .....	25
2.6.2. Estudos com o fruto do açaí conduzidos <i>in vitro</i> .....	26
2.6.3. Estudos com o fruto do açaí conduzidos <i>in vivo</i> .....	28
3. OBJETIVOS .....	31
3.1. OBJETIVO GERAL .....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1. OBTENÇÃO DA POLPA FILTRADA DE AÇAÍ .....	32
4.2. CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DA POLPA FILTRADA DE AÇAÍ .....	32
4.2.1. Composição centesimal .....	32
4.2.2. Conteúdo de polifenóis totais .....	33
4.2.3. Antocianinas totais .....	34
4.2.4. Capacidade antioxidante da polpa filtrada de açaí .....	35
4.3. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	36
4.3.1 Animais .....	36

4.3.2. Delineamento Experimental.....	36
4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS SÉRICAS .....	38
4.5. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ADIPONECTINA E LEPTINA .....	39
4.6. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS NO FÍGADO .....	40
4.7. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE LIPÍDIOS HEPÁTICOS.....	40
4.8. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE LIPÍDIOS FECAIS .....	41
4.9. ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO.....	42
4.10. ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	42
4.10.1. LDL oxidada .....	42
4.10.2. Peroxidação lipídica no fígado por TBARS.....	43
4.10.3. Proteína carbonilada.....	44
4.11. ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	44
4.11.1. Obtenção da fração microsomal hepática para dosagem de PON1 .....	44
4.11.2. Atividade arilesterásica sérica e hepática de PON1 .....	45
4.11.3. Atividade da Superóxido dismutase.....	45
4.11.4. Atividade da Catalase.....	46
4.11.5. Glutathione total, reduzida, oxidada e razão GSH/GSSG.....	47
4.12. ENSAIO DE RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL .....	48
4.12.1. Extração de RNA .....	48
4.12.2. Síntese do cDNA.....	49
4.12.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores .....	49
4.12.4. RT-PCR Quantitativa em Tempo Real.....	50
4.12.5. Cálculo da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	51
4.13. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE LOWRY.....	52
4.14. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO BCA .....	52
4.15. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PON1 POR WESTERN BLOTTING.....	53
4.16. ESTATÍSTICA .....	54
5. RESULTADOS .....	55
5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS DA POLPA FILTRADA DE AÇAÍ.....	55
5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DA POLPA FILTRADA DE AÇAÍ .....	55
5.3. EVOLUÇÃO PONDERAL, MASSA DO FÍGADO E COMPORTAMENTO ALIMENTAR .....	56
5.4. LIPÍDIOS SÉRICOS .....	57



5.5. PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO E FECAL .....	58
5.6. INDICADORES SÉRICOS DA FUNÇÃO HEPÁTICA.....	59
5.7. HISTOLOGIA HEPÁTICA.....	60
5.8. PRODUÇÃO DE ADIPOCINAS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	62
5.9. EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES <i>SCAVENGERS</i> .....	63
5.10. EFEITO DA POLPA DE AÇAÍ SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO .....	64
5.10.1. Biomarcadores do estresse oxidativo .....	64
5.10.2. Concentração de glutathiona total, glutathiona oxidada e a relação GSH/GSSG.....	66
5.10.3. Enzimas antioxidantes.....	67
5.11. EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DA PARAOXONASE E DE GENES ENVOLVIDOS COM A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PON1 .....	69
5.12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PON1 .....	72
6. DISCUSSÃO .....	73
7. CONCLUSÃO.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
ANEXOS.....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês “*Non-alcoholic Fatty Liver Disease*”) tem sido reconhecida como a forma mais prevalente de doença hepática crônica do mundo moderno, a qual está diretamente relacionada ao aumento progressivo da obesidade (ARAB *et al.*, 2014). A NAFLD refere-se a um amplo conjunto de alterações hepáticas, sendo inicialmente caracterizada pelo acúmulo de lipídios na forma de triacilgliceróis no fígado que excede 5 a 10% do peso do órgão, em pacientes que não possuem histórico de consumo de álcool. Esta forma pode evoluir para estágios mais graves da doença, como a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), associada com inflamação e fibrose, cirrose e até carcinoma hepatocelular (ADAMS; ANGULO, 2005; WHITE; KANWAL; EL-SERAG, 2012; ARAB *et al.*, 2014).

Estima-se atualmente que a prevalência da NAFLD seja de 15 a 30% da população em geral, podendo alcançar até 70 a 90% dos pacientes obesos e com diabetes tipo 2, os quais tem maior risco de desenvolverem fibrose e cirrose (AHMED; WONG; HARRISON, 2015). O sedentarismo e os maus hábitos alimentares contribuem para o aparecimento de diversas doenças crônicas, entre elas a NAFLD. Além da obesidade e diabetes, outros fatores de risco contribuem diretamente na patogênese desta doença, tais como dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e hiperglicemia, os quais caracterizam a síndrome metabólica (MARCHESINI *et al.*, 2003).

Diferentes vias metabólicas estão envolvidas com o desenvolvimento da esteatose hepática incluindo o aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados do tecido adiposo, aumento da síntese de novo de ácidos graxos e redução na  $\beta$ -oxidação (CHITTURI *et al.*, 2002; POSTIC; GIRARD, 2008). Estas alterações tornam o fígado vulnerável a diversos eventos, como o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da peroxidação de lipídios e redução das defesas antioxidantes, que potencialmente podem contribuir para a progressão para estágios mais graves de dano hepático, como a esteato-hepatite, fibrose e cirrose (BROWNING; HORTON, 2004; VIDELA *et al.*, 2004a).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas durante o metabolismo celular e das atividades funcionais e têm um importante papel em vias de sinalização vitais (ROESLER *et al.*, 2007). No entanto, o acúmulo dessas espécies pode provocar extenso dano oxidativo em biomoléculas (proteínas, lipídios e DNA), com perda de função e integridade das membranas biológicas, inibição de enzimas e mutações no DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011). Na NAFLD, a oxidação do excesso de ácidos graxos

geram ERO, as quais provocam danos em organelas e estimulam vias que levam à inflamação e fibrogênese (DAY, C., 2002; CHALASANI; DEEG; CRABB, 2004; VIDELA *et al.*, 2004b). Neste contexto, evidências crescentes sugerem que as lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) também constituem um importante fator responsável por gerar uma resposta inflamatória hepática e, com isso, contribuir para o desenvolvimento de NASH (BIEGHS, VEERLE *et al.*, 2012; HOUBEN *et al.*, 2017).

Com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas ERO, o organismo humano e outros seres vivos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante cuja ação envolve mecanismos enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GR) (NOORI, 2012). Além dessas enzimas, é notável o papel antioxidante da enzima paraoxonase (PON) na proteção da LDL e também da lipoproteína de alta densidade (HDL) contra modificações oxidativas (BHATTACHARYYA *et al.*, 2008).

A família PON é composta por três isoformas, PON1, PON2 e PON3 (LA DU, 1996; PRÉCOURT *et al.*, 2011) sendo a PON1 a isoforma mais estudada. No entanto, as três isoformas de PON apresentam atividade antioxidante (REDDY *et al.*, 2001). Os níveis de PON1 encontram-se diminuídos em diferentes doenças que envolvem o estresse oxidativo (CAMPS; MARSILLACH; JOVEN, 2009), incluindo as doenças crônicas do fígado, como a NAFLD, hepatite e cirrose (FERRÉ *et al.*, 2002; KILIC *et al.*, 2005; FERRÉ *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm sugerido que a ingestão de vegetais com potencial antioxidante, principalmente aqueles ricos em polifenóis, como uma forma de combater o estresse oxidativo (CAO *et al.*, 1998; COSTA, A. G. V. *et al.*, 2013). A melhora das defesas antioxidantes através da escolha dietética adequada pode ser uma estratégia viável para reduzir os níveis de estresse oxidativo na NAFLD, uma vez que os antioxidantes naturais podem exercer seus efeitos de maneira direta ou indireta (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008). Antioxidantes diretos, tais como vitaminas E e C, atuam na neutralização de moléculas de ERO, já os antioxidantes indiretos, induzem ou ativam vias de sinalização envolvidas na resposta ao estresse, como as enzimas de detoxificação de fase I. Os polifenóis podem atuar sobre a transcrição de genes que codificam para enzimas de detoxificação de fase I (responsáveis por oxidar xenobióticos), como a PON1, por meio da ativação de receptores nucleares, tais como o receptor aril hidrocarboneto (AhR), um “xenosensor” de hidrocarbonetos aromáticos (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004; LITVINOV; MAHINI; GARELNABI, 2012), podendo, desta forma, apresentar efeitos benéficos.

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), um fruto nativo da região amazônica tem ganhado atenção internacional como alimento funcional devido ao seu alto conteúdo de polifenóis e potencial benefício à saúde. A maioria dos efeitos benéficos do açaí são atribuídos aos seus compostos secundários, como os flavonoides e diversos outros polifenóis, incluindo antocianinas e proantocianidinas, que possuem propriedades antioxidantes (SCHAUSS, A G *et al.*, 2006b; MARCASON, 2009). Estudos prévios *in vitro*, em modelos animais e em humanos mostraram que o consumo de açaí diminui o estresse oxidativo (DE SOUZA *et al.*, 2010; GUERRA *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2015) e induz efeitos hipocolesterolêmico (DE SOUZA *et al.*, 2012), anti-aterogênico, anti-inflamatório (XIE *et al.*, 2011) e hepatoprotetor (GUERRA *et al.*, 2015). Além disso, a suplementação com açaí na dieta aumentou a atividade sérica da enzima PON1 em ratos (DE SOUZA *et al.*, 2010). Contudo, ainda não foi investigado o efeito do açaí sobre a atividade hepática dessa enzima, bem como sobre a expressão gênica e proteica de PON1 e expressão das isoformas PON2 e PON3 no fígado.

Assim, considerando sua composição fitoquímica e seus potenciais efeitos benéficos *in vivo*, a hipótese deste trabalho é que o açaí pode atuar sobre a paraoxonase e a inflamação hepática e, desta forma, retardar a progressão da NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em ratos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD)

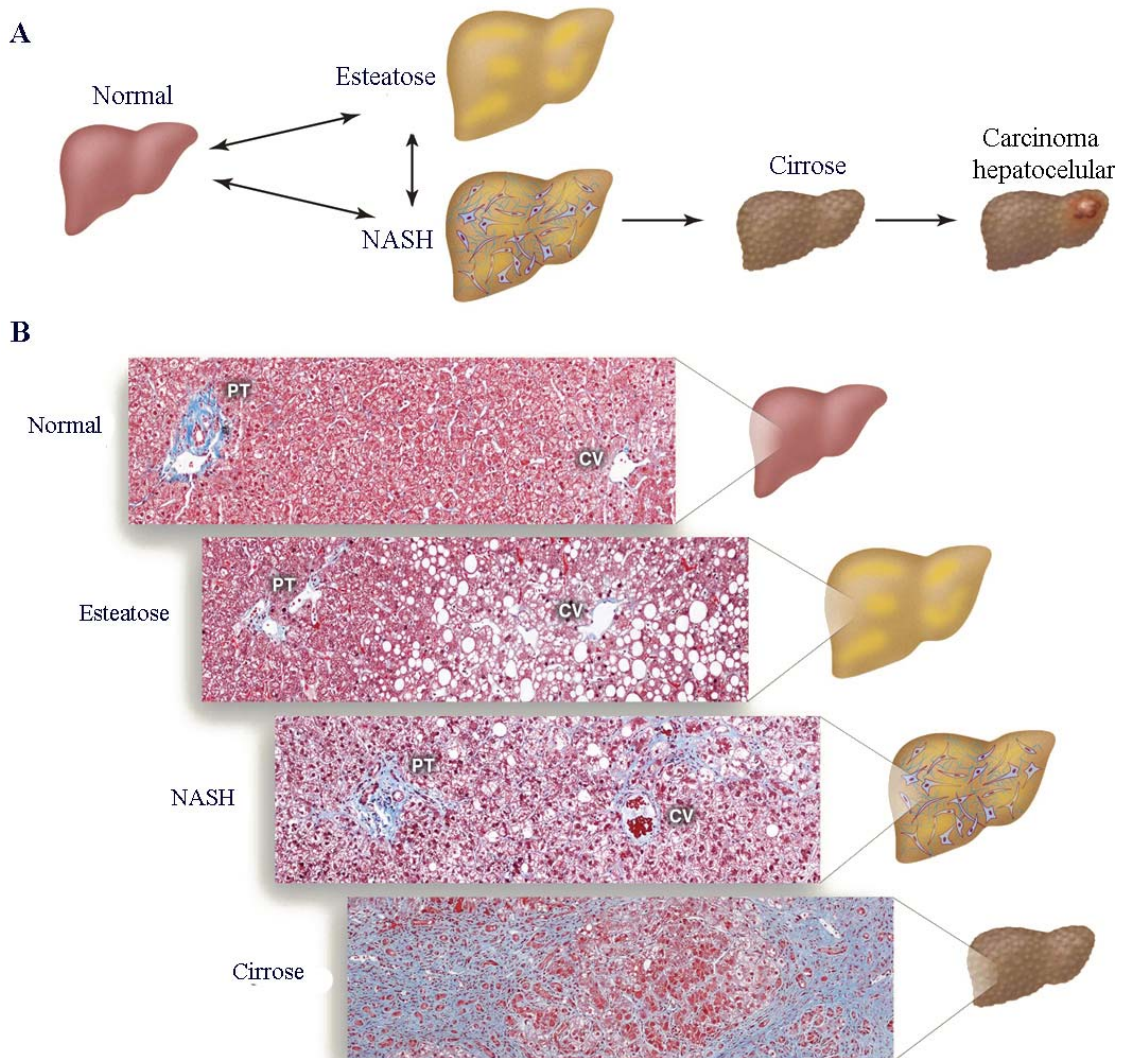
#### 2.1.1. Definição

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é considerada um dos grandes problemas de saúde pública do novo milênio, impulsionada sobretudo pela epidemia da obesidade e sem tratamento oficialmente aprovado (POLYZOS; MANTZOROS, 2016). (MARCHESINI *et al.*, 2005). Em 1980, Ludwig *et al.* descreveram pela primeira vez o termo esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e o utilizaram para designar a condição do fígado gorduroso em mulheres obesas, diabéticas e sem histórico de abuso de álcool, mas que apresentavam alterações histológicas muito semelhantes à da hepatite alcoólica. Desde então, o termo NAFLD tem sido utilizado para descrever um amplo espectro de condições hepáticas, que incluem a esteatose hepática, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), a qual pode progredir para cirrose ou até mesmo para o carcinoma hepatocelular (**Figura 1**) (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; CHALASANI *et al.*, 2012; LOOMBA; SANYAL, 2013).

A esteatose hepática é caracterizada pela presença ectópica de triacilgliceróis (TAG) sob a forma de “gotículas lipídicas” em mais de 5% dos hepatócitos, na ausência de outras causas etiopatogênicas e com consumo alcoólico menor que 20g/dia em homens e 10g/dia em mulheres, e está presente em 100% dos casos de NAFLD (DURAZZO *et al.*, 2012). Histologicamente, é possível distinguir dois padrões de esteatose: a microvesicular, caracterizada pela presença de múltiplas “gotículas lipídicas”, que dispersam pelo citoplasma dos hepatócitos, não interferindo com a localização central do núcleo celular e a macrovesicular, na qual a existência de um único vacúolo bem desenvolvido empurra o núcleo dos hepatócitos para a periferia do citoplasma (BURT; MUTTON; DAY, 1998; BRUNT, ELIZABETH M; TINIAKOS, 2010).

Devido à atividade inflamatória progressiva, a esteatose pode evoluir para NASH, que é caracterizada pela presença de esteatose hepática, inflamação intralobular (infiltração de células mononucleares) com lesão hepatocelular (balonização hepatocelular), podendo também apresentar corpúsculos de Mallory e fibrose pericelular (BRUNT, E. M., 2005). NASH pode evoluir para cirrose, na qual os hepatócitos são substituídos por tecido de cicatrização composto principalmente de colágeno tipo 1. Esta condição, caracterizada pela perda da arquitetura hepática, formação de nódulos e alterações na vascularização hepática é responsável por cerca

de 4 a 27% dos casos de carcinoma hepatocelular (REDDY, J. K.; RAO, 2006; ARGO; CALDWELL, 2009; COHEN; HORTON; HOBBS, 2011).



**Figura 1.** Espectro da doença hepática gordurosa não alcoólica. Esquema da progressão da NAFLD (A). O acúmulo de triacilgliceróis no interior do hepatócitos causa esteatose. A esteatose associada à inflamação, morte celular e fibrose caracteriza a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), que pode progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Secções histológicas ilustrando o fígado normal, a esteatose, NASH e cirrose (B). Fibras de colágeno são apresentadas na imagem coradas de azul com tricrômico de Masson. (CV) veia central; (PT) triade portal que consiste da artéria hepática, veia portal e ducto biliar.

Fonte: Adaptado de COHEN; HORTON; HOBBS (2011).

### 2.1.2. Epidemiologia

A NAFLD é a causa mais comum de elevação dos níveis das aminotransferases séricas tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (AHMED; WONG; HARRISON, 2015). A globalização da dieta ocidental e o sedentarismo, decorrente de mudanças no estilo de vida e industrialização da sociedade é um fator importante no aumento de doenças crônicas, entre elas a NAFLD. Nas últimas décadas, esta doença tem sido reconhecida como a forma mais prevalente de doença hepática crônica do mundo moderno, a qual está diretamente relacionada ao aumento progressivo da obesidade (LOOMBA; SANYAL, 2013; ARAB *et al.*, 2014). Além da obesidade, outros fatores de risco contribuem diretamente na patogênese desta doença, tais como, diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e hiperglicemia, os quais caracterizam a síndrome metabólica (MARCHESINI *et al.*, 2003; BOGDANOVA *et al.*, 2006).

A real prevalência e incidência da NAFLD é difícil de ser estimada, pois os estudos se baseiam em grupos selecionados e os indivíduos com estágios iniciais da doença apresentam-se assintomáticos. Mesmo assim, estima-se atualmente que a sua prevalência seja de 15 a 30% da população em geral e pode alcançar até 70 a 90% dos pacientes obesos e com diabetes tipo 2, os quais tem um maior risco de desenvolverem fibrose e cirrose (AHMED; WONG; HARRISON, 2015). A prevalência da NAFLD dobrou durante os últimos 20 anos, enquanto que a prevalência de outras doenças hepáticas crônicas têm se mantido estável ou até mesmo diminuído (LABRECQUE *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos, estima-se que a prevalência da NAFLD seja de 10 a 46%, principalmente devido aos altos índices de obesidade e sobrepeso nesta população (WILLIAMS *et al.*, 2011; GLASSNER; MALATY; ABRAHAM, 2017). Em países europeus, a prevalência da NAFLD varia de 20 a 30% (BLACHIER *et al.*, 2013) e no Japão e na China, a sua prevalência é semelhante à da Europa (20-30% no Japão e 15-30% na China, respectivamente). No Brasil, não há dados oficiais sobre a prevalência dessa doença na população em geral, no entanto, alguns estudos determinaram a frequência da esteatose por ultrassonografia abdominal. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, a prevalência da esteatose hepática foi de 19,2% em 1804 pacientes (PARISE *et al.*, 2003). Um estudo multicêntrico brasileiro realizado a partir da biópsia hepática de pacientes que apresentavam os níveis de aminotransferases alterados e esteatose hepática no ultrassom, mostrou que dos 437 casos, 42% foram diagnosticados com

esteatose isolada, 58% com esteato-hepatite, dos quais 27% também apresentavam fibrose, 15,4% com cirrose e 0,7% com carcinoma hepatocelular (COTRIM *et al.*, 2011).

Recentemente, foi realizado um levantamento que incluía 110 pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular e hepatopatia não alcoólica de nove unidades de hepatologia em seis estados brasileiros. O estudo mostrou a presença de esteato-hepatite sem fibrose em 3,8% dos casos, esteato-hepatite com fibrose em 27% e cirrose em 61,5%. O diagnóstico histológico foi realizado em 47,2% dos pacientes com carcinoma hepatocelular sem cirrose, representando 7,7% dos casos (COTRIM *et al.*, 2016).

### 2.1.3. Patogênese

A patogênese da NAFLD e os mecanismos que levam a NASH, fibrose e dano do hepatócito não estão completamente esclarecidos, mas pode-se afirmar que há uma combinação de fatores ambientais, genéticos e metabólicos que resultam na progressão da doença (TORRES; WILLIAMS; HARRISON, 2012).

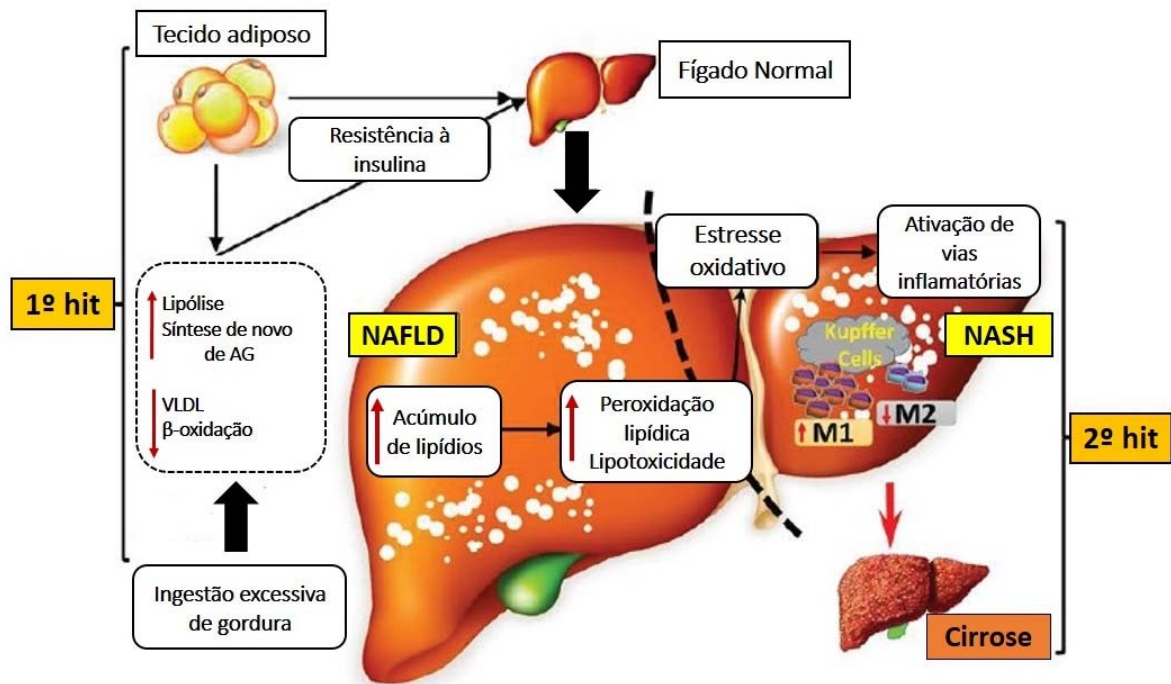
A hipótese dos dois *hits* proposta por Day & James (1998) é amplamente aceita para explicar a patogênese da NAFLD/NASH. O primeiro *hit* está associado a eventos que causam acúmulo de gordura nos hepatócitos e o segundo *hit* está relacionado com a maior produção ou incapacidade na inativação das ERO produzidas na  $\beta$ -oxidação, que desencadeia os processos de inflamação e fibrose, estimulando a progressão da esteatose para NASH.

O acúmulo de lipídios (primeiro *hit*) está associado com transtornos metabólicos e resistência à insulina e pode ser causado por 4 mecanismos: (1) aumento da oferta e absorção de ácidos graxos devido ao excesso de ingestão dietética ou maior lipólise no tecido adiposo; (2) aumento da síntese hepática de novo de ácidos graxos e TAG; (3) diminuição da síntese ou secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e da exportação de TAG e (4) falha na eliminação de ácidos graxos devido ao comprometimento da  $\beta$ -oxidação mitocondrial hepática (TILG; MOSCHEN, 2010; TAKAMURA *et al.*, 2012). O desenvolvimento da esteatose provoca uma série de consequências nocivas relacionadas aos hepatócitos, tais como a peroxidação lipídica descontrolada e o estresse oxidativo, que sensibiliza o fígado, aumentando a susceptibilidade e vulnerabilidade ao segundo *hit*, caracterizado pela ativação das vias inflamatórias (**Figura 2**) (XU *et al.*, 2015).

A ativação das vias inflamatórias pode ser desencadeada por vários estímulos (segundo *hit*) tais como: estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, lipólise alterada, lipotoxicidade,



colesterol intra-hepático anormal, hiperinsulinemia, desregulação da sinalização das adipocinas (hiperleptinemia e hipoadiponectinemia) e morte celular (apoptose e necrose) (SCHATTENBERG; GALLE, 2010; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).



**Figura 2.** Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). A ingestão excessiva de gordura leva a alterações metabólicas, que contribuem para a resistência à insulina no tecido adiposo e no fígado. O excesso de ingestão dietética de gordura e a resistência à insulina induzem aumento da lipólise no tecido adiposo, aumento da síntese de novo de ácidos graxos (AG) no fígado, diminuição na síntese e secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), falha na eliminação de AG devido ao comprometimento da  $\beta$ -oxidação. Esses eventos contribuem para o aumento do tráfego de ácidos graxos livres no fígado, o que leva ao acúmulo de triacilgliceróis (TAG) nos hepatócitos. A esteatose hepática atua como um “primeiro *hit*”, seguido por um “segundo *hit*”, no qual os mediadores inflamatórios podem causar NASH e até mesmo cirrose. O acúmulo de TAG provoca uma série de consequências nocivas relacionadas aos hepatócitos, tais como a peroxidação lipídica descontrolada e o estresse oxidativo, que podem ativar as vias inflamatórias hepáticas.

Fonte: Adaptado de XU et al. (2015).

A teoria dos dois *hits* têm sido modificada devido a novos achados sobre as interações entre resistência à insulina, estresse oxidativo, adipocinas, inflamação do tecido adiposo, dentre outros fatores. Mais recentemente surgiu a hipótese dos múltiplos *hits*, na qual os *hits* são caracterizados por eventos paralelos que envolvem uma interação complexa entre fatores ambientais, fatores nutricionais, microbiota intestinal e fatores genéticos e epigenéticos (TILG;

MOSCHEN, 2010; BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Essa interação pode promover esteatose isolada, ativação imune inata, inflamação, morte celular ou lesão hepática progressiva. O primeiro *hit* consiste na resistência à insulina em combinação com muitas disfunções metabólicas associadas, gerando esteatose e expondo o fígado ao risco de outros *hits*, tais como ativação de vias do estresse oxidativo, ativação de citocinas, estresse do retículo endoplasmático e ativação das vias de sinalização da apoptose e fibrogênese, que resultarão em NASH e fibrose hepática (MCCULLOUGH, 2006; RINELLA, 2015). Ambas as hipóteses têm em comum que a esteatose simples é a base para o desenvolvimento de NASH (WREE *et al.*, 2013; BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014).

O colesterol tem sido apontado como um fator de risco e gravidade da NAFLD (MUSSO *et al.*, 2003; YASUTAKE *et al.*, 2009; ENJOJI; NAKAMUTA, 2010; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013). Savard *et al.* (2013) demonstraram que uma dieta hiperlipídica que continha 15% de gordura saturada e 1% de colesterol causou o desenvolvimento de um grau de esteatose hepática pronunciado, inflamação substancial e fibrose perisinusoidal (esteato-hepatite), associada com inflamação do tecido adiposo. Além disso, os autores demonstraram que os efeitos hepáticos e metabólicos induzidos pela gordura e colesterol da dieta em conjunto foram bem maiores do que os efeitos encontrados para cada um dos componentes da dieta avaliados isoladamente, demonstrando uma interação positiva significativa. O estudo de Ichimura *et al.* (2015) também mostrou a indução da NASH caracterizada pela esteatose com maior acúmulo de TAG, inflamação, balonização dos hepatócitos, fibrose e progressão à cirrose com a adição de colesterol à dieta hiperlipídica.

As adipocinas e citocinas inflamatórias também têm sido bem caracterizadas por estarem envolvidas nos mecanismos patogênicos da NAFLD (PAGANO *et al.*, 2005; JARRAR *et al.*, 2008). O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, possuindo papel central na homeostase energética do organismo. Esse tecido, através de um adipócito funcional produz citocinas, chamadas adipocinas, que tem efeito local, periférico e central (STOJSAVLJEVIC *et al.*, 2014). No entanto, devido ao influxo aumentado de lipídios, essa gordura passa a ser acumulada em adipócitos ectópicos (viscerais). Esses adipócitos são caracterizados pelo aumento em seu diâmetro, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias [interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF)] e pela redução na produção de citocinas anti-inflamatórias e sensibilizadores de insulina (MORELLI *et al.*, 2013). Essa alteração de função pelo tecido adiposo está relacionada a um estado inflamatório crônico sistêmico,

associada não somente à progressão da NAFLD, mas também ao risco cardiovascular aumentado (GAGGINI *et al.*, 2013).

Dentre as adipocinas, a adiponectina é a molécula que possui o mais potente papel como sensibilizador da insulina, além de possuir atividade anti-inflamatória, anti-apoptótica e pró-angiogênica (RAJALA; SCHERER, 2003). Conforme Pagano *et al.* (2005), os níveis séricos de adiponectina foram encontrados em uma concentração entre 20 e 60% abaixo do normal em pacientes portadores de NAFLD, quando comparados a controles saudáveis. Existem evidências de que a adiponectina está associada ao catabolismo de ácidos graxos e melhora na resistência insulínica (SPRANGER *et al.*, 2003; BODEN, 2011), além de apresentar efeitos hepatoprotetor e anti-fibrogênico em condições de lesão hepática (BERTOLANI; MARRA, 2010).

A leptina também possui múltiplos efeitos sobre o metabolismo energético do organismo, está relacionada à gênese da NAFLD e na sua progressão para fibrose hepática, contribuindo inicialmente para o desenvolvimento da resistência à insulina e esteatose hepática e, posteriormente, para injúria hepática através de seu efeito pró-inflamatório, promovendo a fibrose hepática (TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2006). A ativação das células estreladas hepáticas é fundamental para o desenvolvimento da fibrose, pois estas se tornam responsivas a inúmeras citocinas, produzindo componentes da matriz extracelular que no seu último estágio levam à fibrose. Essas células, quando ativadas, expressam leptina, que se comporta como uma citocina pró-fibrogênica. Além disso, a leptina está associada ao aumento do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), uma citocina relacionada à fibrose, e também ao aumento da produção de TNF, o qual também contribui para a progressão à fibrose (MARRA, 2002; BERTOLANI; MARRA, 2010).

## **2.2. Estresse oxidativo e inflamação na NAFLD**

O estresse oxidativo é uma característica proeminente no desenvolvimento e progressão da NAFLD (BROWNING; HORTON, 2004; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (SIES, 1986; ROBERTSON; LECLERCQ; FARRELL, 2001).

Em baixos níveis fisiológicos, as ERO têm sido apontadas como mediadores em vários processos celulares e em vias de sinalização vitais, como por exemplo, na defesa contra microrganismos e na regulação da expressão gênica baseada na oxido-redução (RIBEIRO, S. M. R. *et al.*, 2006; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007). Entretanto, possuem a meia vida extremamente curta e devido à sua alta reatividade, quando não neutralizadas, podem causar danos celulares, que incluem a depleção de ATP, dano ao DNA, alterações na estabilidade de proteínas, ruptura de membranas via peroxidação lipídica e a liberação de citocinas inflamatórias (BROWNING; HORTON, 2004; HALLIWELL, B., 2007).

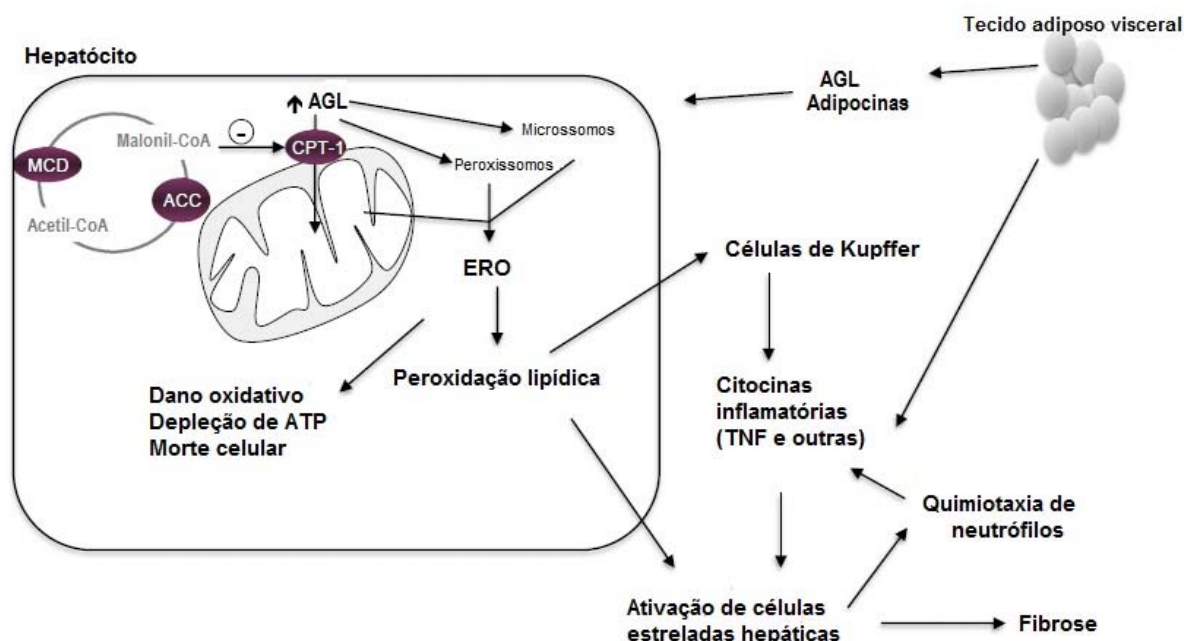
As ERO compreendem um grupo de oxidantes, que podem ser radicais livres ou espécies moleculares capazes de gerar radicais livres (como os peróxidos) e são continuamente formadas como produto do metabolismo aeróbico (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; NARANG; YADAV; VAIDYA, 2011). Dentre as espécies reativas mais importantes no contexto biológico estão os íons superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), íons hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ). As espécies não radicalares principais são peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ )<sup>2</sup> (FRIDOVICH, 1998; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006; BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010).

Alterações na morfologia da mitocôndria são comuns em indivíduos com NAFLD e podem levar diretamente a formação de ERO devido ao maior vazamento de elétrons da cadeia respiratória (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

A maior disponibilidade de ácidos graxos nos hepatócitos na NAFLD contribui para o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (BROWNING; HORTON, 2004). O mecanismo está ilustrado na **figura 3**. No fígado, os ácidos graxos são metabolizados principalmente através da via de  $\beta$ -oxidação que ocorre na mitocôndria e em menor grau nos peroxissomos e também através da  $\omega$ -oxidação nos microsossomos, por membros da família do citocromo P450. O aumento do influxo de ácidos graxos promove a ativação destas vias alternativas. No primeiro passo da  $\beta$ -oxidação peroxissomal é formado peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), através da ação da Acil-CoA oxidase que doa elétrons diretamente ao oxigênio molecular. Flavoproteínas do citocromo P450 envolvidas na  $\omega$ -oxidação microsossomal também promovem a formação de ERO por mecanismo semelhante. Além disso, ácidos dicarboxílicos provenientes da  $\omega$ -oxidação podem circular entre as membranas interna e externa da mitocôndria, desacoplando a fosforilação oxidativa e, portanto, promovendo a depleção de ATP (GAMBINO; MUSSO; CASSADER, 2011).

O aumento da peroxidação lipídica também tem sido descrito como um importante mecanismo patogênico na NAFLD (DIEHL, 2005). Os intermediários reativos produzidos pelo estresse oxidativo, principalmente os radicais hidroxil (OH<sup>•</sup>), podem atacar os ácidos graxos poliinsaturados das membranas biológicas e iniciar a peroxidação no interior da célula, gerando compostos secundários de maior reatividade e toxicidade como os aldeídos, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA). Estes aldeídos apresentam meia-vida maior que as ERO e têm potencial para se difundirem do seu local de origem para outros locais na célula, ampliando os efeitos do estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001; BROWNING; HORTON, 2004).

A peroxidação lipídica está intimamente relacionada ao processo inflamatório. O MDA ativa o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado e de moléculas de adesão, promovendo a produção do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-6 (IL-6). O HNE ativa as células estreladas hepáticas, promovendo a síntese de colágeno e consequentemente fibrose e também está implicado na formação dos corpúsculos hialinos de Mallory e quimiotaxia dos neutrófilos (LEE *et al.*, 1995; BROWNING; HORTON, 2004).



**Figura 3.** Papel do estresse oxidativo nos mecanismos envolvidos na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). O aumento no influxo de ácidos graxos livres (AGL) contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas mitocôndrias, peroxissomos e microsossomos. As ERO promovem danos oxidativos a membranas celulares causando disfunção mitocondrial, depleção de ATP e morte celular. Produtos da peroxidação de lipídios são tóxicos e podem se difundir para outros locais afetando não só os hepatócitos como também outras células. O desenvolvimento de NASH está associado com a ativação das células estreladas hepáticas e uma resposta pró-inflamatória das células de Kupffer, contribuindo para o processo inflamatório e desenvolvimento da fibrose.

Fonte: Adaptado de ROLO et al. (2012)

Uma das consequências do estresse oxidativo é a oxidação de lipídios das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo este evento bastante conhecido no desenvolvimento da aterosclerose (PARTHASARATHY; STEINBERG; WITZTUM, 1992; KATO *et al.*, 2009). Vêm crescendo evidências sugerindo que as LDL oxidadas (LDLox) são um novo fator de risco para a inflamação hepática e que podem ter um envolvimento direto no desenvolvimento de NASH (HOUBEN *et al.*, 2017). Em ambos, artérias e fígado, a captação de LDLox por macrófagos constitui um importante fator responsável por gerar uma resposta inflamatória prejudicial (BIEGHS, V. *et al.*, 2012).

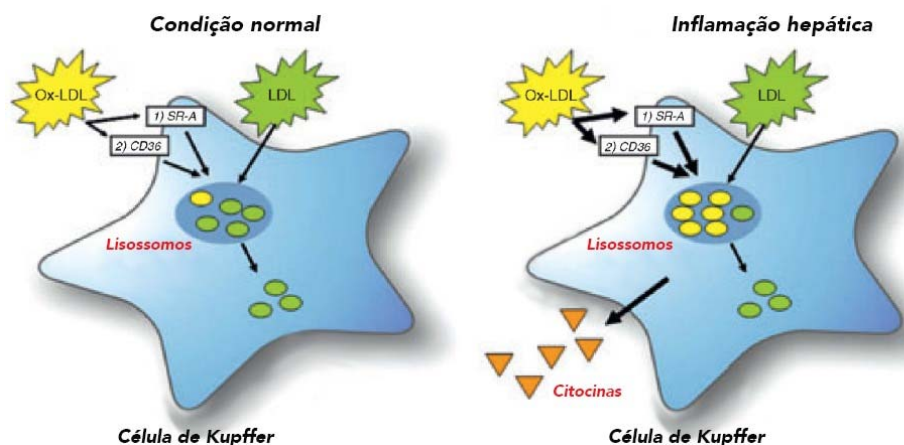
A oxidação da LDL ocorre nas paredes das artérias e no plasma, mas ao funcionar como um órgão de eliminação da LDLox da circulação, o fígado reduz os efeitos nocivos da LDLox

em outros tecidos. Por esse motivo, existem evidências de que os níveis elevados de LDLox circulantes podem prejudicar a função do próprio fígado (BIEGHS *et al.*, 2013).

Furumaki *et al.* (2012) estabeleceram um modelo murino de NASH pela combinação de uma dieta hiperlipídica e administração intravenosa de LDLox. Nesse estudo, os camundongos que receberam dieta hiperlipídica por 23 semanas desenvolveram esteatose hepática, fibrose discreta e aumento nos níveis de peroxidação lipídica quando comparados aos camundongos que receberam a dieta padrão. A administração de LDLox aos camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica nas duas últimas semanas experimentais, não só agravou a esteatose hepática, a fibrose e o metabolismo lipídico, mas também resultou em inflamação intensa, incluindo lesão hepática grave e infiltração de células inflamatórias, que são características de NASH. Os autores sugeriram que o aumento do estado oxidativo, incluindo a peroxidação lipídica intracelular induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica e a fonte extracelular de LDLox, desencadearam a inflamação hepática.

Diante disso, estudos recentes apontam para o papel central das células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado, no mecanismo de patogênese de NASH (BIEGHS *et al.*, 2013; WALENBERGH *et al.*, 2013). Comparável à formação de células espumosas na aterosclerose, camundongos hiperlipidêmicos apresentaram hipertrofia das células de Kupffer, que foram correlacionadas com a inflamação hepática (WOUTERS *et al.*, 2008). Além disso, verificou-se que o aumento da inflamação hepática está associada com o acúmulo de LDLox nos lisossomos das células de Kupffer no fígado de camundongos *LDLr<sup>-/-</sup>*, que receberam injeção intravenosa de LDLox (BIEGHS *et al.*, 2013).

As células de Kupffer expressam receptores *scavengers* (SRs, *scavenger receptors*), que se ligam às LDLox e as fagocitam levando à formação de células espumosas (BIEGHS *et al.*, 2013). A resposta inflamatória hepática ocorre devido ao aprisionamento da LDLox nos lisossomos das células de Kupffer mediado pelos receptores CD36 e SR-A (também conhecido como receptor *scavenger* de macrófago 1, MSR1) (BIEGHS *et al.*, 2010; LIU, L. *et al.*, 2015). Em condições normais, a LDL circulante é endocitada pelas células de Kupffer e inicialmente direcionada para os lisossomos. Após ação das enzimas lisossômicas, o colesterol livre é transferido para o citoplasma, onde pode ser convertido em ésteres de colesterol. As LDLox podem ser captadas pelos receptores *scavengers* CD36 e SR-A nas células de Kupffer, e como a LDL, também são direcionadas para os lisossomos, mas por mecanismos ainda pouco conhecidos, se acumulam e desencadeiam uma resposta inflamatória hepática (**Figura 4**) (BIEGHS *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Captação de lipoproteínas oxidadas pelas células de Kupffer (KCs). Em condições normais as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) circulantes são captadas pelas KCs e se direcionam para os lisossomos, onde seu conteúdo é degradado por enzimas lisossômicas. Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) podem ser captadas pelos receptores *scavengers* CD36 e SR-A nas KCs e direcionadas para os lisossomos, onde se acumulam. LDLox ficam aprisionadas no interior dos lisossomos provocando uma resposta inflamatória.

Fonte: Adaptado de BIEGHS *et al.* (2013).

### 2.3. Sistema antioxidante

O organismo contém antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam como uma unidade complexa de regulação da homeostase de ERO nas células (POWERS; JACKSON, 2008; TRACHOOTHAM *et al.*, 2008; RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014).

O sistema enzimático é constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), paraoxonases (PONs), entre outras (VALKO *et al.*, 2006; NOORI, 2012; RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014).

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) transformando-os em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). Existem três isoformas nos mamíferos que catalisam a reação de dismutação dos íons  $O_2^{\bullet-}$ , sendo todas ligadas a um metal de transição no sítio ativo para realizar sua ação: a SOD-Cu/Zn (SOD1), localizada no citoplasma, SOD-Mn (SOD2) localizada na mitocôndria e SOD-extracelular (SOD3) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; POWERS; JACKSON, 2008).

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular (hemoproteína) localizada principalmente em peroxissomos celular, e em menor extensão, no citosol, que catalisa a reação de decomposição do  $H_2O_2$ , formando água e  $O_2$ . Ao remover o  $H_2O_2$ , a CAT age indiretamente contra os radicais superóxido, que são convertidos em  $H_2O_2$  pela SOD. A enzima torna-se



especialmente importante quando há quantidade limitada de glutatona ou atividade reduzida da GPx e desempenha um papel significativo no desenvolvimento de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa das células (POWERS; JACKSON, 2008).

A glutatona peroxidase (GPx) catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou hidroperóxidos orgânicos para água, na mitocôndria. A redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorre pela conversão da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG), que é catalisada pela GPx. Para que o sistema continue operante é necessário que a GSSG seja reduzida novamente, a enzima que promove esta redução é a glutatona redutase (GR) (HALLIWELL, BARRY, 1999; POWERS; JACKSON, 2008).

Além dessas enzimas, outras proteínas que possuem um papel antioxidante significativo são as paraoxonases (PONs) (MACKNESS, M. I.; ARROL; DURRINGTON, 1991; AVIRAM, MICHAEL; ROSENBLAT, 2004).

### **2.3.1. Paraoxonases**

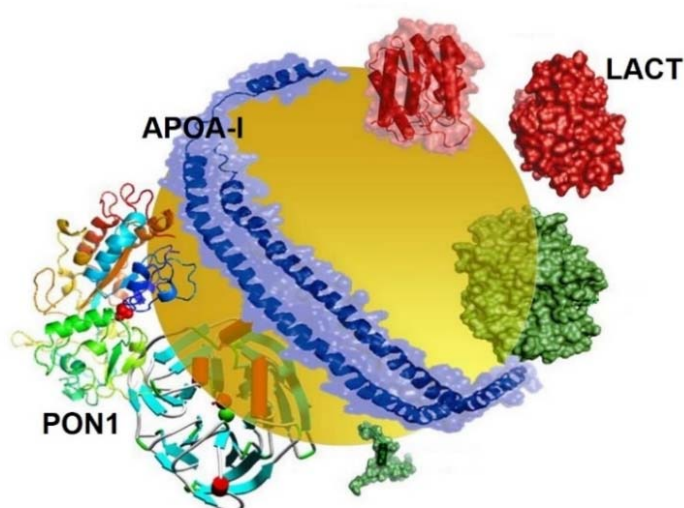
A paraoxonase (PON) é uma família multigene de enzimas composta de três diferentes membros, PON1, PON2 e PON3, que compartilham considerável homologia estrutural e estão localizados no braço longo do cromossomo 7 em humanos e no cromossomo 6 de ratos (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996). As isoformas PON1 e PON3 são expressas basicamente no fígado e rins e são encontradas no plasma associadas à lipoproteína de alta densidade (HDL) (JAOUAD *et al.*, 2006; MARSILLACH *et al.*, 2008). A PON2 não é encontrada no plasma, mas é expressa em uma variedade de órgãos e células que incluem o cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão, rins, testículos, monócitos e macrófagos (NG *et al.*, 2001; COSTA, L. G. *et al.*, 2003; ROSENBLAT *et al.*, 2003; NG *et al.*, 2005).

Inicialmente, a PON1 foi caracterizada como uma organosfosfato-hidrolase, sendo considerada uma enzima de proteção do sistema nervoso, pois pode desintoxicar os derivados oxon e diazoxon de alguns pesticidas organofosforados. Seu nome deriva de um dos seus substratos mais comumente usados *in vitro*, o paraoxon, metabólito tóxico do inseticida *parathion* (DRAGANOV, D. I.; LA DU, 2004). Tanto a PON2 quanto a PON3 possuem apenas a atividade de lactonase (CAMPS; MARSILLACH; JOVEN, 2009), entretanto, somente a PON1 possui a capacidade de metabolizar organofosforados, toxinas nervosas (sarin, soman), ésteres aromáticos (fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato) e lactonas aromáticas e alifáticas (dihidrocurarina, homocisteína tiolactona), exibindo assim atividade paraoxonásica,

arilesterásica (ARE) e lactonásica (DRAGANOV, D. I.; LA DU, 2004; COSTA, L. G. *et al.*, 2005; PONCE-RUIZ *et al.*, 2017).

O interesse pela PON1 surgiu a partir de evidências que demonstraram que esta enzima possuía capacidade de proteger a LDL contra modificações oxidativas, bem como poderia reduzir a formação de células espumosas pelos macrófagos e prevenir o desenvolvimento da aterosclerose (AVIRAM, MICHAEL; ROSENBLAT, 2004; FUHRMAN; VOLKOVA; AVIRAM, 2005). É o membro mais estudado da família e grande parte da compreensão das enzimas PON é derivada principalmente de estudos com esta isoforma (SORENSEN *et al.*, 1995; PRIMO-PARMO *et al.*, 1996).

A PON1 está presente no soro, fortemente associada à apolipoproteína A-I (ApoA-I), indicando uma interação específica com a HDL (AVIRAM, MICHAEL *et al.*, 1998; AVIRAM, MICHAEL *et al.*, 1999; COSTA, L. G. *et al.*, 2005) (**Figura 5**). É uma glicoproteína com atividade de esterase e completamente dependente de cálcio para sua ação hidrolítica contra substratos organofosforados (AVIRAM, M *et al.*, 2005; MARSILLACH *et al.*, 2008). Constitui-se de 355 aminoácidos, com peso molecular de 43 a 45 kDa e possui três cadeias de carboidratos que correspondem a 15,8% do seu peso (LA DU, 1996; MACKNESS, B.; DURRINGTON; MACKNESS, 1998; MARSILLACH *et al.*, 2008). A atividade da PON1 está presente no soro, em eritrócitos e em outras células. O fígado, além de concentrar parte desta atividade, representa a fonte primária da enzima encontrada no plasma (COSTA, L. G. *et al.*, 2003; DRAGANOV, D. I. *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL). PON1: Paraoxonase 1; ApoA-I: Apolipoproteína A-I; LCAT: Lecitina colesterol acil transferase.

Fonte: <http://www.disva.univpm.it/content/biochemistry-food-nutrition-and-oxidative-stress-uv-induced>.

A atividade antioxidante promovida pela PON1 só é possível a partir da interação específica entre a PON1 e os lipídios oxidados. Duas hipóteses prováveis foram formuladas para explicar sua atuação: na primeira, a ação protetora seria difundida durante a interação entre HDL/LDL e a PON; na segunda hipótese, considerada a mais provável, os lipídios oxidados da LDL devem ser primeiramente capturados pela HDL (JAMES; DEAKIN, 2004). Já foram relatadas várias funções da PON ligada à HDL as quais incluem a inibição da geração de peróxidos lipídicos na LDL induzida por cobre e atividade fosfolipase A2-like que hidrolisa fosfolipídios oxidados biologicamente ativos (WATSON *et al.*, 1995; ASSMANN; NOFER, 2003; LI; LIU; LIANG, 2003). Também já foi reportado um papel similar ao da peroxidase (peroxidase-like) para a PON, dado a sua capacidade de inibir a oxidação também da HDL, preservando assim suas funções antiaterogênicas e a habilidade de eliminar oxidantes potentes (como os hidroperóxidos e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AVIRAM, MICHAEL *et al.*, 1998; COSTA, L. G. *et al.*, 2003; VAN HIMBERGEN *et al.*, 2005).

A PON1 têm recebido destaque nas pesquisas, uma vez que a sua atividade no plasma foi encontrada reduzida em muitas doenças, tais como aterosclerose, diabetes *mellitus*, doença renal crônica e hipercolesterolemia (SHIH *et al.*, 1998; BOEMI *et al.*, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2010; GUGLIUCCI; KOTANI; KIMURA, 2012). A atividade deficiente de PON1 no soro também foi associada a um risco aumentado para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (ERLICH *et al.*, 2012).

Corroborando a esses achados, têm-se demonstrado um papel importante da PON1 na regulação do estresse oxidativo, fibrose e apoptose celular em doenças crônicas do fígado (FERRÉ *et al.*, 2006; KEDAGE *et al.*, 2010; ABDEL-WAHHAB; FAWZIB; MANNAA, 2015). Os níveis de PON1 foram significativamente diminuídos no soro de pacientes portadores de doenças crônicas do fígado, como a NAFLD, hepatite e cirrose (FERRÉ *et al.*, 2002; KILIC *et al.*, 2005).

García-Heredia *et al.* (2013) também demonstraram que camundongos deficientes em PON1 e alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura e 1% de colesterol) por 22 semanas mostraram aumento da esteatose hepática com presença de gotículas lipídicas em 83,3% dos hepatócitos, enquanto foram encontradas 14,5% de gotículas lipídicas nos hepatócitos de camundongos selvagens. Esse estudo também mostrou aumento de marcadores de estresse oxidativo e inflamação no fígado de camundongos deficientes em PON1, além de apresentarem aumento das vias metabólicas envolvidas com a síntese de lipídios quando comparados aos camundongos selvagens. Os autores sugeriram que a PON1 possui um

importante papel na proteção do fígado contra o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídios induzidos por dieta.

A PON2 possui propriedades semelhantes à PON1, mesmo que ausente no plasma (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996). Já foi relatado que a PON2 é capaz de diminuir o estresse oxidativo intracelular e de prevenir a oxidação da LDL. Células com elevada expressão de PON2 quando foram expostas a fosfolipídios oxidados ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram uma redução no estresse oxidativo e na oxidação de LDL, sugerindo uma ação de PON2 no estresse oxidativo intracelular (NG *et al.*, 2001).

A PON3, similar à PON1, é uma esterase cálcio dependente, que se encontra associada a frações de HDL no plasma (GUPTA; GILL; SINGH, 2009). Ensaios *in vitro* mostraram que essa enzima, assim como a PON1, inibiu a oxidação de lipídios na LDL (REDDY, S. T. *et al.*, 2001). No estudo de Draganov *et al.* (2000) foi demonstrado que a atividade sérica da PON3 no coelho foi mais eficaz que a PON1 na proteção da LDL contra a oxidação induzida por cobre. Shih *et al.* (2007) demonstraram que o aumento da expressão de PON3 diminuiu significativamente a formação de lesões ateroscleróticas e a adiposidade em camundongos, sugerindo um papel importante desta enzima na proteção contra a aterosclerose e a obesidade.

Como se viu, a enzima PON1 é encontrada no soro fortemente associada à ApoA-I na HDL. A ApoA-I é sintetizada no fígado e, em menor quantidade, no intestino (BOLANOS-GARCIA; MIGUEL, 2003) e, assim como para a PON1, o seu papel na inibição da aterosclerose também foi reportado (RADER, 2002). O estudo de Moore *et al.* (2005) mostrou que a falta de ApoA-I causou redução na atividade de PON1 e não alterou os níveis da HDL em camundongos C57BL/6 ApoA-I<sup>-/-</sup>. Além disso, também foi demonstrado que camundongos C57BL/6 ApoA-I<sup>-/-</sup> desenvolveram NAFLD, sugerindo que a ApoA-I pode ser também um importante modulador de processos associados com a deposição de lipídios hepáticos e desenvolvimento da NAFLD induzida por dieta (KARAVIA *et al.*, 2012).

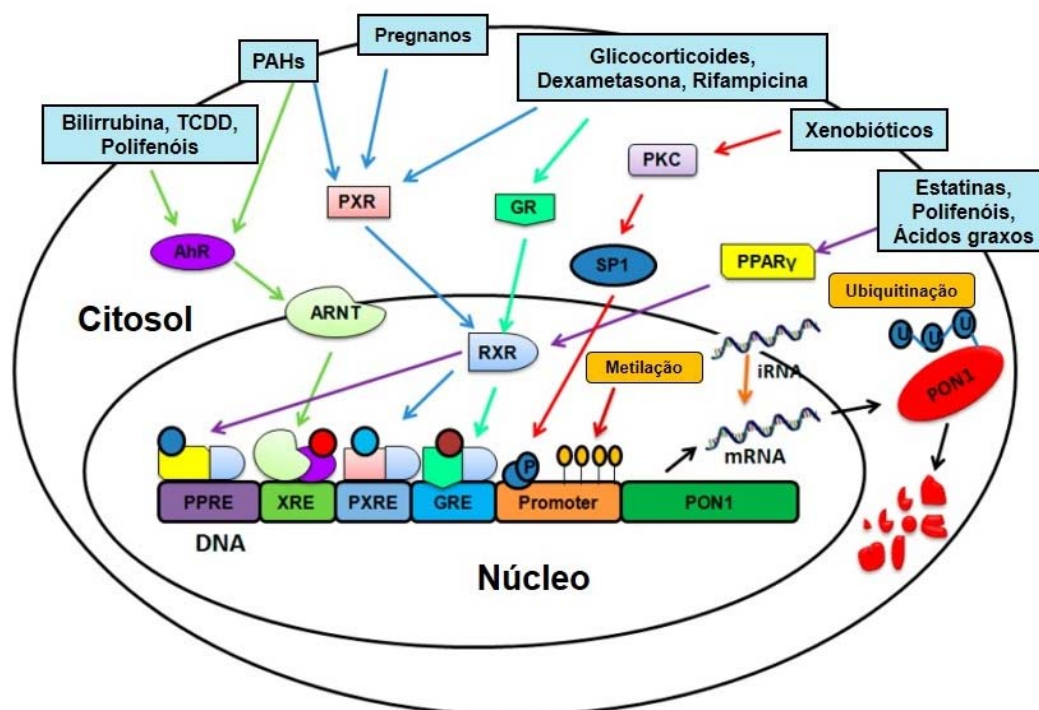
#### **2.4. Sistema de defesa antioxidante não enzimático**

Além das enzimas antioxidantes descritas, há diversos antioxidantes não enzimáticos nas células, como a glutatona, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas C e E (POWERS; JACKSON, 2008), como também compostos exógenos, como os compostos fenólicos e os carotenoides (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes da dieta (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007) e são encontrados em uma ampla variedade de alimentos vegetais consumidos, tais como frutas, legumes, cereais, leguminosas, e em bebidas de origem vegetal, como o vinho, chá e café. Estes estão relacionados com a atividade antioxidante, atuando na captura de radicais livres e na inibição da peroxidação de lipídios (COUTINHO *et al.*, 2008). A ingestão de alimentos ricos em polifenóis está associada em modelos experimentais humanos e animais com diminuição em: i) dislipidemias e aterosclerose; ii) disfunção endotelial e hipertensão; iii) ativação de placa aterosclerótica e trombose ; iv) processos inflamatórios associados com doenças cardiovasculares (BERTELLI; DAS, 2009) e v) efeitos antihiperlipidêmico e hepatoprotetor na NAFLD, que os tornam benéficos para a saúde humana (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2012; YOSHIMURA *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado que os polifenóis podem modular a expressão gênica de enzimas antioxidantes via interação com receptores nucleares (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004; GONG *et al.*, 2009; PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2011).

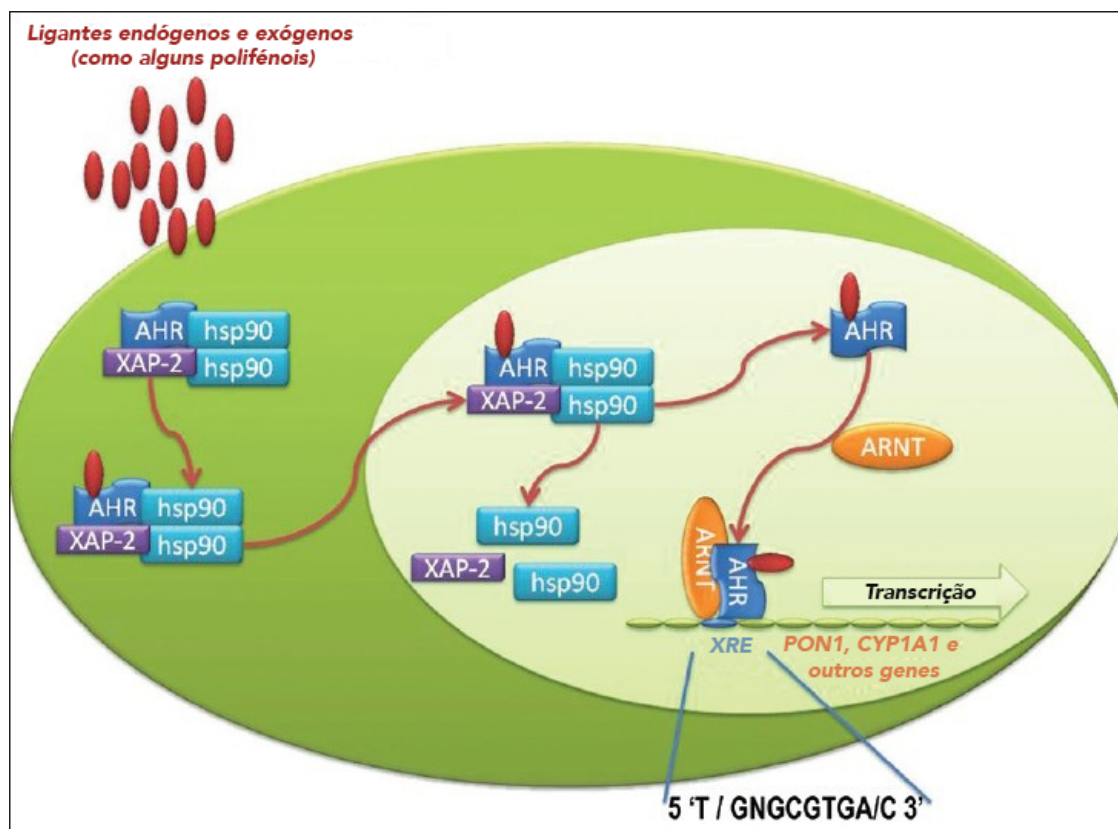
Considerando a PON1, alguns fatores de transcrição têm sido implicados na regulação de sua expressão. Diversos estudos têm mostrado que a região promotora de PON1 contém pelo menos um sítio de ligação para a proteína de especificidade 1 (Sp1) na posição -108. Também na posição -162, um potencial sítio de ligação para o fator nuclear 1 (NF-1) tem sido reportado e ambos os sítios têm um importante papel na regulação transcricional de PON1. Particularmente, o receptor celular aril hidrocarboneto (AhR), receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR) e receptor X farsenóide (FXR) têm sido estudados como possíveis mediadores da indução de PON1 por xenobióticos. Recentemente, fatores de transcrição adicionais também foram encontrados na região promotora de PON1 como sítios de ligação potenciais, como o receptor pregnano X (PRX), receptor retinóide X (RXR), receptor de glicocorticoides (GR), receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR- $\alpha$ ) e receptor de vitamina D (VDR) (**Figura 6**) (PONCE-RUIZ *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na regulação gênica de PON1 por receptores nucleares. Modulação de PON1 durante a biotransformação de xenobióticos (estresse oxidativo); modulação por polifenóis através do receptor Aril hidrocarboneto (AhR) e receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR $\gamma$ ); modulação através de GR, PXR, RXR e VDR.

Fonte: Adaptado de PONCE-RUIZ et al. (2017).

Conforme exposto, os polifenóis podem induzir a expressão de PON1 pelo mecanismo de ativação da via do AhR (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004; LITVINOV; MAHINI; GARELNABI, 2012). O AhR é uma proteína citoplasmática que está complexada com duas proteínas “Heat shock”, (HSP) de 90 kDa e uma proteína de interação (XAP2). Ligantes endógenos e exógenos, como os polifenóis, funcionam como um potente agonista: atravessam a membrana plasmática e difundem-se pelo citoplasma, ligando-se ao AhR. O complexo ligante-AhR é transportado para o núcleo, onde se dissocia e o AhR se dimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT). O heterodímero AhR/ARNT então se liga ao elemento de resposta a xenobióticos (XRE) na região promotora e ativa a transcrição de genes alvos de AhR, que incluem enzimas de metabolização de xenobióticos, tais como a PON1 e o complexo citocromo P4501A1 (CYP1A1) (**Figura 7**) (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004; XUE et al., 2017).



**Figura 7.** Via de sinalização do AhR. O receptor aril hidrocarboneto (AhR) é ativado por vários ligantes, como alguns polifenóis. O AhR é uma proteína citoplasmática que está complexada com hsp90 e XAP2. Após se ligar ao ligante, o AhR se transloca para o núcleo e forma um heterodímero AhR/ARNT, o qual se liga a elementos de respostas a xenobióticos (XRE) e ativa a transcrição de genes que codificam para enzimas de detoxificação de fase I e II, como a enzima paraoxonase.

Fonte: Adaptado de ZHANG (2011).

Outro mecanismo proposto pelo qual os polifenóis podem induzir a expressão de PON1 é por meio da ativação da proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol-2 (SREBP-2) (GARIGE *et al.*, 2010). Este fator nuclear de transcrição se liga a sequencias de DNA com homologia com o SER (elementos responsivos a esteróis) na região promotora de PON1. O SREBP-2 é capaz de se ligar à região promotora de PON1 de uma maneira aparentemente interativa com Sp1 (DEAKIN, S. P.; JAMES, 2004). Neste contexto, GARIGE *et al.* (2010) relataram que a quercetina aumentou a expressão gênica de PON1 *in vitro* por induzir a translocação da proteína SREBP-2 do retículo endoplasmático para o núcleo, onde a proteína se liga à sequência SER aumentando a regulação e a transcrição do gene PON1.

## 2.5. Diagnóstico e tratamento da NAFLD

Em qualquer estágio, a NAFLD é comumente assintomática. A suspeita da doença geralmente inicia-se através da hepatomegalia detectada por exame clínico, aumento dos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) ou alterações sugestivas em exames de imagem como ultrassonografia. A partir daí é necessário excluir a presença de outras doenças hepáticas como doenças alcoólicas, hepatites virais crônicas, doenças hepáticas autoimunes, entre outras (HASHIMOTO; TANIAI; TOKUSHIGE, 2013). A biópsia hepática é considerada o padrão ouro no diagnóstico da NAFLD, que permite identificar o grau de infiltração de lipídios e a presença de inflamação e fibrose, porém por se tratar de um procedimento invasivo não é sempre requerido (CAVE *et al.*, 2007; BHATIA *et al.*, 2012).

O tratamento atual para a NAFLD visa reduzir a resistência à insulina e o estresse oxidativo, controlar as condições associadas (obesidade, diabetes *mellitus*, dislipidemia) e também reduzir a inflamação e a fibrose do fígado. Modificações de estilo de vida, incluindo uma mudança de hábitos alimentares e a prática regular de atividade física, cirurgia bariátrica, terapia medicamentosa para melhorar a resistência à insulina e o uso de antioxidantes são algumas das terapias propostas. Outras abordagens de tratamento têm como objetivo inibir as vias pró-inflamatórias ou pró-fibróticas (LISBOA *et al.*, 2016). Dentre as terapias farmacológicas sugeridas estão as drogas sensibilizadoras de insulina como a metformina e os derivados tiazolidinedionas (NAIR; DIEHL; PERRILLO, 2002; NEUSCHWANDER-TETRI *et al.*, 2002), os inibidores da dipeptidil peptidase -IV (DPP-IV), como a vildagliptina e linagliptina, inibidores de caspases e inflamação, agonistas de PPAR, como bezafibrato e rosiglitazona, inibidores do cotransportador sódio-glicose tipo 2 (SGLT-2), agonistas do receptor FXR e probióticos (SCHUPPAN; SCHATTENBERG, 2013).

Considerando a crescente prevalência da NAFLD é importante o desenvolvimento de modelos de estudo e investigações com intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos e estabelecimento de estratégias farmacológicas e não farmacológicas para atenuar sua progressão.

## 2.6. O fruto do Açaí e seu papel como alimento funcional

A espécie *Euterpe oleracea* Martius é uma palmeira da família *Arecaceae*, amplamente encontrada na região amazônica, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins,



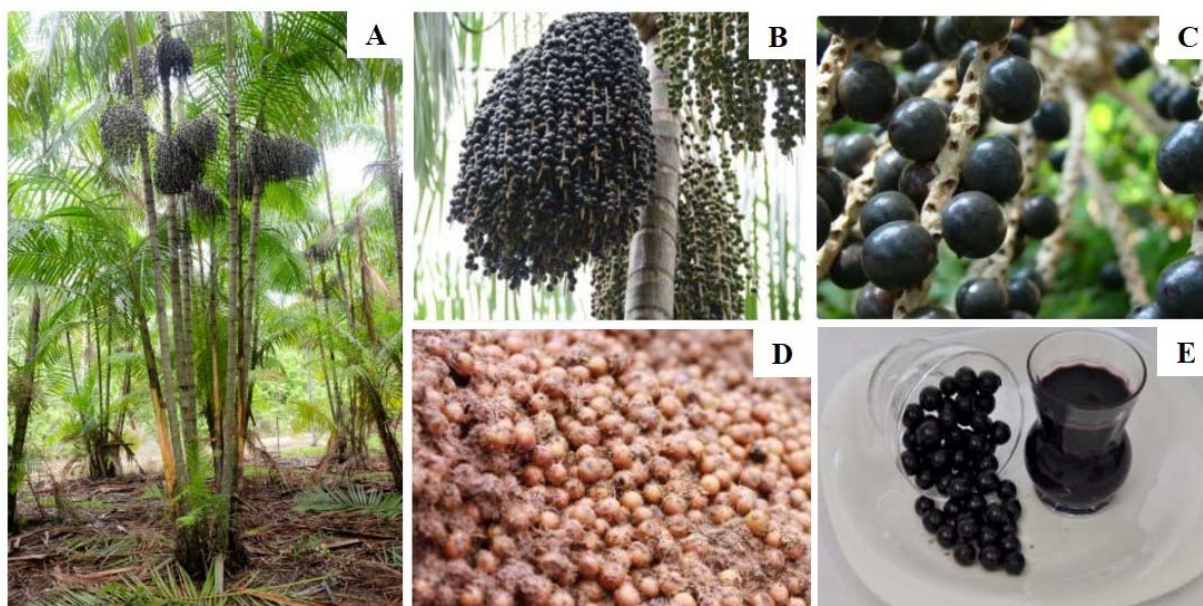
Maranhão, Mato Grosso e Amapá e estende-se para a Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana (CALZAVARA, 1972; VAN ROOSMALEN, 1985; CAVALCANTE, 1991; NOGUEIRA, L., 2006).

O epíteto genérico é uma homenagem a Euterpe, deusa da mitologia grega e traduzido significa “elegância da floresta” em alusão à beleza da planta. Já o nome específico “oleracea” significa que parece ou exala odor semelhante ao do vinho, devido à cor e ao aroma da polpa, principalmente quando em início de fermentação. Açaí é uma palavra de origem tupi –yá-çai- e significa fruto que chora, provavelmente relacionado ao fato de que durante o processo de extração da polpa, esta flui lentamente, em forma de grandes gotas (DE OLIVEIRA, M. D. S.; DE CARVALHO; DO NASCIMENTO, 2000).

Os frutos são popularmente conhecidos como açaí, são esféricos, na cor preto púrpura, com cerca de 1 a 2 cm de diâmetro, com um peso médio de 0,8 a 2,3 g e contém uma única semente grande (**Figura 8**). O açaízeiro se destaca, entre os diversos recursos vegetais, pela sua abundância e por produzir importante alimento para as populações na região do estuário do Rio Amazonas, além de ser a principal fonte de matéria-prima para a agroindústria de palmito no Brasil (NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIREDO; MULLER, 2005). O principal produto extraído do fruto do açaí é a polpa, também chamada “vinho de açaí”, ou simplesmente açaí, consumida em uma variedade de bebidas e preparações alimentares, como cremes, licores, geleia, mingau, sorvetes e doces (SOUZA *et al.*, 1996).

A partir de meados da década de 90, o açaí foi gradativamente conquistando novas fronteiras, sendo apreciado em todo o Brasil e no mercado internacional em países como Estados Unidos, membros da Comunidade Européia, Japão e América do Sul (DA SILVA; DE SANTANA; DA SILVA REIS, 2010; DE SANTANA; CARVALHO; MENDES, 2010).

A produção nacional de açaí em 2011 foi de 215,4 mil toneladas, sendo o estado do Pará o principal contribuinte, com 50,8% da produção, seguido pelo estado do Amazonas com 41,5%, o que gerou um movimento monetário estimado de US\$ 700.000. O gênero *Euterpe* tem um alto potencial econômico, em razão do uso dos seus frutos na preparação de bebidas de açaí, que são exportadas para todo o mundo como bebida energética (DE LIMA YAMAGUCHI *et al.*, 2015).



**Figura 8.** Fotos do Açai (*Euterpe oleracea* Martius). Fotos mostrando **A:** Palmeira do açai; **B:** Cachos do açai; **C:** Fruto do açai, **D:** Carçoço de açai beneficiado e **E:** Açai *in natura* e suco da fruta.

Fonte: [www.embrapa.org](http://www.embrapa.org)

### 2.6.1. Composição química e compostos bioativos da polpa do açai

O açai apresenta um considerável valor nutritivo e muitos efeitos benéficos à saúde são associados ao seu consumo (BOBBIO; DRUZIAN; ABRAO, 2000).

Schauss et al. (2006a) determinaram a composição nutricional da polpa de açai e encontraram 32,5% de lipídios, 52,2% de carboidratos (dos quais 44,2% são de fibras e 1,3% são de açúcares) e 8,1% de proteínas. Além disso, o estudo mostrou que este fruto apresenta quantidades bastante expressivas de ácidos graxos insaturados e fitosteróis. Os ácidos graxos poliinsaturados, monoinsaturados e saturados representam, 11,1%, 60,2% e 28,7% do total de ácidos graxos, respectivamente. O ácido graxo predominante é o ácido oleico (56,2%), seguido pelo ácido palmítico (24,1%) e linoléico (12,5%). Dentre os fitosteróis presentes no açai destacam-se  $\beta$ -sitosterol, campesterol e stigmasterol.

A polpa de açai também contém uma quantidade de fibras bastante expressiva (DA SILVA MENEZES; TORRES; SRUR, 2008), possuindo valores superiores aos relatados para outros frutos como morango, figo e goiaba (RAMULU; RAO, 2003).

Devido à sua composição fitoquímica, o açai tem sido utilizado com um ingrediente alimentar com contribuições funcionais para a dieta, além de sua composição nutricional básica (XIE *et al.*, 2011). Não existe uma definição aceita universalmente para alimentos funcionais,

este conceito varia de acordo com a legislação vigente em cada país e seus hábitos alimentares. No Brasil, alimento funcional é definido pela secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde como “alimento ou ingrediente que além de suas funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente pode produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

Entre os constituintes fitoquímicos do açaí, predominam os compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides, principalmente a classe das antocianinas, pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela cor avermelhada do fruto. Entre as antocianinas destacam-se a cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutenosídeo (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a; PACHECO-PALENCIA; HAWKEN; TALCOTT, 2007). Outras antocianinas são encontradas em menores quantidades como a cianidina-3-sambiosídeo, peonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-rutenosídeo (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a). As antocianinas tornaram-se conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas e propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de LDL, enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (DA SILVA MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

Outros flavonoides também foram identificados no açaí, incluindo epicatequina, catequina, pró-antocianidinas, homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina deoxihexose (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009) e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico e ácido vanílico (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). Na última década, houve um crescente interesse da comunidade científica em investigar as propriedades destes compostos, com atenção particular dada às propriedades antioxidantes e potenciais benefícios à saúde humana associados ao seu consumo.

### **2.6.2. Estudos com o fruto do açaí conduzidos *in vitro***

Diversos estudos conduzidos *in vitro* mostraram propriedades funcionais do açaí. Dentre eles, Matheus et al. (2006) avaliaram os efeitos de extratos obtidos de diferentes partes da palmeira *Euterpe oleracea* Mart. sobre a produção de óxido nítrico (NO), capacidade de neutralização do NO e expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em cultura de macrófagos. Os resultados mostraram um efeito direto dos extratos na inibição da produção de NO, correlacionada à redução na expressão de iNOS.

Destaca-se o potencial do açaí como antioxidante, evidenciado por Schauss et al. (2006b) que mostraram uma alta capacidade antioxidante do açaí *in vitro*, especialmente contra o radical peróxido e ânions superóxido. Spada et al. (2009) também mostraram que o pré-tratamento com a polpa de açaí em tecidos isolados do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos, reduziu o dano oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em lipídios e proteínas e a atividade das enzimas SOD e CAT a níveis basais nestes tecidos.

A propriedade anti-inflamatória do açaí foi demonstrada pela sua capacidade de inibir as atividades das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 em cultura de células (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a). Recentemente, foi demonstrado que os polifenóis do açaí reduziram e preveniram a geração de ERO induzida por lipopolissacarídeo (LPS), em células CCD-18Co (miofibroblastos do cólon). Os dados mostraram ainda redução da expressão de genes e proteínas pró-inflamatórias que estão envolvidos com a inflamação do trato gastrointestinal, em células CCD-18Co estimuladas por LPS (DOS SANTOS DIAS *et al.*, 2015).

Além de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, vários estudos apontam que o açaí possui efeitos pró-apoptótico e antiproliferativo. Frações de polifenóis, extraídos da polpa de açaí, foram reportados como agentes supressores do câncer, uma vez que inibiram ou retardaram a proliferação de células de adenocarcinoma humano HT-29 (PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008) e exerceram atividade antiproliferativa e efeito pró-apoptótico em células leucêmicas HL-60, através de mecanismo mediado pela caspase-3 (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006).

Em outro estudo, Hogan et al. (2010) demonstraram que um extrato enriquecido com antocianinas, obtido a partir da polpa de açaí, possui forte capacidade antiproliferativa em células C6 (glioma cerebral), sendo que nenhum outro extrato, obtido de outros frutos (*Berries*, do inglês) rico em antocianinas, como mirtilo, morando, framboesa e amora apresentou atividade similar nas mesmas condições. Dias et al. (2014) mostraram que o extrato de açaí inibiu a proliferação de células de adenocarcinoma SW-480, sendo este efeito acompanhado pela redução na geração de ERO. Os mecanismos envolvidos neste efeito incluíram a diminuição do fator de transcrição pró-inflamatório NF-κB e alvos de NF-κB, a molécula-1 de adesão intracelular (ICAM-1) e a molécula-1 de adesão vascular (VCAM-1).

### 2.6.3. Estudos com o fruto do açaí conduzidos *in vivo*

Estudos conduzidos *in vivo* também evidenciaram potenciais benefícios do açaí à saúde. Dentre eles, um estudo clínico realizado com humanos saudáveis, demonstrou que o consumo de uma única dose de açaí (7mL/Kg de peso) foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma em até 2,3 vezes para o suco de açaí e em até 3 vezes para o polpa de açaí (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008).

Jensen *et al.* (2008) realizaram um ensaio randomizado, duplo-cego, com doze humanos saudáveis, com idade entre 19-52 anos, no qual o consumo de 120 mL da bebida contendo açaí em sua composição aumentou a capacidade antioxidante e inibiu a peroxidação lipídica nos plasma dos indivíduos testados, após intervalo de duas horas de consumo.

Um estudo piloto realizado com mulheres e homens adultos com sobrepeso mostrou que a ingestão da polpa de açaí (200g por dia) durante 4 semanas reduziu a glicemia de jejum e níveis de insulina após trinta dias de tratamento. Foi verificado também uma redução dos níveis de colesterol total, colesterol LDL e da razão de colesterol total/colesterol HDL (UDANI *et al.*, 2011).

Um estudo realizado com mulheres saudáveis, com idade entre 18-35 anos, mostrou que a ingestão de polpa de açaí (200g por dia) durante 4 semanas melhorou o *status* antioxidante, sendo este efeito observado pelo aumento na atividade da CAT e da capacidade antioxidante total em células polimorfonucleares (PMNs) e redução significativa na produção de ERO (BARBOSA *et al.*, 2015).

Guerra *et al.* (2011) demonstraram que a suplementação com 2% de açaí na dieta aumentou a expressão das enzimas antioxidantes gama-glutamylcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS) e GPx em ratos controle, e ainda reduziu a peroxidação lipídica e aumentou o conteúdo de glutathiona total no fígado de ratos diabéticos. Neste mesmo estudo, foi observado que neutrófilos de ratos que receberam uma suplementação com 2% de açaí na dieta apresentaram redução da produção de ERO em relação a neutrófilos de animais controle.

Parte dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antioxidante do açaí foram elucidadas em estudo que utilizou o *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Neste estudo, foi demonstrado que o açaí aumentou a resistência ao estresse oxidativo por métodos diretos, através da redução da formação de ERO e indiretos, devido a ativação e translocação nuclear de transcrição DAF16, envolvido na resposta ao estresse, regulado pela via de sinalização da insulina (BONOMO *et al.*, 2014).

O tratamento com açaí também exerce efeitos benéficos contra o estresse oxidativo induzido por dietas hiperlipídicas. Sun et al. (2010) avaliaram o efeito da suplementação com 2% de açaí na dieta sobre a longevidade e transcrição gênica no organismo modelo *Drosophila melanogaster*. A suplementação com a polpa de açaí aumentou em 22% a longevidade das moscas alimentadas com dieta hiperlipídica, e em 18% a longevidade de moscas submetidas ao estresse oxidativo causado pelo silenciamento do gene que codifica para superóxido dismutase 1, através da ativação transcricional de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e supressão da expressão do gene que codifica para a fosfoenolpiruvato carboxicinase, uma enzima chave envolvida na gliconeogênese.

De Souza et al. (2010) evidenciaram que a suplementação com 2% de polpa de açaí na dieta de ratos alimentados com dietas padrão e hipercolesterolêmica reduziu os níveis de colesterol total e da fração não-HDL e melhorou o perfil dos biomarcadores de estresse oxidativo no soro, após 6 semanas de suplementação com a polpa de açaí. Neste estudo, foi também demonstrado que a suplementação com açaí aumentou a atividade da enzima PON no soro de ratos alimentados com ambas as dietas e reduziu significativamente a atividade da enzima SOD nos ratos hipercolesterolêmicos. Efeito semelhante sobre o colesterol sérico, também foi observado em outro estudo realizado em coelhos hipercolesterolêmicos, onde o açaí, além do efeito hipolipidêmico também atenuou a aterosclerose (FEIO *et al.*, 2012). Esse efeito parece ser mediado pelo aumento da expressão de genes que codificam para os transportadores ABCG5 e ABCG8, que estão envolvidos com a liberação do colesterol na bile e aumento na excreção fecal de colesterol (DE SOUZA *et al.*, 2012).

Além desses efeitos, estudos tem demonstrado que o açaí possui efeito protetor sobre danos hepáticos. Qu et al. (2014) mostraram que o tratamento com açaí, em modelo de esteatose alcoólica induzida em ratos, reduziu os níveis de ALT, AST, MDA e TAG, bem como os níveis de TNF e IL-6 e aumentou os níveis de glutathiona total (GSH). O tratamento com açaí mostrou um efeito protetor específico nos danos hepáticos, o que foi correlacionado com a inibição dos fatores inflamatórios TNF e IL-6.

Guerra et al. (2015) demonstraram que o extrato aquoso de açaí apresentou efeito protetor sobre a resistência à insulina e a NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em camundongos. O tratamento com o extrato de açaí foi associado com aumento na expressão de adiponectina, redução de TNF, melhora na sensibilidade à insulina e redução no acúmulo de triacilgliceróis no fígado. Os autores sugeriram que a melhora no balanço das adipocinas, adiponectina e TNF, mediada pelo açaí, aumentou a sensibilidade à insulina e promoveu uma

maior oxidação de ácidos graxos, através da ativação de PPAR- $\alpha$  e modulação de vias envolvidas no metabolismo de lipídios no fígado.

O conjunto de propriedades do açaí abordadas aqui apontam para vários possíveis efeitos benéficos desse fruto para o tratamento de doenças crônicas e suas complicações. Assim, considerando que o estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese da NAFLD e que a enzima PON1 exerce um efeito protetor sobre a oxidação da LDL e que sua expressão pode ser regulada por polifenóis, nós formulamos a hipótese de que a ingestão de açaí, uma fonte de polifenóis, poderia influenciar a expressão de PON1, impedindo a oxidação da LDL, atenuando a progressão da NAFLD.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com açaí sobre o estresse oxidativo e inflamação na NAFLD, induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica em ratos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- I. Determinar a composição centesimal, fitoquímica e a capacidade antioxidante da amostra de polpa de açaí utilizada nesse trabalho;
- II. Em ratos com NAFLD e submetidos ou não ao tratamento com polpa de açaí, avaliar:
  - A evolução ponderal e o comportamento alimentar;
  - O perfil lipídico sérico, hepático e fecal;
  - A função hepática e as alterações histopatológicas;
  - Alterações na produção sérica de adipocinas e em variáveis inflamatórias no fígado (IL-6, TNF e níveis de RNAm de receptores *scavengers*);
  - A concentração sérica de LDL oxidada e os níveis dos marcadores de dano oxidativo no fígado (TBARS e proteína carbonilada);
  - A concentração hepática de glutathione total, glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e a razão GSH/GSSG;
  - A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e paraoxonase - 1 (PON1);
  - Os níveis de RNAm das isoformas da Paraoxonase (PON1, PON2 e PON3) e de receptores nucleares envolvidos com a regulação transcricional de PON1 (AhR e SREBP-2) no fígado;
  - A expressão proteica de PON1.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção da polpa filtrada de açaí

A polpa de açaí médio pasteurizada (*Euterpe oleracea* Mart.), de um único lote, livre de corantes e conservantes, foi obtida da Icefruit Comércio de Alimentos Ltda. (Tatuí, São Paulo, Brasil). A polpa foi mantida a -20°C até o momento do uso, na qual foi descongelada e tamisada (tamis: 22 Mesh) com objetivo de filtrar a maior quantidade de fibras para facilitar a administração da mesma via gavagem nos experimentos *in vivo*. Para as análises fitoquímicas e determinação da capacidade antioxidante, a polpa filtrada de açaí foi centrifugada a 2.000 × g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado nas análises.

### 4.2. Caracterização *in vitro* da polpa filtrada de açaí

#### 4.2.1. Composição centesimal

Foram determinados os teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, fibra detergente neutro e carboidratos. As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto.

A umidade foi determinada gravimetricamente com o emprego de calor, o qual se baseia na perda de peso do material quando submetido a aquecimento de 105°C em estufa até atingir peso constante, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

O teor de proteínas foi determinado pelo método de *Kjeldahl*, descrito pela AOAC (1984). Após a digestão da amostra com a mistura digestora (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e ácido sulfúrico, foi realizada destilação e posterior titulação com solução de ácido clorídrico. Os resultados foram expressos em g/100 g de polpa filtrada de açaí, empregando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio em proteína.

Os lipídios totais foram determinados pelo método de *Soxhlet*, que se baseia na extração da fração lipídica por meio de um solvente orgânico adequado. Após extração com éter de petróleo e remoção do solvente determinou-se gravimetricamente a quantidade de lipídios presente na amostra, conforme procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

O teor de cinzas foi determinado por meio da calcinação da amostra em mufla entre 550 a 600°C por seis horas, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

A determinação de fibras detergente neutro foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Van Soest & Wine (1967). Este método consiste em separar os componentes da amostra analisada em conteúdo celular (carboidratos não fibrosos) e parede celular (carboidratos fibrosos) através do aquecimento da amostra em solução de detergente neutro. O conteúdo celular se solubiliza no detergente, enquanto a parede celular não, podendo ser separada por filtração. As frações resultantes são denominadas de solúveis em detergente neutro, e fibra em detergente neutro, constituída por celulose, hemicelulose e lignina.

Os carboidratos foram determinados pela diferença dos valores encontrados para umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibras em 100 g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.2.2. Conteúdo de polifenóis totais**

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Georgé et al. (2005). Neste método, o reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma mistura dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstíco ( $W_8O_{23}$ ) e molibdênio (Mo) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760 nm. Inicialmente, 0,1 mL da polpa filtrada de açaí foram diluídos em 9,9 mL de água destilada. Em tubos de ensaio, 2,5 mL do reagente de Folin diluído em água destilada (1:10) foi adicionado a 0,5 mL da amostra diluída ou solução padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20, 25 mg/L) para obtenção da curva de calibração. Para o branco utilizou-se água destilada. Após 2 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de solução carbonato de sódio (7,5%) e misturou-se vigorosamente. Após incubação de 15 minutos a 50°C, colocou-se a mistura em banho de gelo. As absorvâncias relativas ao branco foram determinadas a 760nm. Foi construído um gráfico utilizando os valores de absorvância *versus* a concentração do ácido gálico. Após análise de regressão linear e obtenção da equação da reta, os valores de absorvância da amostra foram utilizados para o cálculo da concentração de polifenóis. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de polpa filtrada.

### 4.2.3. Antocianinas totais

As antocianinas totais foram determinadas pelo método do pH diferencial, tal como descrito por Giusti & Wrolstad (2001). Esta metodologia permite a quantificação das antocianinas monoméricas totais em função do comportamento espectral diferenciado das monoméricas em relação às poliméricas em condições de pH distintas. Em função dos comprimentos de onda empregados é possível eliminar a interferência de compostos de degradação. A amostra é submetida a dois tampões aquosos distintos, pH 1,0 e 4,5, e as soluções obtidas têm a absorvância medida em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 700nm e comprimento de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ). Para a dosagem, 10 mL da polpa filtrada de açaí foram diluídos em 30 mL de água destilada. Em dois balões volumétricos de 10 mL foram adicionados 0,5 mL da amostra diluída e então, o volume final do primeiro balão foi ajustado com solução tampão pH 1,0 (HCl/ KCl 0,025 M) e o segundo balão com solução tampão pH 4,5 (HCl/CH<sub>3</sub>COONa 0,4 M). As absorvâncias das soluções foram determinadas simultaneamente, em máximos de absorção na região visível e a 700 nm, após incubação no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Para o branco utilizou-se água destilada. O conteúdo de antocianinas monoméricas totais foi expresso em miligramas de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de polpa filtrada de açaí. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 26.900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> e massa molecular de 449,2 g/mol que correspondem à cianidina-3-glicosídeo.

Para a quantificação das antocianinas totais (AT) foram consideradas as absorvâncias a 510 nm e 700nm das amostras diluídas nas soluções tampão pH 1,0 e 4,5 e os cálculos de acordo com a seguinte fórmula:

$$AT = \frac{(A_{\text{max.vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\text{max.vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5} \times PM \times FD}{(\epsilon - 1)} \times 100 \quad (1)$$

**Onde:**

AT são as antocianinas monoméricas totais expressas em mg de cianidina-3-glucosídeo, antocianina majoritária, presentes em 100 g de amostra;

( $A_{\text{max.vis}}$  e  $A_{700\text{nm}}$ ) pH 1,0 são as absorvâncias lidas da solução em pH 1,0 nos comprimentos de onda 510 e 700 nm, respectivamente;

( $A_{\text{max.vis}}$  e  $A_{700\text{nm}}$ ) pH 4.5 são as absorvâncias lidas da solução em pH 4,5 nos comprimentos de onda 510 e 700 nm, respectivamente;

PM é o peso molecular da cianidina-3-glucosídeo;

FD é o fator de diluição da amostra;

$\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar da cianidina 3-glucosídeo em solução tampão pH 1,0 à 510 nm, cujo valor é de  $26.900 \text{ L.cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ;

100 é utilizado para expressar o valor por 100 g de amostra.

#### 4.2.4. Capacidade antioxidante da polpa filtrada de açaí

A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com o método previamente descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). Este método baseia-se na transferência de elétrons do composto antioxidante para o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em solução de metanol. A redução do DPPH por antioxidantes presentes na amostra é seguida pela redução da absorvância a 515 nm.

Resumidamente, as determinações foram realizadas adicionando-se, em tubos de ensaio, 3,9 mL da solução de DPPH 60  $\mu\text{M}$  dissolvidos em metanol a 80% e 100  $\mu\text{L}$  da polpa filtrada de açaí, ou o mesmo volume para as soluções padrões e água destilada (controle). A mistura foi homogeneizada e mantida na ausência de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância da solução foi determinada a 515nm. O metanol a 80% foi utilizado como branco. Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em diferentes concentrações (100 a 700  $\mu\text{M}$ ) em metanol a 80% como antioxidante de referência. A atividade antioxidante foi determinada por meio da redução da absorvância do radical a 515 nm e o percentual de inibição foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição do radical DPPH} = \left( \frac{A_{\text{controle } 515} - A_{\text{amostra } 515}}{A_{\text{controle } 515}} \right) \times 100 \quad (2)$$

#### Onde:

$A_{\text{controle } 515}$  = absorvância da solução de DPPH sem a presença de antioxidantes obtida a 515 nm (controle);

$A_{\text{amostra } 515}$  = absorvância da amostra obtida a 515 nm.

### 4.3. Ensaios *in vivo*

#### 4.3.1 Animais

Foram utilizados ratos, fêmeas, albinas da linhagem *Fischer*, com oito semanas de idade, pesando aproximadamente 138 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. Os ratos foram alojados em gaiolas individuais, localizadas em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade, luminosidade e ventilação. Durante o experimento, as dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, sob o certificado CEUA-UFOP (Protocolo 2012/17, que consta no Anexo I deste trabalho).

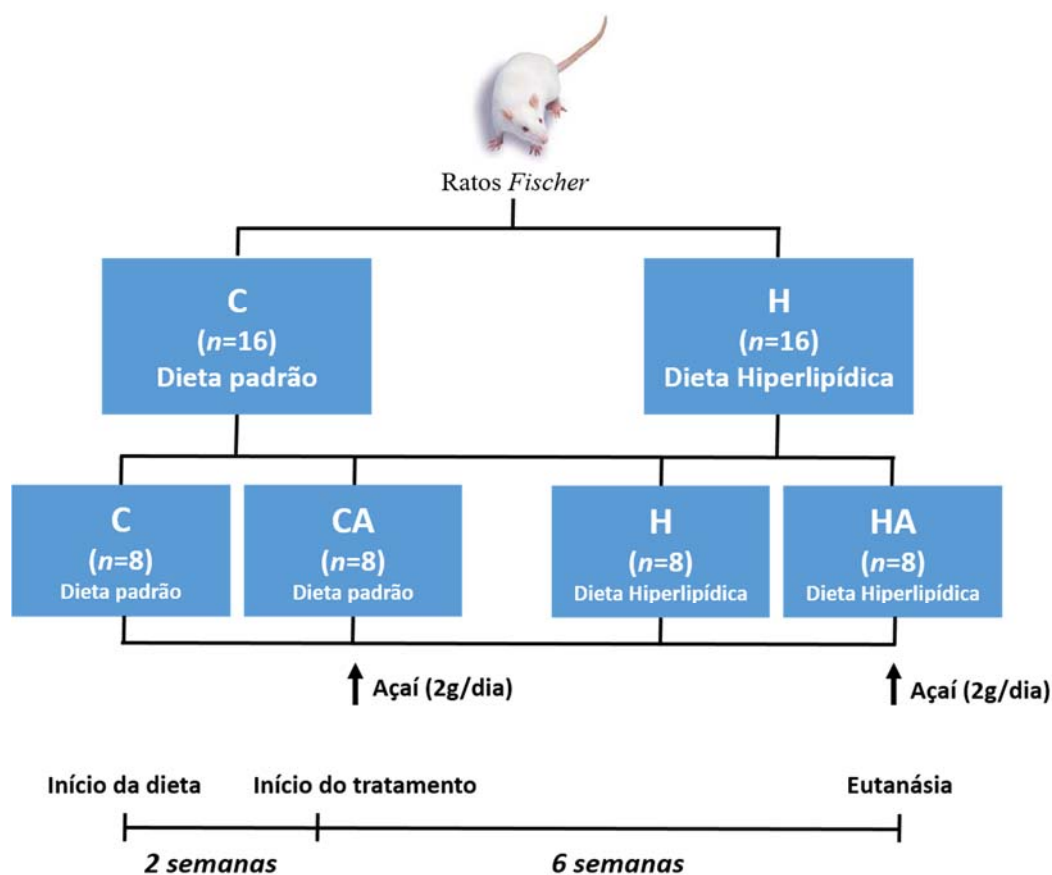
#### 4.3.2. Delineamento Experimental

Inicialmente, trinta e dois ratos foram divididos em dois grupos experimentais ( $n = 16$ ): grupo Controle (C) e grupo Hiperlipídico (H), que receberam dieta padrão AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993), e dieta hiperlipídica (25% de óleo de soja e 1% de colesterol) (MATOS *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2010), respectivamente. As dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. A composição das dietas experimentais está descrita na **tabela 1**.

Após duas semanas, os grupos C e H foram subdivididos de acordo com o tratamento recebido. Os grupos C e CA receberam dieta padrão e os grupos H e HA receberam dieta hiperlipídica. Os grupos CA e HA receberam tratamento com a polpa filtrada de açaí, administrada como uma dose (2g/dia) por gavagem no período claro dos animais por 6 semanas. A dose de açaí utilizada foi definida a partir de trabalhos prévios do nosso laboratório, nos quais foram adicionados 2% de polpa de açaí à dieta, considerando a média de ingestão alimentar do animal (DE SOUZA *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2012). Os animais dos grupos C e H receberam um volume igual de água destilada. A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para avaliar a evolução da massa corporal durante o experimento. Na 5ª semana de experimento, foi realizado o controle de ingestão alimentar e da excreção fecal. A eficiência alimentar foi calculada pela razão entre o ganho de massa (g) e a ingestão alimentar (g).

Ao final de oito semanas experimentais, os animais foram submetidos a doze horas de jejum, anestesiados com isoflurano e eutanasiados por exsanguinação. O delineamento

experimental está apresentado na **figura 9**. O sangue dos animais foi coletado por meio de incisão dos vasos sanguíneos adjacentes ao plexo braquial, recolhido em tubos de polipropileno e centrifugado a  $3.000 \times g$ , por 15 minutos, para obtenção do soro. Aliquotas de soro foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os fígados dos animais foram coletados, lavados em solução salina, pesados, imersos em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores. O menor lobo do fígado foi separado para análise histopatológica, sendo conservado em formalina tamponada a 10%.



**Figura 9.** Representação esquemática do delineamento experimental. Ratos fêmeas, da linhagem *Fischer* foram inicialmente divididos em 2 grupos experimentais, sendo C: controle; H: hiperlipídico. Após 2 semanas, os ratos foram subdivididos em 4 grupos experimentais, sendo: C: controle; CA: controle + açaí; H: hiperlipídico e HA: hiperlipídico + açaí.

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

Nutrientes	Dietas	
	Padrão (AIN93-M)	Hiperlipídica
Colina	2,5	2,5
Mix Vitaminas <sup>1</sup>	10,0	10,0
Mix Minerais <sup>2</sup>	35,0	35,0
Celulose	50,0	50,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de Soja	40,0	250,0
Caseína	140,0	140,0
Amido de milho	622,5	402,5
Colesterol	0,0	10,0
<b>Valor calórico (Kcal /kg)</b>	<b>3810,0</b>	<b>4820,0</b>

<sup>1</sup> - **Mistura de Minerais** (expresso em g/kg da mistura): CaCO<sub>3</sub>: 357; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 250; NaCl: 74; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 46,6; Citrato Tripotássico: 28; MgO: 24; Citrato de Ferro: 6,06; ZnCO<sub>3</sub>: 1,65; MnCO<sub>3</sub>: 0,63; CuCO<sub>3</sub>: 0,3; KI: 0,01; Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>: 0,01; /(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub> . 4 H<sub>2</sub>O: 0,00795 (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993). Os sais foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil).

<sup>2</sup> - **Mistura de Vitaminas** (expresso em g/kg da mistura): Niacina: 3,0; Pantotenato de Cálcio: 1,6; Piridoxina HCl: 0,7; Tiamina HCl: 0,6; Riboflavina - 0,6; Ácido Fólico: 0,2; Biotina: 0,02; Cianocobalamina: 2,5; Vitamina E (500 IU/g): 15; Vitamina A (500.000 IU/g): 0,8; Vitamina D (400.000 IU/g): 0,25; Vitamina K: 0,075; Sacarose: quantidade suficiente para 1Kg (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993). As vitaminas foram adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### 4.4. Análises bioquímicas séricas

As dosagens bioquímicas séricas foram determinadas por método colorimétrico utilizando-se kits da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil), sendo elas: Colesterol Total (Ref.: 76-2/100), Colesterol HDL (Ref.: 13), Alanina Aminotransferase (ALT) (Ref.: 52/200), Aspartato Aminotransferase (AST) (Ref.: 53/200). Todas as dosagens foram realizadas seguindo as orientações do fabricante. A concentração do colesterol não HDL (colesterol VLDL e LDL) foi calculada a partir da diferença da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL e expressa em mmol/L.

#### 4.5. Análise das concentrações séricas de adiponectina e leptina

Os níveis séricos de adiponectina foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA, utilizando-se o kit *Adiponectin rat ELISA kit*, Cat. # KRP0041 (Novex®, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente o soro foi diluído (1:2000) em solução diluente fornecida pelo próprio kit. Adicionou-se 100 µL das amostras ou padrões de adiponectina em uma placa de 96 poços, previamente sensibilizada com anticorpo policlonal anti-adiponectina, a qual foi incubada por 1 hora, a 37°C. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e então foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário em cada poço e a placa foi novamente incubada por 1 hora, a 37°C. Ao término deste tempo, os poços foram lavados novamente como descrito anteriormente. Posteriormente, a placa foi incubada por 1 hora, a 37°C, com a solução de detecção (anticorpo IgG conjugado com HRP) (100 µL por poço). A placa foi novamente lavada (5 vezes) e uma nova incubação com a solução substrato (a qual possui agentes cromogênicos) foi realizada por 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida através da adição de 100 µL da solução de parada em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. A concentração sérica de adiponectina foi expressa µg/mL.

Os níveis séricos de leptina também foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA, utilizando-se o kit *Leptin ELISA kit*, Cat. # EZML – 82K (Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). Brevemente, foram adicionados 10 µL de soro ou dos padrões em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, 50 µL do anticorpo anti-leptina foram adicionados e a placa foi incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, em agitador de placas na velocidade moderada. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com o tampão de lavagem e, em seguida, uma nova incubação com anticorpo secundário de detecção biotilado foi realizada por 1 hora. A placa foi novamente lavada (3 vezes) e incubada com 100 µL de avidina-HRP conjugado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Uma outra lavagem (6 vezes) foi realizada e uma nova incubação com 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) foi feita por 15 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida através da adição de 100 µL da solução de parada em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. A concentração sérica de leptina foi expressa ng/mL.



#### 4.6. Análise das concentrações de citocinas no fígado

Os níveis de IL-6 e TNF foram determinados pelo método ELISA sanduíche. Para tanto, foram utilizados os kits comerciais *Rat IL-6* e *Rat TNF- $\alpha$*  da Peprotech (Rocky Hill, NJ, EUA). Inicialmente, 40 mg do fígado foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão PBS 1X. O homogenato foi centrifugado a  $1.200 \times g$ , por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados na dosagem. Brevemente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L de anticorpo de captura, para cada citocina, diluídos em PBS na concentração de 1  $\mu$ g/mL para posterior incubação *overnight* em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução PBS-T a 0,05% e bloqueadas com 300  $\mu$ L de solução de bloqueio (1% BSA) por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e incubada por 2 horas à temperatura ambiente com 100  $\mu$ L das amostras testes e citocinas padrões (a concentração inicial da curva foi de 5ng/mL e 3ng/mL para IL-6 e TNF, respectivamente). As placas foram lavadas novamente e 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção diluído em diluente (0,05% Tween, 0,1% BSA em PBS) na concentração de 0,25  $\mu$ g/mL foram adicionados a cada poço para incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e 100  $\mu$ L de avidina-HRP conjugado foram adicionados por poço para incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas, 100  $\mu$ L de substrato enzimático foi adicionado a cada poço e então as placas foram incubadas para o desenvolvimento da coloração. As leituras foram efetuadas em leitor de ELISA a 405 nm, com correção de comprimento de onda estabelecido em 630 nm. A concentração de cada citocina foi determinada de acordo com a curva padrão obtida pelas respectivas citocinas padrões e os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

#### 4.7. Extração e dosagem de lipídios hepáticos

Os lipídios totais foram extraídos de uma alíquota de fígado de acordo com o método proposto por Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957) . Para isso, 400 mg de fígado foram homogeneizados em politron com 8 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1, vol/vol). Posteriormente, foram adicionados 0,8 mL de metanol ao homogenato, que foi então centrifugado a  $3.000 \times g$ , durante dez minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente pesado, ao qual foi adicionado 1,6 mL de clorofórmio e 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73%. Após este procedimento, houve nova centrifugação a  $3.000 \times g$ , durante 10

minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 0,3 mL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% metanol, 47% água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa semi-aberta à 40°C para total evaporação do solvente. Após a evaporação, os tubos foram transferidos para o dessecador e pesados novamente. A quantidade de lipídios na amostra foi determinada pela diferença entre o peso final do tubo e o peso inicial do tubo, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de lipídios na amostra (mg)} = (Pt_{\text{final}} - Pt_{\text{inicial}}) \times 100$$

(3)

**Onde:**

$Pt$  = Peso do tubo

Os lipídios extraídos do fígado foram solubilizados em 1 mL de isopropanol. Em seguida, determinou-se a concentração de triacilgliceróis e colesterol total hepático, utilizando-se Kits Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.8. Extração e dosagem de lipídios fecais**

Os lipídios totais fecais foram extraídos conforme descrito por Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957). Inicialmente, 200 mg de fezes foram homogeneizadas com 1,9 mL de solução clorofórmio-metanol (2:1, vol/vol). Ao homogenato foram adicionados 0,4 mL de metanol e posteriormente foi realizada a centrifugação a  $3.000 \times g$  por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um tubo previamente pesado e foram acrescentados 0,8 mL de clorofórmio e 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73%. Em seguida, foram misturados no vórtex e nova centrifugação foi realizada a  $3.000 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 0,3 mL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% metanol, 47% água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa semi-aberta à 40°C para total evaporação do solvente. Após a evaporação, os tubos foram transferidos para o dessecador e pesados novamente. A quantidade de lipídios na amostra foi determinada pela diferença entre o peso final do tubo e o peso inicial do tubo, conforme o mesmo cálculo realizado para quantificação dos lipídios hepáticos descrito anteriormente.

Os lipídios extraídos das fezes foram solubilizados em 0,2 mL de isopropanol. Em seguida, determinou-se a concentração de triacilgliceróis e colesterol nas fezes, utilizando-se Kits Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.9. Análises histológicas do fígado**

Fragmentos do fígado foram fixados em formalina tamponada a 10%. Em seguida, os fragmentos foram cortados transversalmente, processados em série decrescentes de álcoois e incluídos em parafina. Secções parafinadas (4 µm) foram cortadas em micrótomo rotativo (Leica, Alemanha) e montadas em lâminas de microscópio, coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As análises histológicas no fígado foram realizadas por meio de imagens obtidas, aleatoriamente, em microscópio Leica DM5000B e fotografadas na ampliação de 440x (Leica Application Suite, Versão 2.40R1, Alemanha).

Para avaliação do grau de esteatose, foi adotado um sistema semi-quantitativo de escore, analisado em 10 campos microscópicos examinados em cada uma das imagens. A graduação da esteatose hepática foi baseada em trabalho de Brunt et al., (1999), considerando a presença de esteatose macrovesicular (esteatose simples), sendo esteatose macrovesicular – grau 0: sem esteatose; grau 1 (leve): <33% de acúmulo de gordura nos hepatócitos; grau 2 (moderada): entre 33% e 66% dos hepatócitos afetados; grau 3 (grave) >66% dos hepatócitos afetados.

Para quantificação de células inflamatórias, foi realizada contagem automática total de núcleos de células inflamatórias presentes em 15 campos microscópicos, por meio do *Software* Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Welzlar, Alemanha).

#### **4.10. Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo**

##### **4.10.1. LDL oxidada**

Os níveis de LDL oxidada nas amostras de soro foram determinados em microplaca de 96 poços pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA sanduíche utilizando-se o kit *Rat OxLDL*, (*Oxidized Lowdensity Lipoprotein*, Cat. E-EL-R0710) (Elabscience Biotechnology Co. Ltd., Wuhan, China). Para o ensaio, 100 µL do padrão ou do soro diluído foram adicionados aos poços da placa de 96 poços previamente sensibilizada com anticorpo anti-LDLox de rato.

Incubou-se a 37°C, por 90 minutos e o líquido dos poços foi removido. Imediatamente, adicionou-se aos poços 100 µL do anticorpo secundário de detecção biotilado, misturou-se suavemente e incubou-se por 1 hora, a 37°C. Ao término deste tempo, o fluido de cada poço foi aspirado e lavado, repetindo-se este processo por 3 vezes. Em seguida, 100 µL de avidina-HRP conjugado foi adicionado em cada poço e incubou-se por 30 minutos, a 37°C. A placa foi novamente lavada (5 vezes) e uma nova incubação com TMB (90 µL por poço) foi feita por 15 minutos, a 37°C, no escuro. Nesta técnica, apenas os poços que continham LDLox de rato, anticorpo de detecção biotilado e avidina ligada à enzima apresentaram uma coloração azulada. A reação enzima-substrato (TMB) foi terminada com a adição de 50 µL de solução de parada e a cor tornou-se amarela. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. Foi calculada a concentração de LDLox nas amostras pela comparação da densidade óptica das amostras com a curva padrão e os resultados foram expressos em ng/mL.

#### **4.10.2. Peroxidação lipídica no fígado por TBARS**

O ácido tiobarbitúrico (TBA) é capaz de se ligar a lipídios oxidados, permitindo a quantificação de TBARS por método espectrofotométrico (BUEGE; AUST, 1978). Resumidamente, 100 mg do fígado foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris-HCl (20 mM) e o homogenato foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foram misturados com 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCl 0,25 N), 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% de ácido acético 0,25 N) e 12,5 mL de butilhidroxitolueno (BHT) (125 mM em etanol), aquecido por 15 min a 95°C e colocado em banho de gelo. Foram transferidos 0,6 mL da mistura para um tubo de polipropileno e adicionados 0,6 mL de butanol. Os tubos foram agitados e, após uma centrifugação de  $10.000 \times g$  por 10 min, a 4°C, 200 µL do sobrenadante foram recolhidos e colocados em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada baseada na equação da reta, segundo a lei de Lambert Beer, onde foi utilizado 1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

### 4.10.3. Proteína carbonilada

Proteína carbonilada é um método que permite detectar os derivados carbonílicos formados em decorrência da oxidação de proteínas por ERO. No ensaio, emprega-se o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que reage com os grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser detectada espectrofotometricamente (LEVINE *et al.*, 1994).

Na dosagem, 400 mg do fígado foram homogeneizados com 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,7) e o homogenato foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de polipropileno identificados para as amostras e um branco para cada amostra. A cada tubo, foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA 10%) e após centrifugação a  $5.000 \times g$  por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Depois, foram adicionados 0,5 mL de DNPH 10 mM aos tubos com as amostras e 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl 2M) aos brancos. Todos os tubos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos e a cada 15 minutos foram agitados vigorosamente. No passo seguinte, foram adicionados 0,5 mL de TCA 10% em cada tubo. Esses foram centrifugados a  $5.000 \times g$  por 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 ml da mistura etanol/acetato de etila na proporção de 1:1, agitados vigorosamente em vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, e o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido por duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foi adicionado em ambos os tubos 1 ml de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados a  $10.000 \times g$  por 10 minutos, a 4°C. Por fim, as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando-se o coeficiente de extinção molar do DNPH ( $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) segundo a lei de Lambert Beer. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína.

## 4.11. Análise das defesas antioxidantes

### 4.11.1. Obtenção da fração microssomal hepática para dosagem da PON1

A fração microssomal do fígado foi preparada de acordo com o método de Bayrak *et al.* (2010) com modificações. Uma alíquota de 300 mg de fígado foi homogeneizada em tampão Tris/HCl 9 mM, pH 7,4; contendo 0,9 mM de Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 1 mM de ditiotreitól

(DTT), 10% de glicerol, 10 mM de Cloreto de sódio (NaCl) e 5 µL/mL de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). O fracionamento da amostra foi realizado de acordo com Cox & Emili (2006) com modificações. O homogenato foi centrifugado a  $800 \times g$  por 15 minutos a 4°C para remoção dos núcleos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a  $6.000 \times g$  por 20 minutos, a 4°C, para separação do sedimento mitocondrial. O sobrenadante resultante desta etapa foi ultracentrifugado a  $80.000 \times g$  durante 1h, a 4°C. O sedimento microsomal resultante foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão Tris/HCl 9mM (pH 8,0); contendo CaCl<sub>2</sub> a 2mM. A solubilização das membranas microsomais foi realizada com a adição de Triton X-100 a uma concentração final de 0,1%, seguida de uma agitação suave da amostra por 40 minutos. Depois, a amostra foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos e procedeu-se uma nova etapa de ultracentrifugação a  $80.000 \times g$  durante 1h, a 4°C. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado e realizou-se a dosagem da atividade enzimática.

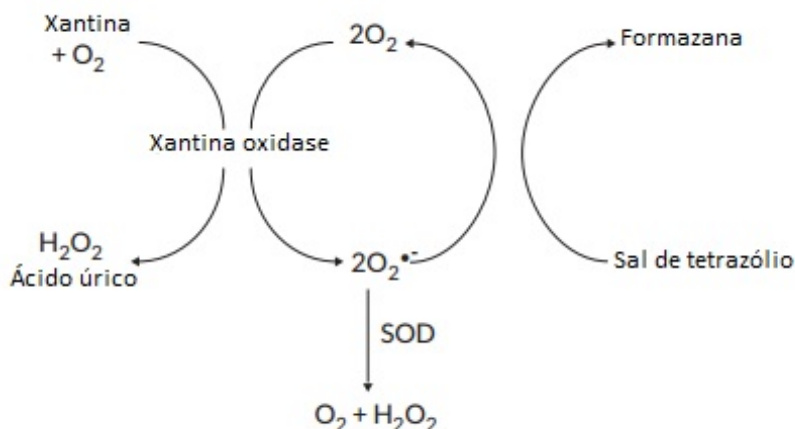
#### **4.11.2. Atividade arilesterásica sérica e hepática da PON1**

A atividade arilesterásica da PON1 foi realizada conforme método descrito por Beltowski, Wojcicka e Jamroz (2002). Esse método utiliza o fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise enzimática do fenilacetato com formação de fenol, cuja taxa de formação é determinada espectrofotometricamente. Uma alíquota de 5 µL do soro (diluído 1:3) ou da suspensão microsomal hepática foi adicionada a 2,5 mL de Tris-HCl a 9 mM; pH 8,0 contendo 0,9 mM de Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e 1 mM de fenilacetato em um tubo. Após exatamente 3 minutos a absorbância foi lida a 270 nm. Para a correção da hidrólise espontânea do fenilacetato incluiu-se um branco constituído pelo tampão Tris/HCl/CaCl<sub>2</sub> e fenilacetato sem a amostra. O resultado foi calculado utilizando-se o coeficiente de extinção molar do fenilacetato ( $\epsilon = 1310 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), segundo a lei de Lambert Beer. Os valores foram expressos em unidades por mililitro de soro (U/mL) ou unidades por miligrama de proteína de microsomas hepáticos (U/mg de proteína), onde uma unidade (U) de paraoxonase é equivalente à hidrólise de 1mmol de fenilacetado por minuto.

#### **4.11.3. Atividade da Superóxido dismutase**

A atividade da superóxido dismutase total foi determinada utilizando o *Superoxide Dismutase assay Kit* (Cayman Chemical, MI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

O método colorimétrico se baseia na utilização de um sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, conforme o esquema apresentado na **figura 10**. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para exibir dismutação de 50% do radical superóxido. O ensaio determina os três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn, e FeSOD). A atividade de SOD foi calculada utilizando a equação obtida a partir de uma curva padrão.



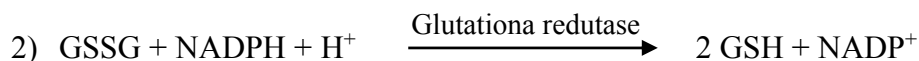
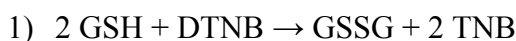
**Figura 10.** Princípio do ensaio de determinação da atividade da Superóxido dismutase.

#### 4.11.4. Atividade da Catalase

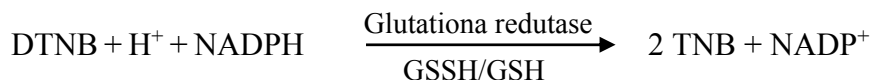
A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1984). O método baseia-se na capacidade da catalase converter o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio molecular, fornecendo, assim, a atividade enzimática. No ensaio, 100 mg do fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 × g por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em um tubo de polipropileno foi colocado 50 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2), 40 µL de água destilada e 10 µL do sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de 0,9 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240nm. Água destilada foi utilizada como branco. A atividade da catalase foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (39,4 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada para o cálculo foi o delta das absorbâncias por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg), onde uma unidade (U) de catalase é equivalente à hidrólise de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

#### 4.11.5. Glutathiona total, reduzida, oxidada e razão GSH/GSSG

O conteúdo intracelular de glutathiona total (GSH) e dissulfeto de glutathiona (forma “oxidada”, GSSG) foi determinado em homogenato do fígado utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5’ ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e GSSG redutase proposto por Griffith (1980). A concentração de glutathiona reduzida foi determinada pela diferença entre glutathiona total e glutathiona oxidada. O ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm, conforme descrito nas seguintes reações:



A combinação das duas reações:



Inicialmente, 100 mg do fígado foram homogeneizados com 1mL de ácido de sulfosalicílico (SSA) 5% (m/v). O homogenato foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado na dosagem.

Para dosagem da GSH, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram colocados em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  da mistura de trabalho [95 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,95 mM de EDTA, 48  $\mu\text{M}$  de NADPH, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutathiona redutase e 0.24% de ácido de sulfosalicílico]. As amostras foram então incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de NADPH (0,16 mg/mL) foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As leituras das absorvâncias foram realizadas a cada minuto, durante 5 minutos, a 412 nm, em leitor de ELISA.

A concentração de GSSG foi determinada através da derivatização da glutathiona reduzida (GSH) presente na amostra com 2-vinilpiridina. Nesse processo, 100  $\mu\text{L}$  do homogenato hepático foi adicionado de 2  $\mu\text{L}$  de 2-vinilpiridina. O pH da solução foi ajustado para valores entre 6 e 7 utilizando trietanolamina (TEA). Após incubação por 60 minutos, as amostras derivatizadas foram utilizadas no ensaio de acordo com o mesmo procedimento descrito acima.



As absorvâncias de diluições seriadas de soluções padrão de glutatona reduzida e oxidada foram determinadas separadamente para obtenção das curvas de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações em nmoles de glutatona total e oxidada por mL de amostra.

## **4.12. Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real**

### **4.12.1. Extração de RNA**

O RNA total do fígado de ratos foi isolado utilizando o sistema SV Total RNA *Isolation System* (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota do fígado (60 mg) foi homogeneizada em 350  $\mu$ L do tampão de lise (RNA *Lysis Buffer*). Em seguida, 175  $\mu$ L do homogenato foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 350  $\mu$ L do tampão de diluição (RNA *Dilution Buffer*). A mistura foi colocada em banho-maria por exatamente 3 minutos e centrifugada a  $14.000 \times g$ , por 10 minutos, a 4°C. Ao sobrenadante, foram adicionadas 200  $\mu$ L de etanol a 95% que posteriormente foram transferidos para a membrana da coluna do *Spin Basket Assembly* e centrifugados a  $14.000 \times g$  por 1 minuto, a 4°C. À membrana dessa coluna foram adicionados 600  $\mu$ L de RNA *Wash Solution*, seguida por centrifugação à  $12.000 \times g$  por 1 minuto, a 4°C. Posteriormente foram adicionados 50  $\mu$ L do mix de incubação de DNase e incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, 200  $\mu$ L de *DNaseStop Solution* foram adicionados à coluna e centrifugados a  $14.000 \times g$  por 1 minuto, a 4°C. Foram realizadas duas lavagens com RNA *Wash Solution* (600  $\mu$ L a  $14.000 \times g$  por 1 minuto e 250  $\mu$ L a  $14.000 \times g$  por 2 minutos, respectivamente). A coluna foi transferida para o tubo de eluição e sobre sua membrana foram adicionados 100  $\mu$ L de *Nuclease Free Water*, que foram posteriormente centrifugados a  $14.000 \times g$  por 1 minuto. A concentração e pureza do RNA total foram verificadas a 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nano Vue (GE *Healthcare*, Reino Unido).

#### 4.12.2. Síntese do cDNA

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

#### 4.12.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de mRNA de *Rattus norvegicus* depositadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o programa Primer-BLAST. O gene de referência endógeno utilizado foi o 18S. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão apresentadas na **tabela 2**.

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

Gene	Sequências
rRNA 18S	F: 5'-GTAAGTGC GGGTCATAAG-3' R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3'
PON1	F: 5'-AAGCTGGCTACACCCACATC-3' R: 5'-AAGCTGGCTACACCCACATC-3'
PON2	F: 5'-TTCTTCAGGCGACATCTGGG-3' R: 5'-TCTGACGAGGGAGGATGGTT-3'
PON3	F: 5'-AAGCTTTGCACCAGACAAGC-3' R: 5'-GTCCTGGTCGAACCCATCAC-3'
APOA-1	F: 5'-TTGGTCGCCTACAGGAACAG-3' R: 5'-TGGAATTCATCCAGGTGGGG-3'
AHR	F: 5'-GCCAATACGCACCAAAAGCA-3' R: 5'-TCGTCCTGTTGGATCAAGGC-3'
SREBP-2	F: 5'-AGCTGGCAAATCAGAAAAACAAG-3' R: 5'-GATTAAAGTCTTCAATCTTCAAGTCCAC-3'
CD36	F: 5'-CTCGGATGGCTAGCTGATTACT-3' R: 5'-ATGCTTTCTATGTGGCCTGG-3'
SR-A	F: 5'-ACTGGTTGATGGTAGCGGAC-3' R: 5'-TGGTATCCTAGACTCCGGCA-3'

rRNA 18 S, Ácido ribonucleico ribossomal 18 S; PON1, Paraoxonase-1; PON2, Paraoxonase-2; PON3, Paraoxonase-3; APOA-1, Apolipoproteína A-1; AHR; receptor aril hidrocarboneto; SREBP-2; proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-2, CD36, receptor *scavenger* classe B- CD36 ; SR-A, receptor *scavenger* classe A.

#### 4.12.4. RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

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

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

$$\Delta C_q = C_q \text{ do gene alvo} - C_q \text{ do gene de referência} \quad (4)$$

Em seguida foram calculados os valores de  $\Delta\Delta Cq$ , de acordo com a equação 5, na qual o valor do  $\Delta Cq$  da amostra controle (grupo C) foi subtraído do  $\Delta Cq$  das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ da amostra teste} - \Delta C_q \text{ da amostra controle} \quad (5)$$

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

#### 4.12.5. Cálculo da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes alvo e do gene controle endógeno, foram construídas curvas padrões para cada amplicon, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise da regressão linear dos valores de CTs em função do logaritmo da respectiva diluição determinou o coeficiente angular da reta ( $a$ , em  $y = ax + b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers, utilizando a equação 6.

$$Ef = (10^{-1/\text{coeficiente angular}} - 1) \times 100 \quad (6)$$

#### **4.13. Determinação de proteínas totais pelo método de Lowry**

A concentração de proteínas totais nos homogenatos do fígado utilizados para determinação da peroxidação lipídica por TBARS, proteína carbonilada, atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e PON1 na fração microsomal hepática foram mensuradas pela técnica de Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino. Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: Foram dissolvidos 0,25 g de sulfato de cobre e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução foi armazenada protegida de luz a temperatura ambiente.

- Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: Em 50 mL do reagente B, adicionou-se 1 mL do reagente A. Este reagente foi preparado na hora do teste.

- Reagente D: Dissolveu-se 1 mL de Folin-Ciocalteu em 1 mL de água destilada. Este reagente foi preparado na hora do teste.

Para a realização do ensaio, 10 µL do sobrenadante do homogenato do fígado foram diluídos em 90 µL de água destilada.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida, foram adicionados 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do reagente D em todos os tubos, misturou-se vigorosamente e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660 nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de BSA foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta, esta foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato hepático.

#### **4.14. Determinação de proteínas totais pelo método BCA**

A concentração de proteínas totais para análise da expressão proteica de PON1 foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), utilizando o kit *Pierce BCA Protein*

*Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para isso, 30 mg de fígado foram homogeneizados em 1,0 mL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 0,5M, 20% Glicerol, 1% Triton X-100, 10 µL/mL de coquetel inibidor de protease, 2 µL/mL de DTT, e 80 µL/mL de NaCl 5M) utilizando-se um homogeneizador mecânico de tecidos. Os homogenatos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Para o ensaio, foi utilizada microplaca de 96 poços, onde em cada poço foi colocado 10 µL de amostra e 200 µL do *mix* de reação [196 µL de BCA (reagente A) e 4 µL de sulfato de cobre (reagente B)]. A microplaca foi incubada a 37°C, durante 30 minutos e, em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de placa de ELISA a 562 nm. Para os cálculos, foi utilizada a curva de calibração, obtida a partir de uma solução estoque de BSA (2 mg/mL), com sucessivas diluições.

#### **4.15. Análise da expressão proteica de PON1 por *Western Blotting***

Um total de 30 µg de proteína foi aplicado por canaleta no gel junto com tampão de amostra LB (*Loading buffer*) (20% Glicerol, 4% SDS, 0,004% Azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8). As amostras foram desnaturadas a 95°C, por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE 12%) para separação por eletroforese. Como padrão de peso molecular utilizou-se o *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (10-250 kDa) (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

A eletroforese foi realizada utilizando-se o sistema *Mini-Protean® Tetra Cell* (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA), com solução tampão de eletroforese (Trizma-Base 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1%). Inicialmente, o SDS-PAGE foi submetido a 60 V, até a passagem demarcada da linha de empilhamento, quando então foi submetido a 80 V até o final do gel de separação. A duração da corrida de eletroforese foi de aproximadamente 130 minutos. A seguir, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-rad), utilizando o sistema de eletrotransferência *Mini Trans-Blot® Cell Module* (Bio-rad) e a solução tampão de transferência (Trizma-Base 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e metanol a 20%) mantidos em corrente constante de 220 mA, por 80 minutos, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram lavadas com água Milli-Q e bloqueadas com tampão salina Tris e Tween 20 [TBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico®)], durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação contínua. Após o bloqueio,

as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T por 5 minutos e incubadas “*overnight*”, a 4°C, com o anticorpo primário, devidamente diluído em solução TBS-T contendo 0,05 % de albumina sérica bovina (BSA). Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 5 minutos e, posteriormente, incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário devidamente diluído em TBS-T contendo 0,05 % BSA. Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBS-T por 5 minutos. A detecção das proteínas marcadas com anticorpos foi realizada usando o sistema de quimioluminescência “*Westar Supernova*” (Cyanagen, Bolonha, Itália), como descrito no manual de instruções. Então, as membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak) em cassete. Em seguida, os filmes foram revelados na forma convencional. Os filmes foram escaneados e as bandas quantificadas com o auxílio do software *Quantity One* (Bio-rad).

Neste procedimento foram usados os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-PON1 (diluição 1:500, Abcam, Cambridge), anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -actina, utilizado como controle de carregamento (diluição 1:2000, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO), anticorpo anti-IgG de camundongo HRP conjugado produzido em cabra (diluição 1:2500 para a membrana incubada com o anticorpo anti-PON1 e diluição 1:5000 para a membrana incubada com o anticorpo anti- $\beta$ -actina, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO).

#### **4.16. Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). A normalidade dos dados foi testada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância univariada ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias e foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise dos dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação das médias e os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. O grau de correlação linear entre duas variáveis foi determinada através da análise de Correlação de Pearson e de Spearman. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Composição centesimal e conteúdo de polifenóis totais e antocianinas monoméricas da polpa filtrada de açaí

Os resultados referentes à composição centesimal e o conteúdo de polifenóis totais e antocianinas monoméricas totais da polpa filtrada de açaí estão apresentados na **tabela 3**. Os resultados mostraram que a polpa filtrada de açaí apresentou um conteúdo significativo de polifenóis totais e antocianinas monoméricas totais.

**Tabela 3.** Composição centesimal e fitoquímica da polpa filtrada de açaí.

Constituintes	Concentração (g/100g)	Concentração (mg/100g)
Umidade	96,00 ± 0,30	---
Lipídios	1,20 ± 0,03	---
Carboidratos*	0,06 ± 0,02	---
Proteínas**	0,42 ± 0,00	---
Fibras (FDN)***	2,20 ± 0,14	---
Cinzas	0,13 ± 0,00	---
<b>Valor calórico (Kcal)</b>	12,7	---
Polifenóis totais (EAG)	---	458,60 ± 4,20
Antocianinas monoméricas totais	---	13,59 ± 0,19

Os dados estão apresentados como a média ± EPM. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As análises da composição centesimal foram determinadas na base seca da polpa filtrada de açaí.

\* Carboidratos = 100 - (umidade + proteína + lipídios + cinzas + fibras).

\*\* Fator de conversão do nitrogênio em proteína: 6,25.

\*\*\* FDN = fibra detergente neutro.

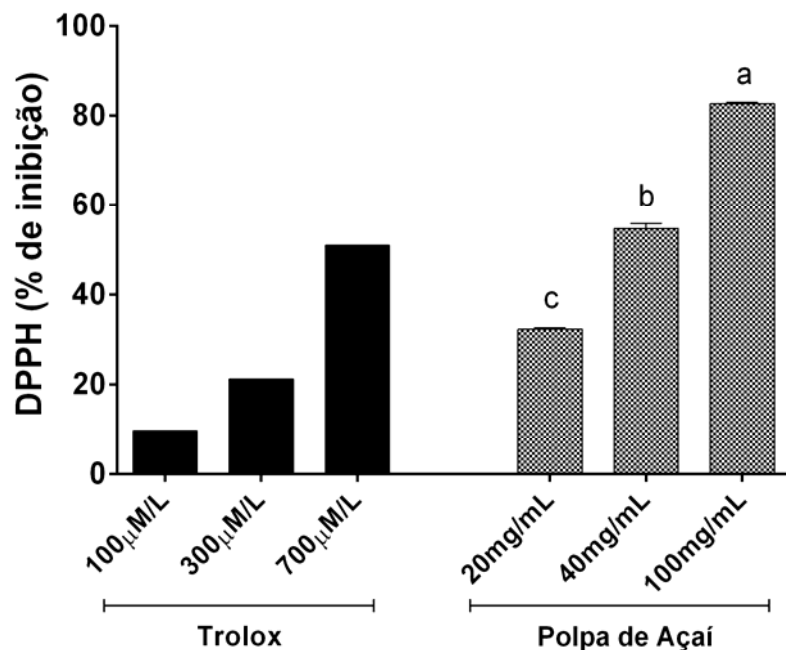
EAG, equivalentes de ácido gálico

### 5.2. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da polpa filtrada de açaí

A capacidade antioxidante da polpa filtrada de açaí e também do antioxidante de referência Trolox foi determinada em diferentes concentrações e expressa em percentual de inibição de oxidação, que corresponde à quantidade do radical DPPH• consumida pelo antioxidante. Os resultados apresentados na **figura 11** mostram que a polpa filtrada de açaí exibiu um aumento da capacidade antioxidante *in vitro* de maneira dose-dependente. Todas as concentrações testadas (20, 40 e 100 mg/mL) apresentaram capacidade de neutralização do



radical DPPH•, especialmente nas amostras menos diluídas, semelhante ao antioxidante padrão Trolox na faixa de 100 a 700  $\mu$ M/L.



**Figura 11.** Percentual de atividade antioxidante da polpa filtrada de açaí e do antioxidante de referência Trolox em diferentes concentrações (tempo de reação com o DPPH: 30 minutos). Os dados para a polpa filtrada de açaí estão expressos como a média  $\pm$  EPM de determinações em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de polpa de açaí, determinada por análise de variância univariada e pós teste de Tukey.

### 5.3. Evolução ponderal, massa do fígado e comportamento alimentar

Os dados apresentados na **tabela 4** mostram que, ao final do experimento, não houve diferença significativa na massa corporal entre os grupos experimentais. Os grupos alimentados com dieta hiperlipídica tiveram um aumento de aproximadamente 41% na massa relativa do fígado quando comparados aos grupos que se alimentaram com a dieta padrão.

Os grupos H e HA apresentaram uma menor ingestão de alimentos em relação aos grupos controles. Entretanto, quando avaliada a eficiência alimentar, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais. Em relação à excreção fecal, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. O tratamento com a polpa de açaí por 6 semanas não alterou o ganho de massa corporal, a massa do fígado, a ingestão de alimentos e a excreção fecal.

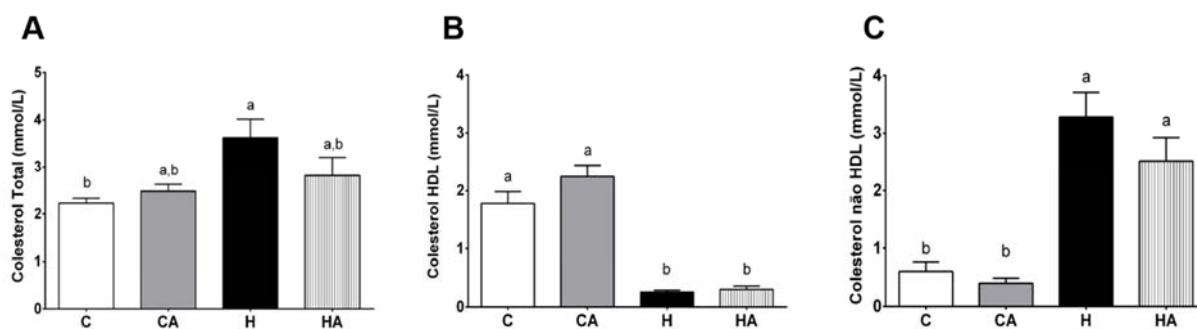
**Tabela 4.** Massa corpórea, massa relativa do fígado e indicadores da ingestão alimentar e excreção fecal de ratos que receberam dieta padrão e hiperlipídica tratados com açaí.

Variáveis	Grupos experimentais			
	C	CA	H	HÁ
Massa corporal inicial (g)	138,20 ± 5,78	139,00 ± 3,39	138,90 ± 4,52	139,80 ± 4,95
Massa corporal final (g)	199,00 ± 5,61	198,10 ± 2,81	209,30 ± 4,76	211,80 ± 3,23
Massa relativa do fígado (g/100 g)	2,64 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,75 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,82 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,14 <sup>a</sup>
Ingestão alimentar (g/dia)	11,65 ± 0,54 <sup>a</sup>	11,24 ± 0,24 <sup>a</sup>	9,07 ± 0,26 <sup>b</sup>	8,91 ± 0,31 <sup>b</sup>
Eficiência alimentar	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,16	0,10 ± 0,02
Excreção fecal (g/dia) *	0,59 (0,53/0,63)	0,65 (0,63/0,68)	0,61 (0,54/0,70)	0,47(0,13/ 0,66)

Os dados estão apresentados como a média ± EPM. \* Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. C, grupo controle; CA, grupo controle + açaí; H, grupo hiperlipídico e HA, grupo hiperlipídico + açaí. (n = 8). Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas.

#### 5.4. Lipídios séricos

Com o objetivo de avaliar alterações no metabolismo de lipídios foram determinadas as concentrações de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL (colesterol total – colesterol HDL) no soro. Conforme apresentado na **figura 12**, os grupos H e HA tiveram um aumento significativo nas concentrações de colesterol total (painel A) e colesterol não HDL (painel C), seguida de uma redução de aproximadamente 80% na concentração de colesterol HDL (painel B) quando comparados ao grupo controle. Observou-se uma tendência do tratamento com açaí em reduzir as concentração de colesterol total e colesterol não-HDL no grupo HA em relação ao grupo H, apesar de não ser significativa.



**Figura 12.** Lipídios séricos de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Concentrações de colesterol total (A), colesterol HDL (B) e colesterol não HDL (C). C, grupo controle; CA, grupo controle + açaí; H, grupo hiperlipídico e HA, grupo hiperlipídico + açaí. (n = 8). Os dados estão expressos como a média ± EPM, (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

### 5.5. Perfil lipídico hepático e fecal

Para avaliar o perfil lipídico hepático e fecal foram determinados o percentual de lipídios, o conteúdo de colesterol total e triacilgliceróis presentes em amostras de fígado e fezes. É possível observar na **tabela 5**, que os grupos H e HA apresentaram um aumento significativo no percentual de lipídios e nas concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis no fígado quando comparados aos grupos controles. O grupo que recebeu tratamento com a polpa de açaí associada a dieta hiperlipídica apresentou uma redução de aproximadamente 14% e 25% no percentual de lipídios e na concentração de triacilgliceróis hepático, respectivamente, quando comparados aos grupos que receberam somente a dieta hiperlipídica. Não houve diferença significativa na concentração de colesterol total hepático no grupo HA quando comparado ao grupo H.

No perfil lipídico fecal, os grupos H e HA apresentaram um aumento significativo no percentual de lipídios e nas concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis quando comparados aos grupos que receberam a dieta padrão. O tratamento com a polpa de açaí não alterou o perfil lipídico fecal.

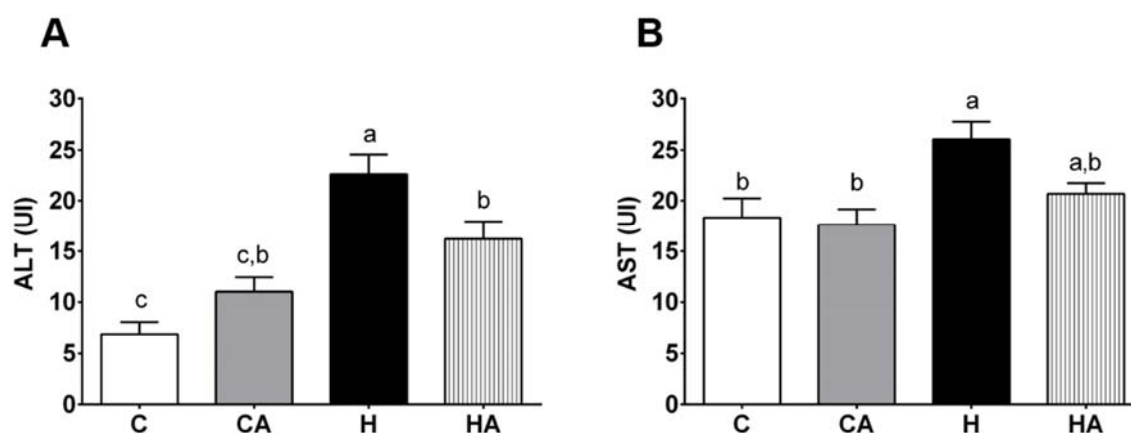
**Tabela 5.** Lipídios totais, concentração de colesterol e triacilgliceróis hepático e excretado nas fezes de ratos que receberam dieta padrão e hiperlipídica tratados com açaí.

Variáveis	Grupos experimentais			
	C	CA	H	HÁ
<i>Fígado</i>				
Lipídios (%)	10,48 ± 0,56 <sup>c</sup>	9,3 ± 0,50 <sup>c</sup>	34,63 ± 1,31 <sup>a</sup>	29,82 ± 1,72 <sup>b</sup>
Colesterol total (mg/g)	2,09 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,87 ± 0,13 <sup>b</sup>	56,63 ± 3,20 <sup>a</sup>	51,69 ± 3,74 <sup>a</sup>
Triacilgliceróis (mg/g)	16,23 ± 2,49 <sup>c</sup>	13,67 ± 2,16 <sup>c</sup>	99,95 ± 8,03 <sup>a</sup>	75,51 ± 7,67 <sup>b</sup>
<i>Fezes</i>				
Lipídios (mg/g)	2,82 ± 0,16 <sup>c</sup>	2,90 ± 0,12 <sup>c</sup>	14,14 ± 0,35 <sup>a</sup>	13,23 ± 0,28 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/g)	4,96 ± 0,49 <sup>b</sup>	5,03 ± 0,34 <sup>b</sup>	91,83 ± 4,70 <sup>a</sup>	87,53 ± 4,69 <sup>a</sup>
Triacilgliceróis (mg/g)	3,23 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,68 ± 0,17 <sup>b</sup>	11,40 ± 0,53 <sup>a</sup>	10,22 ± 0,27 <sup>a</sup>

Os dados estão apresentados como a média ± EPM. \* Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. C, grupo controle; CA, grupo controle + açaí; H, grupo hiperlipídico e HA, grupo hiperlipídico + açaí. (n = 8). Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas.

## 5.6. Indicadores séricos da função hepática

Para avaliar a função hepática, foram determinadas as atividades séricas da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST). Os resultados estão apresentados na **figura 13**. Os animais do grupo H exibiram um aumento de 3,4 vezes na atividade de ALT e 1,4 vezes na atividade de AST quando comparados com o grupo controle, evidenciando um aumento de dano hepático. O tratamento com a polpa de açaí reduziu em 0,3 vezes a atividade da ALT no grupo HA quando comparado ao grupo H. Já com relação a AST, o grupo HA apresentou atividade intermediária dessa enzima entre os grupos C e H.

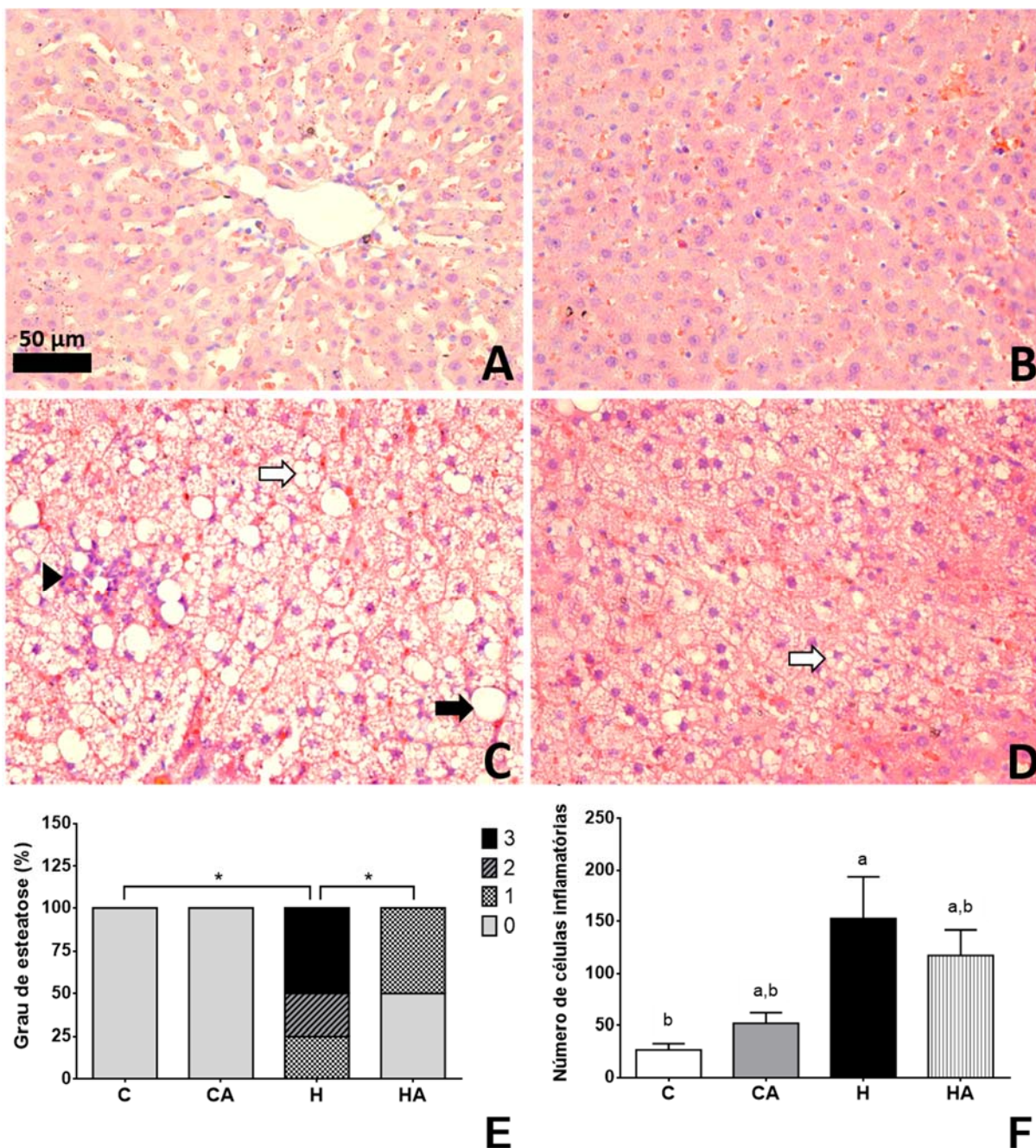


**Figura 13.** Atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) (**A**) e aspartato aminotransferase (AST) (**B**) de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açai. C, grupo controle; CA, grupo controle + açai; H, grupo hiperlipídico e HA, grupo hiperlipídico + açai. (n = 8). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

### 5.7. Histologia hepática

Como foram encontradas alterações na massa e no perfil lipídico do fígado e, devido a uma possível alteração a nível hepático, foram avaliadas as características histológicas em secções de fígado. Como observado na **figura 14**, os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram evidências histológicas de esteatose hepática (macro e microvesicular), sendo que o grupo H atingiu os maiores *scores* (graus 2 e 3) de esteatose macrovesicular (painéis C e E, respectivamente). Além do acúmulo de lipídios no fígado, observou-se a presença de infiltrado inflamatório no grupo H, sendo confirmada pelo aumento significativo no número de células inflamatórias nesse grupo quando comparado ao grupo controle (painéis C e F, respectivamente).

O tratamento com a polpa de açai foi capaz de atenuar a esteatose hepática, evidenciado pela ocorrência de esteatose moderada (graus 0 e 1) no grupo HA (painel E). Observou-se também uma tendência do tratamento com açai em reduzir o número de células inflamatórias no fígado no grupo HA quando comparado ao grupo H, apesar de não haver uma diferença significativa.



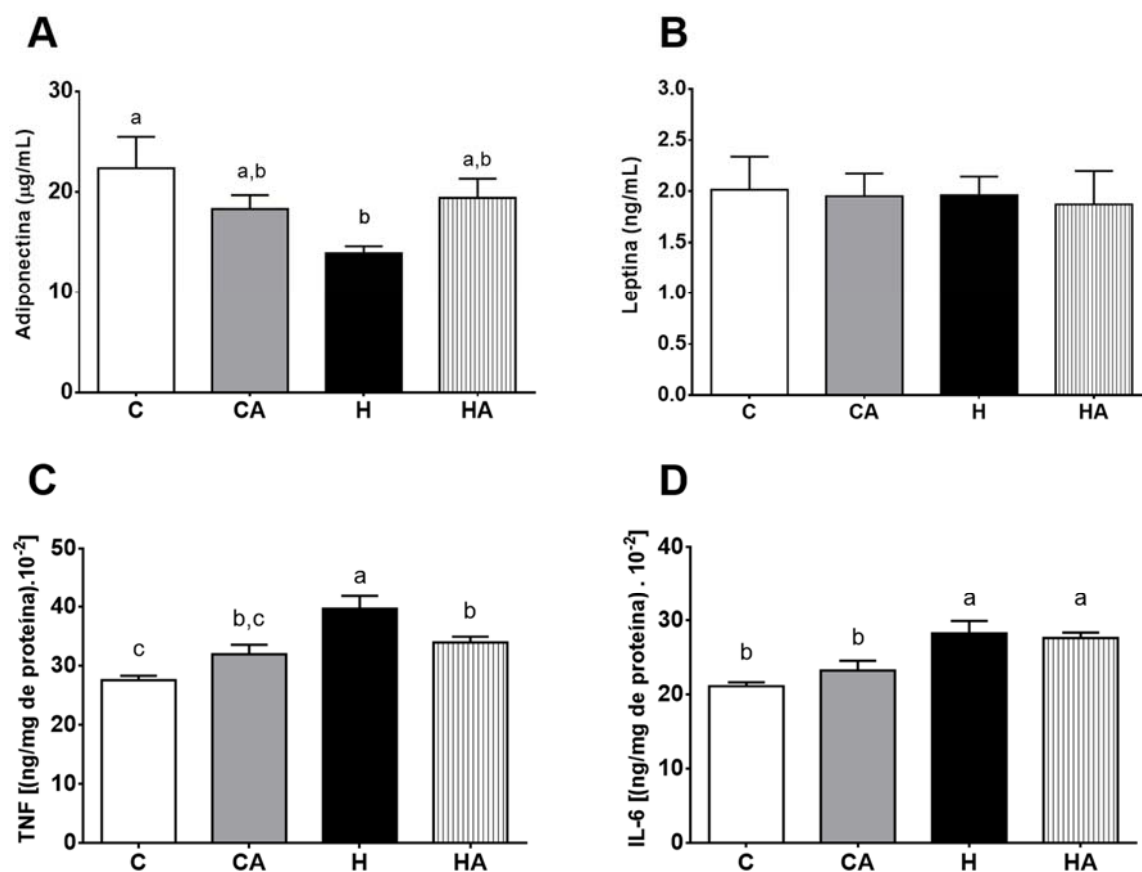
**Figura 14.** Fotomicrografias representativas de secções do fígado de ratos que receberam dieta padrão (A), dieta padrão e tratamento com açai (B), dieta hiperlipídica (C) e dieta hiperlipídica e tratamento com açai (D) coradas com H&E em aumento de 400 ×. A seta preta indica hepatócitos com esteatose macrovesicular, as setas brancas indicam hepatócitos com esteatose microvesicular e a ponta de seta preta indica presença de infiltrado inflamatório. Barra de escala = 50 μm. Graduação histológica da esteatose hepática (E). (n=8); \* p ≤ 0,05. Número de células inflamatórias no tecido do fígado, representadas como média ± EPM (F). (n=8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

## 5.8. Produção de adipocinas e citocinas inflamatórias

Considerando que as adipocinas e as citocinas inflamatórias têm um papel importante na patogênese da NAFLD, foi avaliado o efeito do açaí sobre as concentrações séricas de adiponectina e leptina e sobre as concentrações hepáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em nosso modelo de estudo. Conforme pode ser observado na **figura 15**, o grupo H apresentou uma redução significativa na concentração sérica de adiponectina quando comparado ao grupo controle. Observou-se uma tendência do tratamento com a polpa de açaí em aumentar os níveis séricos dessa adipocina no grupo HA em relação ao grupo H, apesar de não ser significativa (painel A). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais para os níveis séricos de leptina (painel B).

Em relação à concentração hepática de citocinas, foi observado um aumento significativo nas concentrações de TNF e IL-6 nos grupos H e HA quando comparados ao grupo controle (painéis C e D). O tratamento com açaí associado à dieta hiperlipídica não alterou a concentração hepática de IL-6, mas foi eficaz em reduzir significativamente a concentração hepática de TNF no grupo HA quando comparado ao grupo H (painel C).





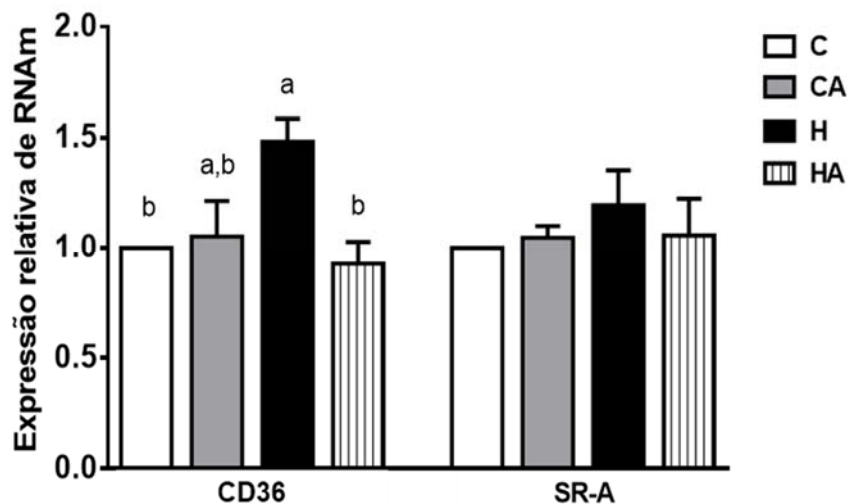
**Figura 15.** Concentração sérica de adiponectina (A) e leptina (B) e concentração hepática do Fator de necrose tumoral (TNF) (C) e Interleucina-6 (IL-6) (D) de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açai. C, grupo controle; CA, grupo controle + açai; H, grupo hiperlipídico e HA, grupo hiperlipídico + açai. (n = 8). Os dados estão expressos como média ± EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

### 5.9. Expressão gênica dos receptores *scavengers*

As células de Kupffer têm sido consideradas como mediadoras de respostas inflamatórias no mecanismo de patogênese da NAFLD. Estas células expressam o receptor *scavenger* classe A (SR-A) e o receptor *scavenger* classe B (CD36), os quais possuem a habilidade de se ligar e interiorizar lipoproteínas modificadas, sugerindo um importante papel na formação de células espumosas no fígado (BIEGHS *et al.*, 2013). Como foi observado um aumento de células inflamatórias e da concentração de TNF no fígado, investigamos a expressão hepática desses receptores. Conforme apresentado na **figura 16**, o grupo H teve um aumento de aproximadamente 1,5 vezes na expressão de RNAm de CD36 em relação ao grupo



C. O tratamento com a polpa de açaí foi eficaz em reverter esta alteração. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de SR-A entre os grupos experimentais.



**Figura 16.** Expressão de RNAm de genes que codificam para CD36 e SR-A no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência rRNA 18S e o grupo controle foi utilizado como base para os resultados de expressão comparativa. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. (n = 6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. CD36, receptor *scavenger* classe B; SR-A, receptor *scavenger* classe A.

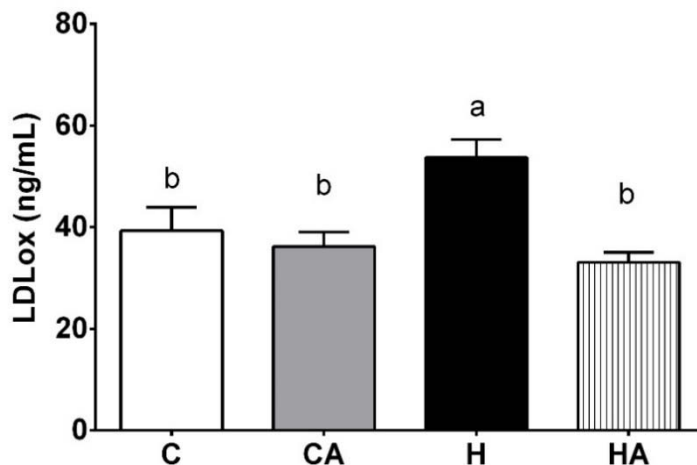
## 5.10. Efeito da polpa de açaí sobre o estresse oxidativo

### 5.10.1. Biomarcadores do estresse oxidativo

Para investigar se as alterações hepáticas após 8 semanas de experimento estariam associadas com o aumento do estresse oxidativo e, considerando que a polpa de açaí exibiu uma capacidade antioxidante *in vitro*, foi avaliado se o açaí poderia ter efeito sobre o balanço oxidante/antioxidante. Possíveis alterações no balanço redox foram determinadas por meio de biomarcadores do estresse oxidativo.

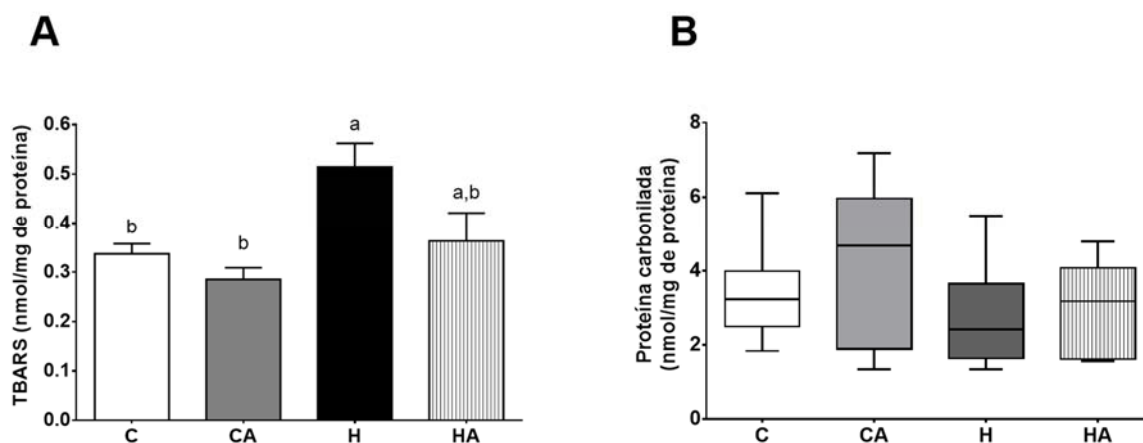
A **figura 17** apresenta os dados do marcador da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDLox) no soro. A análise dos dados mostra que o grupo H apresentou um aumento significativo na concentração de LDLox em relação ao controle. O tratamento com a polpa de açaí promoveu uma redução de 39% na concentração de LDLox no grupo HA em relação ao

grupo H, sugerindo que o tratamento com açaí ameniza os danos oxidativos nas LDL causados pela ingestão de dieta hiperlipídica.



**Figura 17.** Concentração sérica de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

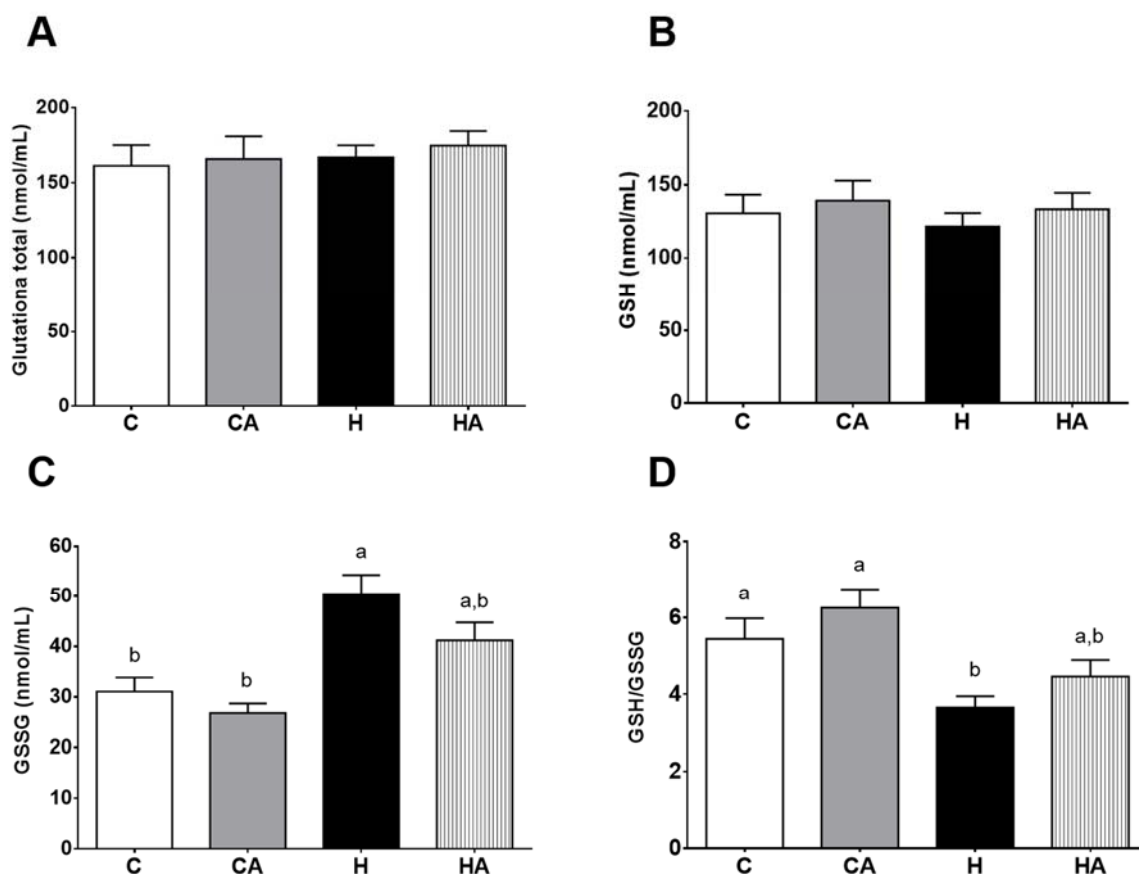
A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o conteúdo de proteínas carboniladas são amplamente usados como indicadores da peroxidação de lipídios e da oxidação em proteínas, respectivamente. Como pode ser observado na **figura 18**, o grupo H apresentou um aumento significativo na concentração de TBARS quando comparado ao grupo controle. Observou-se uma tendência do tratamento em reduzir os níveis hepáticos de TBARS no grupo HA em relação ao grupo H, apesar de não ser significativa. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração hepática de proteínas carboniladas entre os grupos experimentais.



**Figura 18.** Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) e de proteína carbonilada (B) em homogenato do fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Os dados referentes a TBARS estão expressos como a média  $\pm$  EPM e os dados referentes à concentração de proteína carbonilada estão expressos como a mediana e intervalo interquartil. (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

### 5.10.2. Concentração de glutathiona total, glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e a razão GSH/GSSG

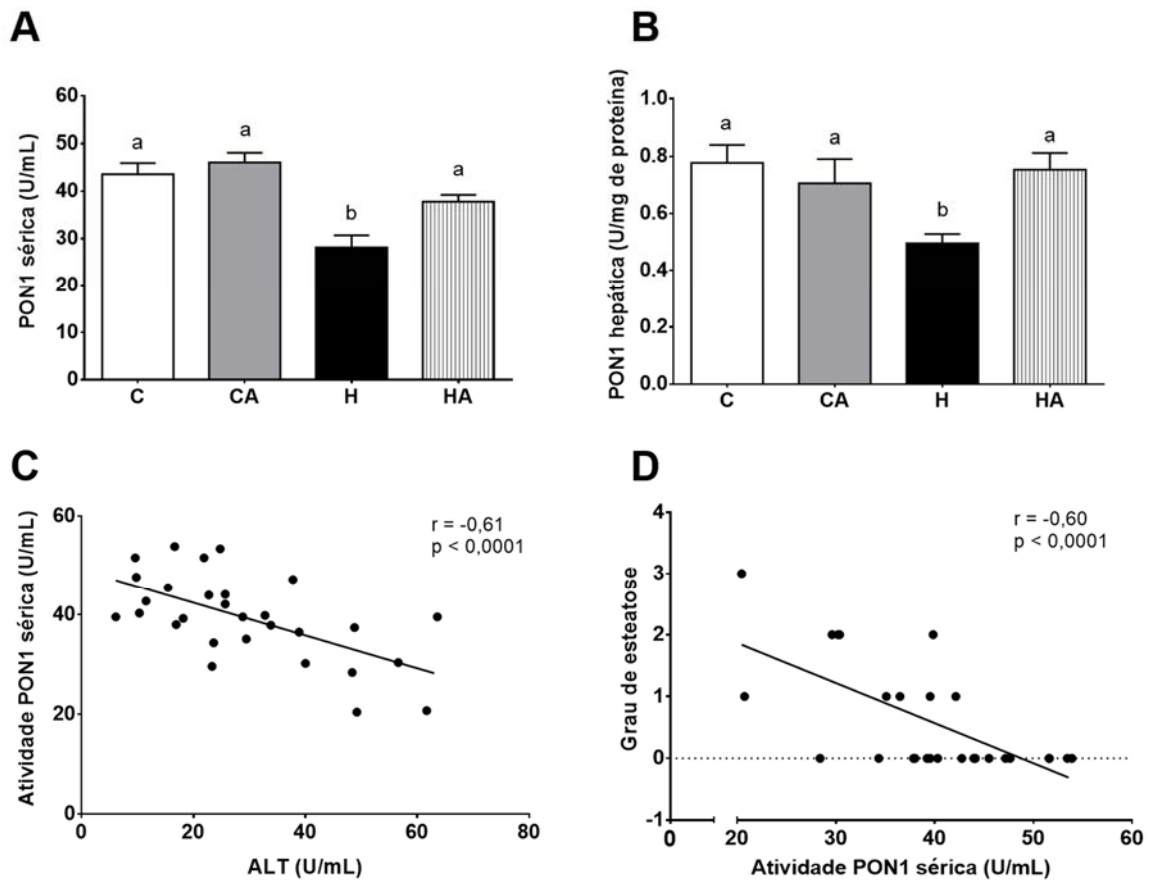
A Glutathiona ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante. No presente estudo foi avaliado o metabolismo da glutathiona no fígado por meio da determinação das concentrações de glutathiona total, glutathiona oxidada (GSSG) e a razão (GSH/GSSG). Os resultados da **figura 19** mostram que não houve alteração nos níveis de glutathiona total e GSH entre os grupos experimentais. Por outro lado, ocorreu um aumento significativo nos níveis de GSSG e uma redução de 30% na razão GSH/GSSG no grupo H em relação ao grupo controle. Quando comparado ao grupo H, observou-se uma tendência do tratamento com açaí em reduzir a concentração de GSSG, que resultou numa melhora na razão GSH/GSSG no grupo HA.



**Figura 19.** Conteúdo hepático de glutathiona total (A), glutathiona reduzida (B), glutathiona oxidada (C), e a razão GSH/GSSG (D) no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

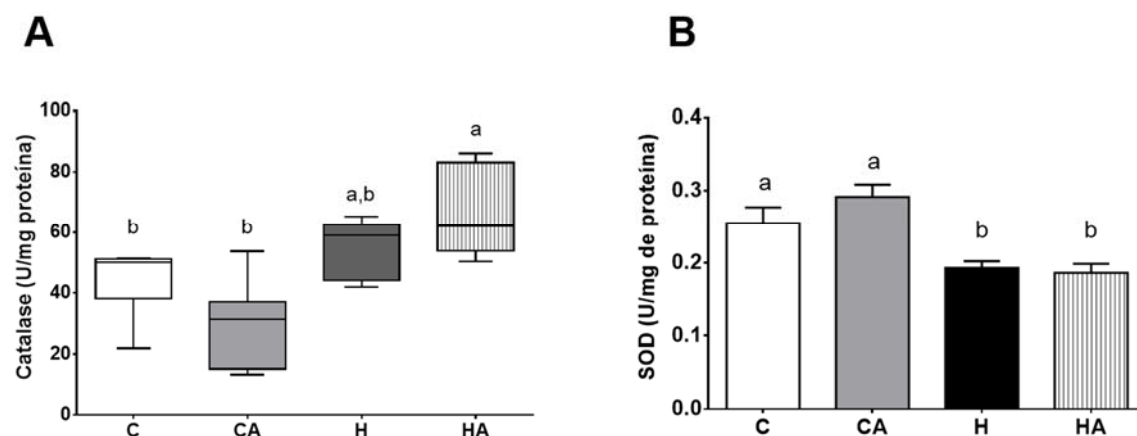
### 5.10.3. Enzimas antioxidantes

A atividade sérica e hepática da enzima paraoxonase-1 (PON1), e a atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram determinadas. Conforme apresentado na **figura 20**, a atividade arilesterásica da PON1, tanto no soro quanto no fígado, teve uma redução acentuada no grupo H quando comparado ao grupo controle. O tratamento com a polpa de açaí associada a dieta hiperlipídica restaurou a atividade da PON1 sérica e hepática (painéis A e B, respectivamente). A análise da correlação de Pearson mostrou uma correlação negativa significativa entre a atividade arilesterásica sérica da PON1 e os níveis séricos de ALT ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,0001$ ) (painel C). Além disso, uma correlação negativa significativa entre a atividade sérica de PON1 e o grau de esteatose foi encontrada ( $r = -0,60$ ,  $p < 0,0001$ ) (painel D).



**Figura 20.** Atividade arilesterásica da enzima PON1 no soro (A) e no fígado (B) de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Coeficiente de correlação de Pearson entre a atividade de PON1 sérica e os níveis séricos da alanina aminotransferase (C) e Coeficiente de correlação de Spermán entre a atividade atividade de PON1 sérica e o grau de esteatose (D). Os dados referentes à atividade da PON1 estão expressos como média  $\pm$  EPM. (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Quando avaliada a atividade das enzimas CAT e SOD (**figura 21**), foi observado que o tratamento com a polpa de açaí promoveu um aumento significativo na atividade da catalase no grupo HA quando comparado ao grupo controle. Os grupos que receberam dieta hiperlipídica tiveram uma redução significativa na atividade da SOD, no entanto, o tratamento com açaí não restaurou a atividade desta enzima.



**Figura 21.** Atividade da catalase (A) e atividade da superóxido dismutase (Cu/Zn SOD) (B) no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Os dados referentes à atividade da catalase estão expressos como a mediana e intervalo interquartil e os dados referentes superóxido dismutase estão expressos como média  $\pm$  EPM. (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

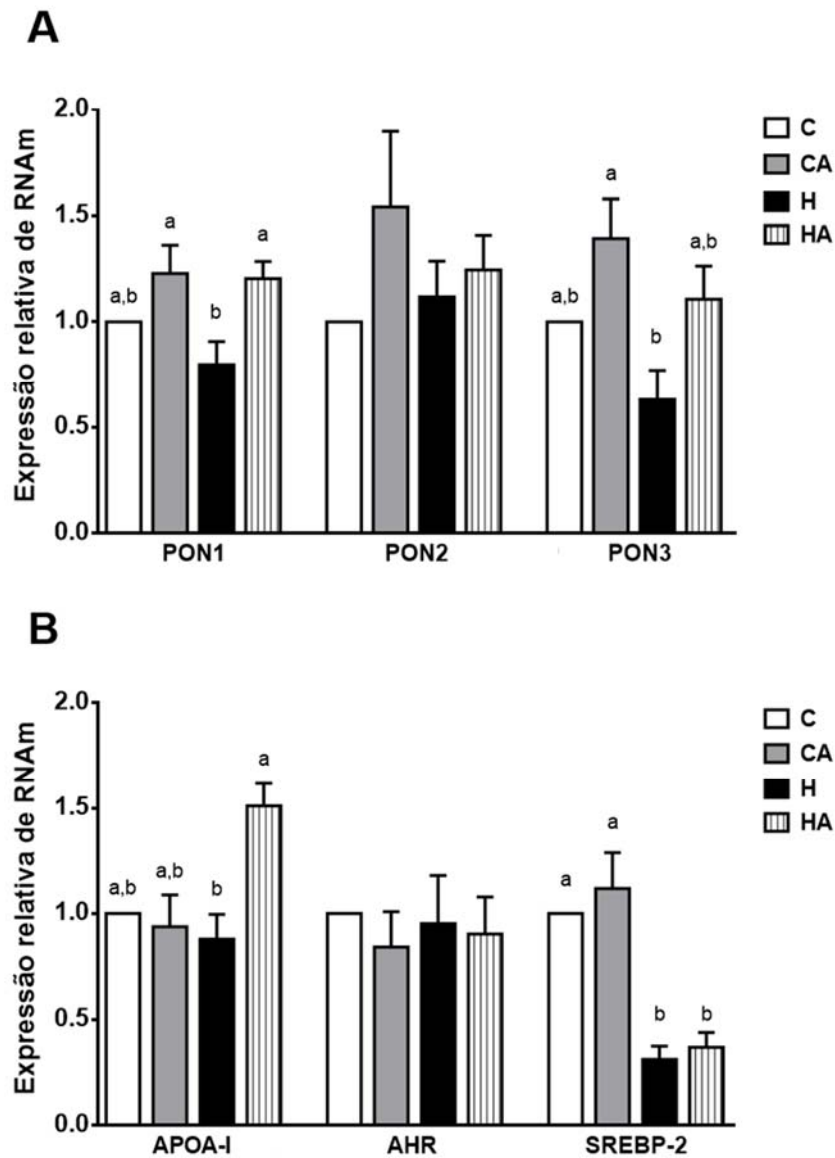
### 5.11. Expressão gênica das isoformas da paraoxonase e de genes envolvidos com a regulação da expressão de PON1

Como o tratamento com a polpa de açaí teve efeito sobre a atividade sérica e hepática de PON1, foi investigado se o tratamento poderia atuar sobre os níveis de expressão dos genes correspondentes às isoformas de PON (PON1, PON2 e PON3) no fígado. Conforme pode ser observado na **figura 22** (painel A), o tratamento com a polpa de açaí promoveu um aumento de aproximadamente 1,5 vezes na expressão do RNAm de PON1 no grupo HA quando comparado ao grupo H. Não foram observadas diferenças na expressão de PON2 entre os grupos experimentais. Observou-se também uma tendência do tratamento com açaí em aumentar os níveis de expressão do RNAm de PON3 grupo HA em relação ao grupo H, apesar de não ser significativa.

Alguns estudos mostraram que a atividade da PON1 está positivamente relacionada com algumas proteínas. Entre essas proteínas, foi observado que a ausência do gene que codifica para a apolipoproteína A-I (ApoA-I) causa uma redução na atividade de PON1 (MOORE *et al.*, 2005) e pode contribuir com a deposição de lipídios hepáticos induzido por dieta e o desenvolvimento da NAFLD em camundongos (KARAVIA *et al.*, 2012). Além disso, evidências sugerem que os polifenóis podem induzir a transcrição de PON1 mediado por proteínas que se ligam a sequências específicas na região promotora desse gene, tais como o receptor aril hidrocarboneto (AhR) (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004) e o SREBP-2

(GARIGE *et al.*, 2010). Por isso, foi investigada a expressão hepática de APOA-I, AHR e SREPB-2.

Conforme resultados apresentados na **figura 22** (painel B), o tratamento com açaí associado a dieta hiperlipídica promoveu um aumento de aproximadamente 1,7 vezes nos níveis de expressão de ApoA-I, correspondendo ao mesmo efeito do tratamento sobre os níveis de expressão gênica de PON1. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de AHR entre os grupos experimentais. A dieta hiperlipídica reduziu a expressão de SREBP-2 aproximadamente três vezes quando comparado a dieta controle, no entanto, o tratamento com a polpa de açaí não restaurou os níveis de expressão desse gene.

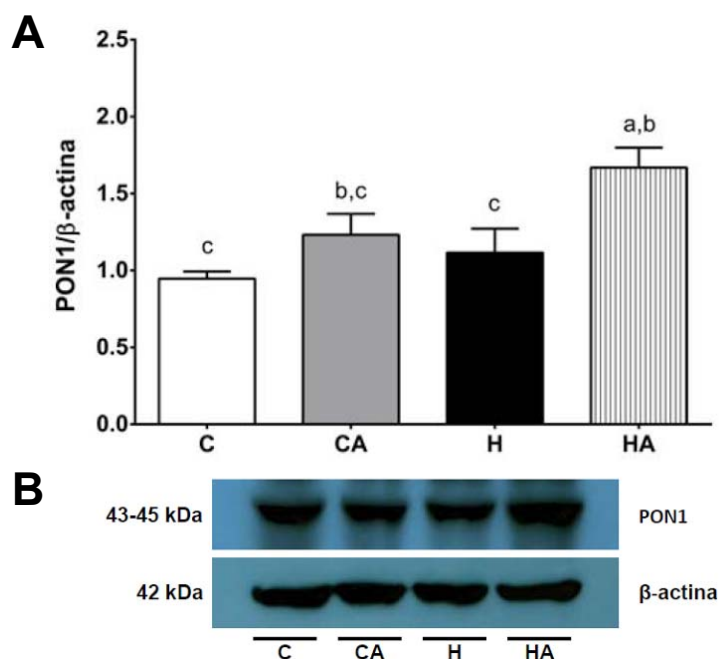


**Figura 22.** Expressão de RNAm de genes que codificam para as isoformas da paraoxonase (PON1, PON2 e PON3) (A) e para proteínas envolvidas com a regulação da sua expressão (B) no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açai. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência rRNA 18S e o grupo controle foi utilizado como base para os resultados de expressão comparativa. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. (n = 6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. PON1, Paraoxonase-1; PON2, Paraoxonase-2; PON3, Paraoxonase-3; APOA-1, Apolipoproteína A-1; AHR, Receptor aril hidrocarboneto e SREBP-2, proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-2



## 5.12. Análise da expressão proteica de PON1

Nós investigamos se o aumento nos níveis de RNAm de PON1 promovidas pelo tratamento com polpa de açaí correlacionavam com os níveis de proteína. A intensidade proteica de PON1 no tecido hepático está apresentada na **figura 23**. Do mesmo modo que a expressão gênica, foi verificado um aumento de quase 1,5 vezes na expressão proteica hepática da PON1 no grupo HA quando comparado ao grupo H.



**Figura 23.** Avaliação semiquantitativa da expressão proteica da paraoxonase-1 (PON1) no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí. Densitometria das bandas de PON1 no tecido hepático (**A**). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas; Imagem digitalizada representativa de Western Blotting para a detecção de PON1 e  $\beta$ -actina no fígado de ratos que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica tratados com açaí (**B**).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta benefícios do tratamento com a polpa de açaí na gênese e progressão da NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em ratos. O tratamento com açaí, uma fonte de polifenóis, promoveu uma melhora no *status* antioxidante, pois protegeu a LDL contra oxidação, aumentou a atividade sérica e hepática de PON1 e modulou os níveis de expressão de PON1 e ApoA-I. Em adição, reduziu os níveis de TNF e a expressão de CD36 no fígado. Paralelamente a esses efeitos, o tratamento com açaí atenuou a esteatose hepática.

Estudos nos últimos anos mostraram que o açaí apresenta uma ampla gama de benefícios terapêuticos e na promoção da saúde devido ao seu valor nutricional e à sua composição fitoquímica. O açaí contém vários metabólitos secundários bioativos, principalmente os polifenóis, os quais têm sido identificados como antioxidantes potenciais (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a; ODENDAAL *et al.*, 2014). As antocianinas são os principais compostos fenólicos presentes com predominância da cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutenosídeo (SCHAUSS, A. G. *et al.*, 2006a; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). Neste estudo, o teor de fenólicos totais da polpa filtrada de açaí foi de 458,60 mg EAG/100g. Este resultado é semelhante ao relatado por Ribeiro *et al.* (2010) que observaram teor de 424,9 mg/100g de fenólicos totais na polpa de açaí.

A média de antocianinas monoméricas totais encontrada na polpa filtrada de açaí foi de 13,59 mg/100g. Este resultado é inferior ao relatado por Kuskoski *et al.* (2006), que encontraram uma concentração de antocianinas totais na polpa comercial de açaí de 22,8 mg/100g, mas foi superior ao relatado por Guerra *et al.* (2015) que encontraram uma concentração destes compostos no extrato aquoso de açaí de 6,45 mg/100g. É possível verificar uma grande variação no conteúdo de antocianinas encontradas em polpas de açaí, conforme demonstrado por Lichtenthaler *et al.* (2005), onde a concentração destes compostos variou de 1,3 a 46,3 mg/100g em 10 polpas comerciais e não comerciais avaliadas.

Alguns fatores podem contribuir para a variação quantitativa destes compostos nas frutas, uma vez que as antocianinas são considerados flavonoides relativamente instáveis e os seus teores podem ser influenciados por questões ambientais, como temperatura e clima, questões agrônômicas, processamento e condições de armazenamento. Variações no teor de antocianinas do açaí também se devem ao estágio de maturidade dos frutos (não maduro, intermediário e maduro). Além disso, podem ocorrer diferenças em relação ao método de extração e de quantificação utilizado (ODENDAAL *et al.*, 2014).

Como esperado, os nossos resultados mostraram que a polpa filtrada de açaí exibiu uma considerável capacidade antioxidante “*in vitro*”, semelhante ao antioxidante padrão Trolox, conforme reportado anteriormente em outros estudos (KUSKOSKI *et al.*, 2006; GUERRA *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2015).

O consumo de frutas ricas em compostos bioativos, especialmente os polifenóis, tem sido relacionado à manutenção do bem-estar e à prevenção de várias doenças crônicas (GIAMPIERI *et al.*, 2017). A NAFLD é reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica e, frequentemente, coexiste com a obesidade, dislipidemia e resistência à insulina (LOOMBA; SANYAL, 2013). Embora em indivíduos com obesidade o risco de desenvolvimento da NAFLD seja aumentado (LEUNG *et al.*, 2015), a presença da doença também é observada em indivíduos eutróficos (LOOMBA; SANYAL, 2013). A incidência da NAFLD aumentou significativamente no mundo devido às mudanças no estilo de vida, industrialização da sociedade e consumo de dietas ricas em lipídios, sendo recentemente considerada um dos principais fatores relacionados a doenças hepáticas crônicas (GERHARD; DISTEFANO, 2015). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a dieta hiperlipídica causou alterações no perfil lipídico sérico e hepático, aumento de dano hepático, esteatose hepática, alteração na produção de adiponectina e inflamação hepática.

Na presença de NAFLD o fígado apresenta acúmulo de diversos tipos de lipídios que causam esteatose (MICHELOTTI; MACHADO; DIEHL, 2013). Dentre estes, os níveis elevados de colesterol merecem destaque uma vez que parecem estar relacionados com a resposta inflamatória no fígado (WALENBERGH *et al.*, 2013). Estudos, em humanos e modelos animais, mostraram que o consumo de açaí promoveu uma melhora significativa nos níveis séricos de colesterol (DE OLIVEIRA, P. R. B. *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2010; UDANI *et al.*, 2011). A atividade hipocolesterolêmica do açaí tem sido atribuída à modulação da expressão gênica envolvida na homeostase do colesterol no fígado e via aumento da excreção fecal do colesterol (DE SOUZA *et al.*, 2012).

No presente estudo, verificamos que os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram alterações no perfil lipídico sérico, hepático e fecal. Entretanto, o tratamento com a polpa de açaí não alterou a concentração sérica de colesterol, apesar de observamos uma tendência do tratamento em reduzir as concentrações de colesterol total e colesterol não HDL. Já com relação ao perfil lipídico hepático, o tratamento com açaí promoveu uma redução significativa nos lipídios totais e na concentração de triacilgliceróis. A quantidade de lipídios excretados nas fezes também não foi alterada após o tratamento com a polpa filtrada de açaí.

Entre os constituintes da polpa de açaí estão altas quantidades de fibras (SCHAUSS, A G *et al.*, 2006b), as quais podem exercer efeitos biológicos. É amplamente aceito que as fibras solúveis agem diretamente no lúmen intestinal, promovendo respostas secundárias no fígado e na circulação periférica (FERNANDEZ, M. L., 1995) e também podem promover uma redução na absorção intestinal do colesterol dietético e conseqüente menor liberação deste esteroide via quilomícrom (FERNANDEZ, M.-L., 2001). Além desses efeitos, muitos dos benefícios para a saúde atribuídos às fibras são uma conseqüência de sua fermentação pela microbiota colônica intestinal e dos metabólitos secundários que são produzidos. Existem crescentes evidências de que estes metabólitos podem desempenhar um papel fundamental na prevenção de doenças (WONG *et al.*, 2006).

Muito provavelmente, o efeito hipolipidêmico sérico do açaí não encontrado em nossos resultados pode estar relacionado à quantidade de fibras presentes em nossa polpa de açaí comparada à de outros estudos que encontraram alterações séricas do colesterol após o tratamento com açaí. A quantidade de fibras foi menor em nossa polpa de açaí (2,2 g/100g) quando comparada à quantidade de fibras presentes na polpa de açaí utilizada por De Souza *et al.* (2012), que encontraram um teor de fibras de 43g/100g. Essa diferença se explica pela filtração utilizada em nosso trabalho, ao contrário de De Souza *et al.* (2012) que embora tenham usado a polpa de açaí médio, a mesma foi adicionada à dieta sem filtração.

A NAFLD se inicia com o acúmulo de lipídios no fígado, seguido de mudanças iniciais que induzem a sensibilidade do fígado ao estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias. O estresse oxidativo é um fator etiológico em muitas doenças hepáticas agudas e crônicas e desempenha um papel crítico na progressão da NAFLD para NASH (LIU, Y. *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica tiveram alteração da função hepática e desenvolveram esteatose, evidenciados pelo aumento nos níveis séricos de ALT e AST, acúmulo de triacilgliceróis e presença de macro e microvesículas de lipídios no fígado. Além disso, em relação ao balanço redox, os nossos resultados indicam um aumento no estresse oxidativo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, evidenciado pelo aumento na concentração sérica de LDLox e na concentração de TBARS no fígado, importantes marcadores da peroxidação lipídica.

Diversos estudos demonstraram que os produtos da peroxidação de lipídios são encontrados em maiores concentrações no fígado de pacientes com NAFLD do que em pacientes normais (MADAN *et al.*, 2006). Os produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, levam ao aumento da produção de citocinas e recrutamento de células inflamatórias para o

fígado (BROWNING; HORTON, 2004). Ao lado dos produtos de peroxidação lipídica, a LDLox apresenta um papel na fisiopatogênese da NAFLD como sugerido por Bieghs et al. (2013). A oxidação da LDL é um mecanismo bem conhecido no desenvolvimento da aterosclerose (KATO *et al.*, 2009) e a NAFLD possui muitas características em comum com as doenças cardiovasculares, incluindo acúmulo de lipídios, ativação e infiltração de macrófagos e inflamação. Na NAFLD, uma teoria proposta é que ocorra um mecanismo defeituoso intrínseco do tráfego de lipídios nas células de Kupffer, mediado pelos receptores CD36 e SR-A, levando à liberação de vários mediadores inflamatórios e moléculas de sinalização como citocinas e proteases que contribuem para a inflamação hepática (WALENBERGH *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram um aumento significativo no número de células inflamatórias, bem como um aumento significativo na concentração de TNF e IL-6 e na expressão de CD36 no fígado de ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. Estes resultados sugerem que o aumento da resposta inflamatória hepática pode estar associada com o aumento da captação hepática de LDLox, mediada pelo receptor CD36.

Neste estudo, nós demonstramos que o tratamento com açaí diminuiu a concentração sérica de LDLox, os níveis de TNF e a expressão do RNAm de CD36 no fígado de ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. Esses resultados sugerem que o açaí atua protegendo a LDL contra oxidação, o que provavelmente, contribuiu para reduzir a inflamação hepática.

Além disso, as adipocinas também parecem estar envolvidas com a progressão da NAFLD. A leptina, que participa da regulação da ingestão e gasto energético, do sistema imunológico e desenvolvimento da inflamação e fibrogênese, está aumentada em pacientes obesos e naqueles com NAFLD, parecendo plausível seu papel na patogênese da doença (HUANG *et al.*, 2008). Em contraste à leptina, a adiponectina apresenta uma correlação inversa com os níveis de TNF e está reduzida em pacientes com NAFLD (MAEDA *et al.*, 2002). Neste estudo, não encontramos alterações nos níveis de leptina, mas a dieta hiperlipídica causou uma redução significativa na concentração sérica de adiponectina. Apesar do tratamento com açaí não ter alterado a concentração de adiponectina de forma significativa, observamos uma tendência do tratamento em aumentar os níveis séricos desta adipocina. Estudos recentes têm demonstrado um efeito do açaí na regulação da produção de leptina e adiponectina. Guerra et al. (2015) demonstraram que o tratamento com extrato aquoso de açaí aumentou a expressão no tecido adiposo e a concentração sérica de adiponectina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Em outro estudo, foi demonstrado que o tratamento com extrato de açaí promoveu aumento da expressão proteica de leptina e redução na expressão proteica de

adiponectina em células de pré-adipócitos (3T3-L1) de camundongos após 7 dias de diferenciação (MARTINO *et al.*, 2016). Em conjunto, esses dados sugerem que os efeitos do açaí pode, em parte, se dar por ação de seus componentes no tecido adiposo.

Entre os diversos atores envolvidos na manutenção do estado oxidante/antioxidante adequado, a literatura mostra uma importante correlação entre os níveis de glutathione e os mecanismos enzimáticos de defesa. A principal via de detoxificação para produtos de peroxidação lipídica envolve a conjugação com a glutathione (GSH), um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), considerada um dos agentes mais importantes na defesa antioxidante celular, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas glutathione peroxidases (GPx), em que desempenha papel na eliminação de ERO, com sua oxidação a glutathione dissulfeto (GSSG). A regeneração da GSH é feita pela enzima glutathione redutase (GR), uma etapa essencial para a manutenção da integridade do sistema de proteção celular, uma vez que impede a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (JÚNIOR *et al.*, 2001). Neste estudo, verificamos um aumento do estado pró-oxidante, evidenciado pelo aumento da concentração de GSSG, que resultou em um desequilíbrio na relação GSH/GSSG em ratos alimentados com a dieta hiperlipídica.

A depleção de enzimas do sistema de defesa antioxidante é uma consequência do aumento crônico de ERO na NAFLD e contribui para o estresse oxidativo (VIDELA *et al.*, 2004a). No presente trabalho nós investigamos possíveis alterações na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Paraoxonase-1 (PON1). Nossos resultados mostram que a dieta hiperlipídica causou alterações significativas na atividade da SOD no fígado e da PON1 no soro e no fígado de ratos.

O tratamento com a polpa de açaí promoveu uma melhora no estado redox sérico e hepático. Apesar de não ser significativa, observamos uma tendência à redução na peroxidação de lipídios e na concentração de glutathione oxidada (GSSG) e uma melhora da relação GSH/GSSG no fígado de ratos que foram tratados com açaí associado com dieta hiperlipídica. O tratamento não reverteu a alteração da SOD, mas observamos uma tendência do tratamento em aumentar a atividade da CAT em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. O principal efeito do açaí neste estudo com relação à melhora do sistema de defesa antioxidante foi a reversão na alteração sérica e hepática da PON1. Corroborando com os nossos resultados, diversos estudos demonstraram um papel antioxidante do açaí na modulação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes (DE SOUZA *et al.*, 2010; GUERRA *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2011).

De Souza et al. (2010) demonstraram o efeito do açaí em aumentar a atividade sérica de PON1 em modelo de hipercolesterolemia em ratos, no entanto, não foram avaliadas a expressão das isoformas de PON. Assim como esse estudo, o tratamento com açaí associado à dieta hiperlipídica promoveu aumento da atividade sérica de PON1, mas também verificamos aumento da atividade hepática de PON1, bem como aumento da expressão do RNAm do gene que codifica para esta enzima. Esses efeitos do tratamento com açaí foram confirmados com o aumento da expressão proteica de PON1 nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. Entretanto, não observamos um efeito significativo do tratamento sobre a expressão gênica das isoformas PON2 e PON3. Concomitante a esses efeitos, observamos que o tratamento com açaí protegeu o fígado contra os danos induzidos pela dieta hiperlipídica, evidenciado pela redução na atividade sérica de ALT, redução no conteúdo de triacilgliceróis e no grau de esteatose no fígado.

Vários estudos têm associado a diminuição da atividade de PON1 com aumento de injúrias hepáticas, incluindo a NAFLD (KILIC *et al.*, 2005; USTUNDAG *et al.*, 2007; SAMY; HASSANIAN, 2011). Nossos dados são consistentes com estas observações pois a atividade sérica de PON1 apresentou uma correlação inversa com a atividade de ALT e com o grau de esteatose hepática. Também corroboram com Guerra et al. (2015), que reportaram um efeito protetor do açaí sobre a NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em camundongos e, portanto, contribuem para reforçar a hipótese de que o açaí atenua os danos hepáticos associados ao aumento do estresse oxidativo, induzidos por dieta hiperlipídica.

Alguns fatores são conhecidos por influenciar a atividade e/ou concentração de PON1. Um dos mecanismos propostos é a interação de PON1 com lipídios oxidados ou outros oxidantes (AVIRAM, MICHAEL *et al.*, 1998; JAOUAD; MILOCHEVITCH; KHALIL, 2003), mas outros mecanismos, mediado pelos polifenóis, podem regular a atividade de PON1. Entre estes, estudos têm reportado uma indução da atividade e expressão do RNAm nos hepatócitos, mediado pelos polifenóis, via ativação do receptor aril hidrocarboneto (AhR), o qual se liga a elementos de resposta a xenobióticos na região promotora de PON, ativando sua transcrição (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004; XUE *et al.*, 2017). Além disso, a região promotora de PON1 contém um sítio de ligação para a proteína ligadora aos elementos de resposta a esterol-2 (SREBP-2), que também mostrou ser um alvo para a regulação positiva de PON1 (DEAKIN, S. *et al.*, 2003). No presente estudo, avaliamos os níveis de expressão do receptor AhR e do fator de transcrição SREBP-2, a fim de verificar se o aumento da atividade e expressão de PON1 poderiam estar relacionados com a indução, mediado pelo açaí, na

expressão destes genes. Os nossos resultados mostraram que o tratamento com açaí não alterou os níveis de expressão do AHR e não restaurou os níveis de expressão do SREBP-2, os quais foram reduzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica. Entretanto, estes resultados não são conclusivos, uma vez que os componentes do açaí podem atuar induzindo a translocação dessas proteínas para o núcleo, onde se ligam ao DNA na região promotora de PON1 e ativam a sua transcrição. Portanto, maiores investigações relacionadas à expressão proteica nuclear desses fatores de transcrição e também de outros, como o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR $\gamma$ ), que demonstrou atuar sobre a transcrição de PON1 em hepatócitos estimulado por polifenóis (KHATEEB *et al.*, 2010), podem contribuir para elucidar os mecanismos pelos quais o açaí regula a expressão e atividade de PON1.

Sabe-se que os níveis séricos da enzima PON1 são fortemente associados à apolipoproteína A-I (ApoA-I) na HDL. A ApoA-I é sintetizada no fígado e, em menor grau no intestino (BOLANOS-GARCIA; MIGUEL, 2003) e o seu papel na inibição da aterosclerose tem sido reportado (RADER, 2002). Além disso, também foi demonstrado que camundongos C57BL/6 ApoA-I<sup>-/-</sup> desenvolveram NAFLD, sugerindo que a ApoA-I pode ser também um importante modulador de processos associados com a deposição de lipídios hepáticos e desenvolvimento da NAFLD induzida por dieta (KARAVIA *et al.*, 2012). No presente estudo, avaliamos os níveis de expressão gênica de ApoA-I no fígado. Nossos resultados mostraram que o tratamento com açaí associado à dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo nos níveis de expressão do RNAm de ApoA-I. Este resultado contribui para reforçar o papel antioxidante do açaí e sugere um papel antiaterogênico para esse fruto, conforme evidenciado em outros estudos (FEIO *et al.*, 2012; PALA *et al.*, 2017). Ao encontro de nossos resultados, Pala *et al.* (2017) mostraram que a ingestão de polpa de açaí (200 g por dia) por mulheres saudáveis, com idade entre 18-35 anos, durante 4 semanas, promoveu aumento da concentração sérica de ApoA-I, diminuição na concentrações séricas de ERO e LDLox e aumento na atividade sérica de PON1. Os autores também observaram um aumento da capacidade antioxidante total (TAC) sérica após a ingestão da polpa de açaí.

Embora compostos isolados tenham sido investigados como uma terapia nutricional para um grande número de doenças, nossos achados demonstram que a polpa de açaí possui importantes efeitos biológicos: melhora o *status* antioxidante, a inflamação hepática e atenua a NAFLD. Ressalta-se que além das antocianinas o açaí possui outros fitoquímicos, tais como pró-antocianinas, catequinas, epicatequinas, orientina, luteolina, lignanas, ou mesmo ácidos fenólicos como ácido ferúlico e resveratrol em baixas concentrações (SCHAUSS, A. G. *et al.*,



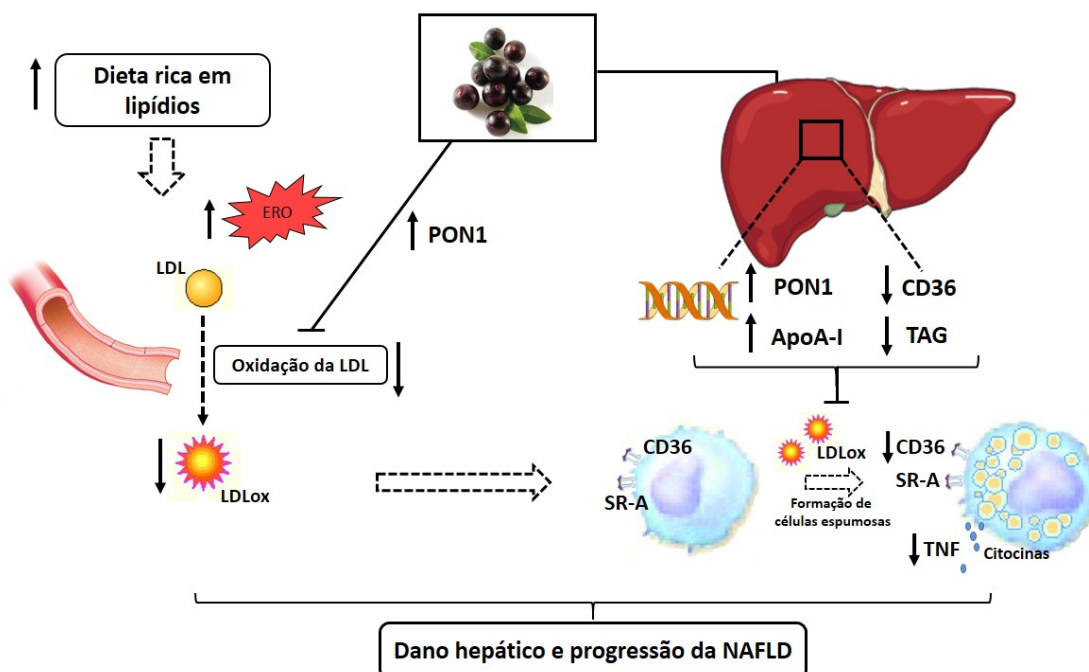
2006a; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). Assim, a polpa de açaí pode produzir efeitos mais pronunciados do que compostos isolados, uma vez que extratos brutos podem exercer efeitos aditivos ou sinérgicos devido à mistura complexa de fitoquímicos (CHANDRA *et al.*, 2012). No contexto do crescente interesse e demanda do açaí nos últimos anos, atribuída a evidências que seu uso está associado com diversos efeitos benéficos à saúde, este estudo contribui para o conhecimento atual sobre os efeitos biológicos do açaí na NAFLD.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o tratamento com açaí modula positivamente a atividade e expressão de PON1 e diminui a oxidação da LDL, melhorando a resposta ao estresse oxidativo e atenuando a NAFLD induzida por dieta hiperlipídica em ratos.

Os dados obtidos neste estudo nos permitiu sugerir que o aumento da atividade sérica e hepática de PON1, bem como aumento nos níveis de expressão gênica e proteica de PON1, mediado pelo açaí, impediu a oxidação da LDL. Além disso, o tratamento com açaí aumentou a expressão de ApoA-I, reduziu a expressão de CD36 e diminuiu o acúmulo de triacilgliceróis no fígado. Estes fatores em conjunto contribuíram para melhorar a resposta ao estresse oxidativo, diminuir a esteatose e o processo inflamatório no fígado. Portanto, o tratamento com açaí foi importante para evitar ou, pelo menos diminuir, os danos hepáticos e a progressão da NAFLD em ratos, conforme proposto na **figura 24**.

Esses achados indicam que o açaí é adequado como uma potencial terapia nutricional e pode ser benéfico na prevenção de doenças como a NAFLD. Este estudo fornece novas perspectivas para a compreensão dos efeitos antioxidantes desse fruto.



**Figura 24.** Resumo dos efeitos do tratamento com açaí sobre o estresse oxidativo, inflamação e esteatose hepática induzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica em ratos. LDL, lipoproteína de baixa densidade, LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada, PON1, Paraoxonase-1, ApoA-I, Apolipoproteína A-I, CD36, receptor scavenger de classe B CD36, SR-A, receptor *scavenger* classe A, TNF, fator de necrose tumoral.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHHAB, K. G.; FAWZIB, H.; MANNAA, F. A. Paraoxonase-1 (PON1) inhibition by tienilic acid produces hepatic injury: Antioxidant protection by fennel extract and whey protein concentrate. **Pathophysiology**, v., n., p., 2015.

ADAMS, L.; ANGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic medicine**, v. 22, n. 9, p. 1129-1133, 2005.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, n., p. 121-126, 1984.

AHMED, A.; WONG, R. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 12, p. 2062-2070, 2015.

ARAB, J. P.; CANDIA, R.; ZAPATA, R.; MUNOZ, C.; ARANCIBIA, J. P.; PONIACHIK, J.; SOZA, A.; FUSTER, F.; BRAHM, J.; SANHUEZA, E.; CONTRERAS, J.; CUELLAR, M. C.; ARRESE, M.; RIQUELME, A. Management of nonalcoholic fatty liver disease: an evidence-based clinical practice review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 34, p. 12182-12201, 2014.

ARGO, C. K.; CALDWELL, S. H. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 4, p. 511-531, 2009.

ASSMANN, G.; NOFER, J.-R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 321-341, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 14 ed. Arlington, 1984. 1141p

AVIRAM, M.; BILLECKE, S.; SORENSON, R.; BISGAIER, C.; NEWTON, R.; ROSENBLAT, M.; EROGUL, J.; HSU, C.; DUNLOP, C.; LA DU, B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 10, p. 1617-1624, 1998.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S.; LA DU, B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 7, p. 892-904, 1999.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1304-1316, 2004.

AVIRAM, M.; KAPLAN, M.; ROSENBLAT, M.; FUHRMAN, B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. In: (Ed.). **Atherosclerosis: Diet and Drugs**: Springer, 2005, p.263-300.

BARBOSA, P. O.; PALA, D.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; DO AMARAL, J. F.; VIEIRA, R. A. L.; DE FREITAS FOLLY, G. A.; VOLP, A. C. P.; DE FREITAS, R. N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v., n., p., 2015.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BAYRAK, T.; BAYRAK, A.; DEMIRPENÇE, E.; KILINÇ, K. Purification and kinetic properties of rabbit liver paraoxonase 1. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 21, p. 1791-1795, 2010.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; JAMROZ, A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. **Pol J Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 661-671, 2002.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.

BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 468-476, 2009.

BERTOLANI, C.; MARRA, F. Role of adipocytokines in hepatic fibrosis. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 17, p. 1929-1940, 2010.

BETTERMANN, K.; HOHENSEE, T.; HAYBAECK, J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 6, p. 9924-9944, 2014.

BHATIA, L. S.; CURZEN, N. P.; CALDER, P. C.; BYRNE, C. D. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? **European heart journal**, v. 33, n. 10, p. 1190-1200, 2012.

BHATTACHARYYA, T.; NICHOLLS, S. J.; TOPOL, E. J.; ZHANG, R.; YANG, X.; SCHMITT, D.; FU, X.; SHAO, M.; BRENNAN, D. M.; ELLIS, S. G. Relationship of

paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **Jama**, v. 299, n. 11, p. 1265-1276, 2008.

BIEGHS, V.; WOUTERS, K.; VAN GORP, P. J.; GIJBELS, M. J.; DE WINTHER, M. P.; BINDER, C. J.; LUTJOHANN, D.; FEBBRAIO, M.; MOORE, K. J.; VAN BILSEN, M.; HOFKER, M. H.; SHIRI-SVERDLOV, R. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. **Gastroenterology**, v. 138, n. 7, p. 2477-2486, 2486 e2471-2473, 2010.

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

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

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

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D. C.; ROUDOT-THORAVALL, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **J Hepatol**, v. 58, n. 3, p. 593-608, 2013.

BOBBIO, F.; DRUZIAN, J.; ABRAO, P. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro. **Euterpe oleracea**, v., n., p., 2000.

BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 18, n. 2, p. 139-143, 2011.

BOEMI, M.; LEVIEV, I.; SIROLLA, C.; PIERI, C.; MARRA, M.; JAMES, R. W. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 1, p. 229-235, 2001.

BOGDANOVA, K.; POZATKOVA, H.; UHERKOVA, L.; RIEGROVA, D.; RYPKA, M.; FEHER, J.; MARCHESINI, G.; VESELY, J. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-a novel common aspect of the metabolic syndrome. **BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC**, v. 150, n. 1, p. 101, 2006.

BOLANOS-GARCIA, V. M.; MIGUEL, R. N. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 83, n. 1, p. 47-68, 2003.

BONOMO, L. D. F.; SILVA, D. N.; BOASQUIVIS, P. F.; PAIVA, F. A.; GUERRA, J. F. D. C.; MARTINS, T. A. F.; TORRES, Á. G. D. J.; DE PAULA, I. T. B. R.; CANESCHI, W. L.; JACOLOT, P. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. **PloS one**, v. 9, n. 3, p., 2014.

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

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147, 2004.

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

BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol**, v. 22, n. 4, p. 330-338, 2005.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 42, p. 5286, 2010.

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

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In: *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2010 Elsevier, p. 186-190.

BURT, A. D.; MUTTON, A.; DAY, C. P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. In: *Semin Diagn Pathol*, 1998, p. 246-258.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.

CALZAVARA, B. B. G. As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico. In: *Simposio Internacional Sobre Plantas De Interes Economico De La Flora Amazonica*, 1972, p. 165-207.

CAMPS, J.; MARSILLACH, J.; JOVEN, J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v. 46, n. 2, p. 83-106, 2009.

CAO, G.; BOOTH, S. L.; SADOWSKI, J. A.; PRIOR, R. L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 5, p. 1081-1087, 1998.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**: Edições CEJUP; Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991

CAVE, M.; DEACIUC, I.; MENDEZ, C.; SONG, Z.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; MCCLAIN, C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 184-195, 2007.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CHALASANI, N.; DEEG, M. A.; CRABB, D. W. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **The American journal of gastroenterology**, v. 99, n. 8, p. 1497-1502, 2004.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; DIEHL, A. M.; BRUNT, E. M.; CUSI, K.; CHARLTON, M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

CHANDRA, S.; SAH, K.; BAGEWADI, A.; KELUSKAR, V.; SHETTY, A.; AMMANAGI, R.; NAIK, Z. Additive and synergistic effect of phytochemicals in prevention of oral cancer. **European Journal of General Dentistry**, v. 1, n. 3, p. 142, 2012.

CHITTURI, S.; ABEYGUNASEKERA, S.; FARRELL, G. C.; HOLMES-WALKER, J.; HUI, J. M.; FUNG, C.; KARIM, R.; LIN, R.; SAMARASINGHE, D.; LIDDLE, C.; WELTMAN, M.; GEORGE, J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 373-379, 2002.

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

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 371-392, 2003.

COSTA, L. G.; VITALONE, A.; COLE, T. B.; FURLONG, C. E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 541-550, 2005.

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

COTRIM, H. P.; OLIVEIRA, C. P.; COELHO, H. S.; ALVARES-DA-SILVA, M. R.; NABUCO, L.; PARISE, E. R.; IVANTES, C.; MARTINELLI, A. L.; GALIZZI-FILHO, J.; CARRILHO, F. J. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 71, n. 5, p. 281-284, 2016.

COUTINHO, I.; COELHO, R.; KATAOKA, V.; HONDA, N.; SILVA, J.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of Campomanesia adamantium leaves. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008.

COX, B.; EMILI, A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1872-1878, 2006.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DA SILVA, I. M.; DE SANTANA, A. C.; DA SILVA REIS, M. Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura do açaí no Estado do Pará. **CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO**, v., n., p. 25, 2010.

DA SILVA MENEZES, E. M.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amaz**, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

DAY, C. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 16, n. 5, p. 663-678, 2002.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.



DE LIMA YAMAGUCHI, K. K.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food chemistry**, v. 179, n., p. 137-151, 2015.

DE OLIVEIRA, M. D. S.; DE CARVALHO, J. E. U.; DO NASCIMENTO, W. M. O. **Açaí (Euterpe oleracea Mart.)**: Funep, 2000

DE OLIVEIRA, P. R. B.; DA COSTA, C. A.; DE BEM, G. F.; DE CAVALHO, L. C. R. M.; DE SOUZA, M. A. V.; DE LEMOS NETO, M.; DA CUNHA SOUSA, P. J.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. 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. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.

DE SANTANA, A. C.; CARVALHO, D. F.; MENDES, F. A. T. Organização e competitividade das empresas de polpa de frutas do Estado do Pará: 1995 a 2004. v., n., p., 2010.

DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; DE PAULA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 804-810, 2010.

DE SOUZA, M. O.; E SILVA, L. S.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L.; DE FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 976-984, 2012.

DEAKIN, S.; LEVIEV, I.; GUERNIER, S.; JAMES, R. W. Simvastatin Modulates Expression of the PON1 Gene and Increases Serum Paraoxonase A Role for Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 11, p. 2083-2089, 2003.

DEAKIN, S. P.; JAMES, R. W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. **Clin Sci (Lond)**, v. 107, n. 5, p. 435-447, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222-1229, 2006.

DIAS, M. M.; NORATTO, G.; MARTINO, H. S.; ARBIZU, S.; PELUZIO MDO, C.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394-1405, 2014.

DIEHL, A. M. Lessons from animal models of NASH. **Hepatology Research**, v. 33, n. 2, p. 138-144, 2005.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. S1, p. S128-S138, 2008.

DOS SANTOS DIAS, M. M.; MARTINO, H. S. D.; NORATTO, G.; ROQUE-ANDRADE, A.; STRINGHETA, P. C.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. **Food Funct**, v., n., p., 2015.

DRAGANOV, D. I.; STETSON, P. L.; WATSON, C. E.; BILLECKE, S. S.; LA DU, B. N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33435-33442, 2000.

DRAGANOV, D. I.; LA DU, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 369, n. 1, p. 78-88, 2004.

DRAGANOV, D. I.; TEIBER, J. F.; SPEELMAN, A.; OSAWA, Y.; SUNAHARA, R.; LA DU, B. N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **J Lipid Res**, v. 46, n. 6, p. 1239-1247, 2005.

DURAZZO, M.; BELCI, P.; COLLO, A.; GRISOGLIO, E.; BO, S. Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of hepatology**, v. 2012, n., p., 2012.

ENJOJI, M.; NAKAMUTA, M. Is the control of dietary cholesterol intake sufficiently effective to ameliorate nonalcoholic fatty liver disease? **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 7, p. 800-803, 2010.

ERLICH, P. M.; LUNETTA, K. L.; CUPPLES, L. A.; ABRAHAM, C. R.; GREEN, R. C.; BALDWIN, C. T.; FARRER, L. A. Serum paraoxonase activity is associated with variants in the PON gene cluster and risk of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 5, p. 1015 e1017-1023, 2012.

FEILLET-COUDRAY, C.; SUTRA, T.; FOURET, G.; RAMOS, J.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; CABELLO, G.; CRISTOL, J.; COUDRAY, C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD (P) H oxidase systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 624-632, 2009.

FEIO, C. A.; IZAR, M. C.; IHARA, S. S.; KASMAS, S. H.; MARTINS, C. M.; FEIO, M. N.; MAUES, L. A.; BORGES, N. C.; MORENO, R. A.; POVOA, R. M.; FONSECA, F. A. Euterpe

oleracea (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 3, p. 237-245, 2012.

FERNANDEZ, M.-L. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. **Curr Opin Lipidol**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2001.

FERNANDEZ, M. L. Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium. **J Lipid Res**, v. 36, n. 11, p. 2394-2404, 1995.

FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; FIGUERA, L.; JOVEN, J. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical chemistry**, v. 48, n. 2, p. 261-268, 2002.

FERRÉ, N.; MARSILLACH, J.; CAMPS, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; RIU, F.; COLL, B.; TOUS, M.; JOVEN, J. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 45, n. 1, p. 51-59, 2006.

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

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, 1998.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. **Atherosclerosis**, v. 180, n. 1, p. 55-61, 2005.

FURUMAKI, H.; MATSUOKA, S.; SAKURAI, T.; KOHANAWA, M.; ZHAO, S.; KUGE, Y.; TAMAKI, N.; CHIBA, H. A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. **Laboratory investigation**, v. 92, n. 2, p. 265-281, 2012.

GAGGINI, M.; MORELLI, M.; BUZZIGOLI, E.; DEFRONZO, R. A.; BUGIANESI, E.; GASTALDELLI, A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1544-1560, 2013.

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

GARCÍA-HEREDIA, A.; KENSICKI, E.; MOHNEY, R. P.; RULL, A.; TRIGUERO, I.; MARSILLACH, J.; TORMOS, C.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; SHIH, D. M. Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 4, p. 1946-1955, 2013.

GARIGE, M.; GONG, M.; VARATHARAJALU, R.; LAKSHMAN, M. R. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression via sterol regulatory element binding protein 2 that translocates from the endoplasmic reticulum to the nucleus where it specifically interacts with sterol responsive element-like sequence in paraoxonase 1 promoter in HuH7 liver cells. **Metabolism**, v. 59, n. 9, p. 1372-1378, 2010.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GERHARD, G. S.; DISTEFANO, J. K. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. **World J Hepatol**, v. 7, n. 2, p. 226-234, 2015.

GIAMPIERI, F.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; GASPARRINI, M.; AFRIN, S.; CIANCIOSI, D.; REBOREDO-RODRIGUEZ, P.; VARELA-LOPEZ, A.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v., n., p., 2017.

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

GLASSNER, K.; MALATY, H. M.; ABRAHAM, B. P. Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Among Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 23, n. 6, p. 998-1003, 2017.

GONG, M.; GARIGE, M.; VARATHARAJALU, R.; MARMILLOT, P.; GOTTIPATTI, C.; LECKEY, L. C.; LAKSHMAN, R. M. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 379, n. 4, p. 1001-1004, 2009.

GOUÉDARD, C.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 12, p. 5209-5222, 2004.

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

GUERRA, J. F. D. C.; MAGALHÃES, C. L. D. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188, 2011.

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

GUGLIUCCI, A.; KOTANI, K.; KIMURA, S. Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. **Journal of lipids**, v. 2012, n., p., 2012.

GUPTA, N.; GILL, K.; SINGH, S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. v., n., p., 2009.

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

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, 2007.

HASHIMOTO, E.; TANIAI, M.; TOKUSHIGE, K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28 Suppl 4, n., p. 64-70, 2013.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HOUBEN, T.; BRANDSMA, E.; WALENBERGH, S. M.; HOFKER, M. H.; SHIRI-SVERDLOV, R. Oxidized LDL at the crossroads of immunity in non-alcoholic steatohepatitis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 4, p. 416-429, 2017.

HUANG, X. D.; FAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, P.; YUAN, J. P.; LI, M. J.; ZHAN, X. Y. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 18, p. 2888-2893, 2008.

ICHIMURA, M.; KAWASE, M.; MASUZUMI, M.; SAKAKI, M.; NAGATA, Y.; TANAKA, K.; SURUGA, K.; TAMARU, S.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague–Dawley rats. **Hepatology Research**, v. 45, n. 4, p. 458-469, 2015.

JAMES, R. W.; DEAKIN, S. P. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1986-1994, 2004.

JAOUAD, L.; MILOCHEVITCH, C.; KHALIL, A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. **Free radical research**, v. 37, n. 1, p. 77-83, 2003.

JAOUAD, L.; DE GUISE, C.; BERROUGUI, H.; CLOUTIER, M.; ISABELLE, M.; FULOP, T.; PAYETTE, H.; KHALIL, A. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 1, p. 191-200, 2006.

JARRAR, M.; BARANOVA, A.; COLLANTES, R.; RANARD, B.; STEPANOVA, M.; BENNETT, C.; FANG, Y.; ELARINY, H.; GOODMAN, Z.; CHANDHOKE, V. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 5, p. 412-421, 2008.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L.; BEAMAN, R.; ENDRES, J. R.; SCHAUSS, A. G. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326-8333, 2008.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KARAVIA, E. A.; PAPACHRISTOU, D. J.; LIOPETA, K.; TRIANTAPHYLLIDOU, I. E.; DIMITRAKOPOULOS, O.; KYPREOS, K. E. Apolipoprotein A-I modulates processes associated with diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Mol Med**, v. 18, n., p. 901-912, 2012.

KATO, R.; MORI, C.; KITAZATO, K.; ARATA, S.; OBAMA, T.; MORI, M.; TAKAHASHI, K.; AIUCHI, T.; TAKANO, T.; ITABE, H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 1, p. 33-39, 2009.

KEDAGE, V.; MUTTIGI, M. S.; SHETTY, M. S.; SUVARNA, R.; RAO, S. S.; JOSHI, C.; PRAKASH, M. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 16, n. 2, p. 79, 2010.

KHATEEB, J.; GANTMAN, A.; KREITENBERG, A. J.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR- $\gamma$  pathway. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 119-125, 2010.

KILIC, S. S.; AYDIN, S.; KILIC, N.; ERMAN, F.; AYDIN, S.; CELIK, İ. Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 46, p. 7351, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LA DU, B. N. Structural and functional diversity of paraoxonases. **Nature medicine**, v. 2, n. 11, p. 1186-1187, 1996.

LABRECQUE, D. R.; ABBAS, Z.; ANANIA, F.; FERENCI, P.; KHAN, A. G.; GOH, K.-L.; HAMID, S. S.; ISAKOV, V.; LIZARZABAL, M.; PEÑARANDA, M. M. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 467-473, 2014.

LEE, K. S.; BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER, M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 2461, 1995.

LEUNG, C.; YEOH, S. W.; PATRICK, D.; KET, S.; MARION, K.; GOW, P.; ANGUS, P. W. Characteristics of hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non-cirrhotic non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 4, p. 1189-1196, 2015.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v., n. 233, p. 346-357, 1994.

LI, H.-L.; LIU, D.-P.; LIANG, C.-C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **Journal of molecular medicine**, v. 81, n. 12, p. 766-779, 2003.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart.(Acai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LIMA, E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LISBOA, Q. C.; COSTA, S.; FEROLLA, M.; COUTO, C. A. Current management of non-alcoholic fatty liver disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 9, p. 872-878, 2016.

LITVINOV, D.; MAHINI, H.; GARELNABI, M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 11, p. 523, 2012.

LIU, L.; GAO, C.; YAO, P.; GONG, Z. Quercetin Alleviates High-Fat Diet-Induced Oxidized Low-Density Lipoprotein Accumulation in the Liver: Implication for Autophagy Regulation. **Biomed Res Int**, v. 2015, n., p. 607531, 2015.

LIU, Y.; SONG, H.; WANG, L.; XU, H.; SHU, X.; ZHANG, L.; LI, Y.; LI, D.; JI, G. Hepatoprotective and antioxidant activities of extracts from *Salvia-Nelumbinis naturalis* against nonalcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet in mice. **J Transl Med**, v. 12, n., p. 315, 2014.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 686-690, 2013.

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

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

LUO, X.-Y.; TAKAHARA, T.; HOU, J.; KAWAI, K.; SUGIYAMA, T.; TSUKADA, K.; TAKEMOTO, M.; TAKEUCHI, M.; ZHONG, L.; LI, X.-K. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 1, p. 287-293, 2012.

LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: ANVISA**, v., n., p., 2008.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. Human serum paraoxonase. **Gen Pharmacol**, v. 31, n. 3, p. 329-336, 1998.

MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS letters**, v. 286, n. 1, p. 152-154, 1991.



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

MAEDA, N.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K.; NISHIZAWA, H.; MATSUDA, M.; NAGARETANI, H.; FURUYAMA, N.; KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; ARITA, Y.; KOMURO, R.; OUCHI, N.; KIHARA, S.; TOCHINO, Y.; OKUTOMI, K.; HORIE, M.; TAKEDA, S.; AOYAMA, T.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat Med**, v. 8, n. 7, p. 731-737, 2002.

MARCASON, W. What is the acai berry and are there health benefits? **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 11, p. 1968, 2009.

MARCHESINI, G.; PAGOTTO, U.; BUGIANESI, E.; DE IASIO, R.; MANINI, R.; VANNI, E.; PASQUALI, R.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Low ghrelin concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are related to insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 12, p. 5674-5679, 2003.

MARCHESINI, G.; MARZOCCHI, R.; AGOSTINI, F.; BUGIANESI, E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Curr Opin Lipidol**, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2005.

MARRA, F. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1529-1532, 2002.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; RIU, F.; BELTRÁN, R.; JOVEN, J.; CAMPS, J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 2, p. 146-157, 2008.

MARTINO, H. S. D.; DOS SANTOS DIAS, M. M.; NORATTO, G.; TALCOTT, S.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea* Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 23, n., p. 432-443, 2016.

MATHEUS, M. E.; DE OLIVEIRA FERNANDES, S. B.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; DE SOUSA MENEZES, F.; FERNANDES, P. D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291-296, 2006.

MATOS, S. L.; PAULA, H. D.; PEDROSA, M. L.; SANTOS, R. C. D.; OLIVEIRA, E. L. D.; CHIANCA JÚNIOR, D. A.; SILVA, M. E. Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 203-209, 2005.

MCCULLOUGH, A. J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n., p. S17-S29, 2006.

MERTENS-TALCOTT, S. U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S. T.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7796-7802, 2008.

MICHELOTTI, G. A.; MACHADO, M. V.; DIEHL, A. M. NAFLD, NASH and liver cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 656-665, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 dez. 1999. Disponível em < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/19\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/19_99.htm)>.

MOORE, R. E.; NAVAB, M.; MILLAR, J. S.; ZIMETTI, F.; HAMA, S.; ROTHBLAT, G. H.; RADER, D. J. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein AI attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. **Circulation research**, v. 97, n. 8, p. 763-771, 2005.

MORELLI, M.; GAGGINI, M.; DANIELE, G.; MARRACCINI, P.; SICARI, R.; GASTALDELLI, A. Ectopic fat: the true culprit linking obesity and cardiovascular disease? **Thromb Haemost**, v. 110, n. 4, p. 651-660, 2013.

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

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Prog Lipid Res**, v. 52, n. 1, p. 175-191, 2013.

NAIR, S.; DIEHL, A.; PERRILLO, R. Metformin in non alcoholic steatohepatitis (NASH): efficacy and safety: a preliminary report. In: Gastroenterology, 2002WB SAUNDERS CO INDEPENDENCE SQUARE WEST CURTIS CENTER, STE 300, PHILADELPHIA, PA 19106-3399 USA, p. A621-A622.

NARANG, S.; YADAV, A.; VAIDYA, M. Free radicals vs Antioxidants: The deadly demons vs the friendly scavengers: A review. **Asian J Pharmacy Life Sci**, v. 1, n. 1, p. 95-100, 2011.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.; SPONSELLER, C.; HAMPTON, K.; KARADAGHY, A.; BACON, B.; WEHMEIER, K.; BRUNT, E. Rosiglitazone improves insulin sensitivity, ALT and hepatic steatosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. In: Gastroenterology,

2002WB SAUNDERS CO INDEPENDENCE SQUARE WEST CURTIS CENTER, STE 300, PHILADELPHIA, PA 19106-3399 USA, p. A622-A622.

NG, C. J.; WADLEIGH, D. J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V. R.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; REDDY, S. T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44444-44449, 2001.

NG, C. J.; SHIH, D. M.; HAMA, S. Y.; VILLA, N.; NAVAB, M.; REDDY, S. T. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 2, p. 153-163, 2005.

NOGUEIRA, L. **Sistema de Produção do Açaí: Introdução e Importância Econômica**: secondary title: Embrapa Amazônia Oriental/Sistemas de Produção, 2006.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIREDO, F.; MULLER, A. **Açaí**: Embrapa Amazônia Oriental, 2005  
NOORI, S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 8, p. 1-9, 2012.

ODENDAAL, A. Y.; SCHAUSS, A. G.; WATSON, R.; REEDY, V.; ZIBADI, S. **Potent antioxidant and anti-inflammatory flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, Açaí (Euterpe spp.)**: secondary title: Academic Press San Diego, CA, 2014, 219-239 p.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food chemistry**, v. 105, n. 1, p. 28-35, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3593-3600, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açaí species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199-1205, 2009.

PAGANO, C.; SOARDO, G.; ESPOSITO, W.; FALLO, F.; BASAN, L.; DONNINI, D.; FEDERSPIL, G.; SECHI, L. A.; VETTOR, R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 113-118, 2005.

PALA, D.; BARBOSA, P. O.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; FREITAS, F. R.; VOLP, A. C.; MARANHÃO, R. C.; FREITAS, R. N. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects

plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clin Nutr**, v., n., p., 2017.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 7, p. 719-731, 2011.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 4, p. R843-R863, 2011.

PARISE, E. R.; SALGADO, A. L. D. A.; SECAF, R.; CERRI, L.; CERRI, G. Prevalência de esteatose hepática em ultra-sonografia de abdome. **GED gastroenterol. endosc. dig**, v. 22, n. 6, p. 235-237, 2003.

PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. **Annual Review of Medicine**, v. 43, n. 1, p. 219-225, 1992.

POLYZOS, S. A.; MANTZOROS, C. S. Nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1007-1016, 2016.

PONCE-RUIZ, N.; MURILLO-GONZALEZ, F. E.; ROJAS-GARCIA, A. E.; MACKNESS, M.; BERNAL-HERNANDEZ, Y. Y.; BARRON-VIVANCO, B. S.; GONZALEZ-ARIAS, C. A.; MEDINA-DIAZ, I. M. Transcriptional regulation of human Paraoxonase 1 by nuclear receptors. **Chem Biol Interact**, v. 268, n., p. 77-84, 2017.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 3, p. 829, 2008.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

PRÉCOURT, L.-P.; AMRE, D.; DENIS, M.-C.; LAVOIE, J.-C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E.; LEVY, E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 1, p. 20-36, 2011.

PRIMO-PARMO, S. L.; SORENSON, R. C.; TEIBER, J.; LA DU, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v. 33, n. 3, p. 498-507, 1996.

QU, S.; ZHANG, J.; LI, Y.; ZHENG, Y.; ZHU, Y.; WANG, L. [Protective effect of Acai berries on chronic alcoholic hepatic injury in rats and their effect on inflammatory cytokines]. **Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica**, v. 39, n. 24, p. 4869-4872, 2014.

RADER, D. J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 90, n. 8A, p. 62i-70i, 2002.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3765-3773, 2003.

RAMULU, P.; RAO, P. U. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. **Journal of food composition and analysis**, v. 16, n. 6, p. 677-685, 2003.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 5, p. G852-858, 2006.

REDDY, S. T.; WADLEIGH, D. J.; GRIJALVA, V.; NG, C.; HAMA, S.; GANGOPADHYAY, A.; SHIH, D. M.; LUSIS, A. J.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 4, p. 542-547, 2001.

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

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. A. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, n. 1, p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, S. M. R.; DE QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. D. C. G.; COSTA, N. M. B.; DA MATTA, S. L. P.; DE QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, p., 2006.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **Jama**, v. 313, n. 22, p. 2263-2273, 2015.

ROBERTSON, G.; LECLERCQ, I.; FARRELL, G. C. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 5, p. G1135-G1139, 2001.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

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

ROSENBLAT, M.; DRAGANOV, D.; WATSON, C. E.; BISGAIER, C. L.; LA DU, B. N.; AVIRAM, M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 3, p. 468-474, 2003.

RUPÉREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

SAMY, W.; HASSANIAN, M. A. Paraoxonase-1 activity, malondialdehyde and glutathione peroxidase in non-alcoholic fatty liver disease and the effect of atorvastatin. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 2, p. 80-85, 2011.

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

SCHATTENBERG, J. M.; GALLE, P. R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. **Dig Dis**, v. 28, n. 1, p. 247-254, 2010.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart.(acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006b.

SCHUPPAN, D.; SCHATTENBERG, J. M. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28 Suppl 1, n., p. 68-76, 2013.

SHIH, D. M.; GU, L.; XIA, Y.-R.; NAVAB, M.; LI, W.-F.; HAMA, S.; CASTELLANI, L. W.; FURLONG, C. E.; COSTA, L. G.; FOGELMAN, A. M. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 284-287, 1998.

SHIH, D. M.; XIA, Y.-R.; WANG, X.-P.; WANG, S. S.; BOURQUARD, N.; FOGELMAN, A. M.; LUSIS, A. J.; REDDY, S. T. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. **Circulation research**, v. 100, n. 8, p. 1200-1207, 2007.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SORENSEN, R. C.; PRIMO-PARMO, S. L.; KUO, C.-L.; ADKINS, S.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B. N. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 16, p. 7187-7191, 1995.

SOUZA, A. D. G. D.; SOUSA, N.; SILVA, S. D.; NUNES, C.; CANTO, A. D. C.; CRUZ, L. D. A. Fruteiras da Amazônia. **Brasília, Embrapa-SPI**, v., n., p., 1996.

SPADA, P. D.; DANI, C.; BORTOLINI, G. V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MOHLIG, M.; BERGMANN, M. M.; RISTOW, M.; BOEING, H.; PFEIFFER, A. F. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v. 361, n. 9353, p. 226-228, 2003.

STEPHENS, J. W.; KHANOLKAR, M. P.; BAIN, S. C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 2, p. 321-329, 2009.

STOJSAVLJEVIC, S.; GOMERCIC PALCIC, M.; VIROVIC JUKIC, L.; SMIRCIC DUVNJAK, L.; DUVNJAK, M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18070-18091, 2014.

SUN, X.; SEEBERGER, J.; ALBERICO, T.; WANG, C.; WHEELER, C. T.; SCHAUSS, A. G.; ZOU, S. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Experimental gerontology**, v. 45, n. 3, p. 243-251, 2010.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, 2012.

TAKAMURA, T.; MISU, H.; OTA, T.; KANEKO, S. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver. **Endocr J**, v. 59, n. 9, p. 745-763, 2012.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TORRES, D. M.; WILLIAMS, C. D.; HARRISON, S. A. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 8, p. 837-858, 2012.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; NILSA, R. D.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TSOCHATZIS, E.; PAPTAEODORIDIS, G. V.; ARCHIMANDRITIS, A. J. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. **Am J Gastroenterol**, v. 101, n. 11, p. 2629-2640, 2006.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; BARRETT, M. L. Effects of Acai(Euterpe oleracea Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

USTUNDAG, B.; BAHCECIOGLU, I. H.; SAHIN, K.; DUZGUN, S.; KOCA, S.; GULCU, F.; OZERCAN, I. H. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 8, p. 2006-2014, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN HIMBERGEN, T. M.; ROEST, M.; DE GRAAF, J.; JANSEN, E. H.; HATTORI, H.; KASTELEIN, J. J.; VOORBIJ, H. A.; STALENHOF, A. F.; VAN TITS, L. J. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. **J Lipid Res**, v. 46, n. 3, p. 445-451, 2005.

VAN ROOSMALEN, M. G. **Fruits of the Guianan flora**: Utrecht, 1985

VAN SOEST, P. U.; WINE, R. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the association of official analytical chemists**, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1967.



VIDELA, L. A.; RODRIGO, R.; ARAYA, J.; PONIACHIK, J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1499-1507, 2004a.

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

WALENBERGH, S. M.; KOEK, G. H.; BIEGHS, V.; SHIRI-SVERDLOV, R. Non-alcoholic steatohepatitis: The role of oxidized low-density lipoproteins. **Journal of hepatology**, v. 58, n. 4, p. 801-810, 2013.

WATSON, A.; BERLINER, J.; HAMA, S.; LA DU, B.; FAULL, K.; FOGELMAN, A.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 6, p. 2882, 1995.

WHITE, D. L.; KANWAL, F.; EL-SERAG, H. B. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 12, p. 1342-1359. e1342, 2012.

WILLIAMS, C. D.; STENGEL, J.; ASIKE, M. I.; TORRES, D. M.; SHAW, J.; CONTRERAS, M.; LANDT, C. L.; HARRISON, S. A. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 124-131, 2011.

WONG, J. M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C. W.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235-243, 2006.

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

WREE, A.; BRODERICK, L.; CANBAY, A.; HOFFMAN, H. M.; FELDSTEIN, A. E. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 627-636, 2013.

XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M. E.; SCHAUSS, A. G.; NAGARAJAN, S.; WU, X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-333, 2011.

XU, L.; KITADE, H.; NI, Y.; OTA, T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1563-1579, 2015.

XUE, Z.; LI, D.; YU, W.; ZHANG, Q.; HOU, X.; HE, Y.; KOU, X. Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. **Food Funct**, v. 8, n. 4, p. 1414-1437, 2017.

YASUTAKE, K.; NAKAMUTA, M.; SHIMA, Y.; OHYAMA, A.; MASUDA, K.; HARUTA, N.; FUJINO, T.; AOYAGI, Y.; FUKUIZUMI, K.; YOSHIMOTO, T.; TAKEMOTO, R.; MIYAHARA, T.; HARADA, N.; HAYATA, F.; NAKASHIMA, M.; ENJOJI, M. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 4, p. 471-477, 2009.


YOSHIMURA, Y.; NISHII, S.; ZAIMA, N.; MORIYAMA, T.; KAWAMURA, Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 434, n. 3, p. 486-491, 2013.

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

ZHANG, N. The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. **Journal of cardiovascular disease research**, v. 2, n. 2, p. 91-95, 2011.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Certificado do protocolo aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da UFOP.

	<b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370 Email: ceua@propp.ufop.br	
---	---	---

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 2012/17 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Caracterização histológica e bioquímica da esteatose hepática e metabolismo do colesterol em ratos alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados ou ácidos graxos insaturados e o possível efeito protetor do açaí*", que tem como responsável a Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 30/06/2014.

Ouro Preto, 7 de maio de 2012

  
Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima  
Vice-coordenador da CEUA/UFOP

## Research Article

# Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Upregulates Paraoxonase 1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats

Renata Rebeca Pereira,<sup>1,2</sup> Isabel Cristina Mallosto Emerich de Abreu,<sup>3</sup>  
Joyce Ferreira da Costa Guerra,<sup>4</sup> Nara Nunes Lage,<sup>1</sup>  
Juliana Márcia Macedo Lopes,<sup>1</sup> Maísa Silva,<sup>5</sup> Wanderson Geraldo de Lima,<sup>1,2</sup>  
Marcelo Eustáquio Silva,<sup>1,6</sup> and Maria Lucia Pedrosa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center in Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of São Paulo, 04039-002 São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup>Postgraduate Program in Health and Nutrition, Federal University of Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>5</sup>Department of Basic Health, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares Campus, 35010-177 Governador Valadares, MG, Brazil

<sup>6</sup>Department of Foods, Federal University of Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria Lucia Pedrosa; [mlpedrosa@gmail.com](mailto:mlpedrosa@gmail.com)

Received 25 March 2016; Revised 15 June 2016; Accepted 11 July 2016

Academic Editor: Borna Relja

Copyright © 2016 Renata Rebeca Pereira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), a fruit from the Amazon region, has emerged as a promising source of polyphenols. Açaí consumption has been increasing owing to ascribed health benefits and antioxidant properties; however, its effects on hepatic injury are limited. In this study, we evaluated the antioxidant effect of filtered açaí pulp on the expression of paraoxonase (PON) isoforms and PON1 activity in rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). The rats were fed a standard AIN-93M (control) diet or a high-fat (HF) diet containing 25% soy oil and 1% cholesterol with or without açaí pulp (2 g/day) for 6 weeks. Our results show that açaí pulp prevented low-density lipoprotein (LDL) oxidation, increased serum and hepatic PON1 activity, and upregulated the expression of PON1 and ApoA-I in the liver. In HF diet-fed rats, treatment with açaí pulp attenuated liver damage, reducing fat infiltration and triglyceride (TG) content. In rats receiving açaí, increased serum PON1 activity was correlated with a reduction in hepatic steatosis and hepatic injury. These findings suggest the use of açaí as a potential therapy for liver injuries, supporting the idea that dietary antioxidants are a promising approach to enhance the defensive systems against oxidative stress.

## 1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) affects 10–30% of the general population, representing a spectrum of diseases ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), NAFLD-associated cirrhosis, and end-stage liver disease [1]. NAFLD also increases the risk of hepatocellular carcinoma (HCC). HCC and end-stage liver disease may markedly increase the risk of liver-related mortality [2]. Oxidative stress is thought to be one of the underlying

causes of NAFLD [3, 4]. Accumulation of lipids in hepatocytes impairs the oxidative capacity of the mitochondria, increasing the reduced state of the electron transport chain complexes and stimulating the peroxisomal and microsomal pathways of fat oxidation. As a consequence, reactive oxygen species (ROS) are generated that can induce lipid peroxidation, which in turn may be followed by inflammation and fibrogenesis [5].

Paraoxonase (PON) is associated with a variety of diseases involving oxidative stress [6]. The PON gene family

contains three members, PON1, PON2, and PON3 [7, 8]. PON1 is a calcium-dependent esterase closely associated with apolipoprotein A-I (ApoA-I) and high-density lipoprotein (HDL) and has been reported to confer antioxidant properties by decreasing the accumulation of lipid peroxidation products [9, 10]. PON1 prevents the production and accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein particles (LDL) [11, 12] and protects phospholipids from oxidation in HDL. The liver plays a key role in the synthesis of serum PON1, which hydrolyzes a number of substrates, including paraoxon, phenyl acetate, lipid peroxides, and hydroperoxides [13]. PON3 is also predominantly expressed in the liver and secreted into the plasma, where it has an antioxidant effect against LDL oxidation [14]. PON2 is not detectable in serum but is expressed in many tissues, including brain, liver, kidney, and testis [15], and plays a role in decreasing cellular oxidative stress and the inflammatory response.

PON1 activity is reduced in many diseases such as atherosclerosis [16], diabetes mellitus [17], chronic kidney disease [18], and hypercholesterolemia [19]. Deficient serum PON1 activity has been associated with an increased risk for Alzheimer's disease [20]. In addition, an active role of PON1 in the regulation of oxidative stress, fibrosis, and hepatic cell apoptosis in chronic liver diseases has been suggested [21–23]. PON1 levels significantly decreased in serum of patients with chronic liver diseases such as NAFLD, hepatitis, and cirrhosis [13, 24]. More relevantly, PON1-deficient mice fed a high-fat high-cholesterol diet showed histological alterations in the liver, suggesting that PON1 plays a major role in protection against oxidative stress on diet-induced fatty liver [25].

Dietary polyphenols, including resveratrol and flavonoids, such as quercetin and curcumin, upregulate PON1 [26, 27]. Recent studies have indicated the sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as targets of polyphenols [28, 29]. SREBPs play a central role in cellular lipogenesis and lipid homeostasis by controlling the synthesis of fatty acids, triacylglycerols, and cholesterol [30] and comprise three main proteins, termed SREBP-1a, SREBP-1c, and SREBP-2, that are encoded by two genes: SREBP1 and SREBP2. While SREBP-1a and SREBP-1c control the fatty acid pathways, SREBP-2 regulates the cholesterol biosynthetic pathway. It was demonstrated that quercetin upregulates PON1 gene transcription and PON1 activity via SREBP-2 that translocates from the endoplasmic reticulum to the nucleus, where it specifically interacts with sterol responsive-like sequence in PON1 promoter [31]. Polyphenols also might activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcription factor sensor for organic chemicals, and stimulate PON1 transcription activation [32, 33].

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), a fruit native to the Amazon region, has gained international attention as a functional food owing to its high content of polyphenols and potential health benefits. Most of the beneficial effects of açaí are attributed to secondary metabolites such as flavonoids and other polyphenols, including anthocyanins and proanthocyanidins (specifically cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside), which provide antioxidant activity [34, 35]. Previous *in vitro* and animal model studies showed that

açaí consumption slows the progression of oxidative stress [36, 37] and induces hypocholesterolemic [38], antiatherogenic, anti-inflammatory [39], and hepatoprotective [40] effects. Previous work from our laboratory showed that diet supplementation with açaí increased serum activity of the antioxidant enzyme PON1 in rats [19] but did not evaluate the effect of açaí on the expression of PON isoforms.

In spite of these advances, we still do not know whether açaí treatment can affect liver PON isoforms and influence the progression of NAFLD in rats. Therefore, in this study we evaluated the protective effects of açaí against oxidative stress induced by HF diet with respect to LDL oxidation, expression of PON isoforms, and PON1 activity in rats with NAFLD. Our results show that açaí protected LDL against oxidation and at the same time increased serum and hepatic PON1 activity and upregulated the expression of PON1 and ApoA-I in the liver. Adding to these effects, açaí concomitantly ameliorated hepatic steatosis and hepatic injury. Because exogenous antioxidant sources have been shown to help retard NAFLD progression [41], we believe that the results presented herein may contribute to future efforts researching açaí and other polyphenol-rich foods as a potential therapy for liver injuries and other degenerative diseases.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Chemicals and Reagents.** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), gallic acid, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane, phenyl acetate, butylhydroxytoluene (BHT), Tris(hydroxymethyl)aminomethane, dithiothreitol (DTT), and protease inhibitor cocktail were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Triton-X100 and Folin-Ciocalteu phenol reagent were purchased from VETEC (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). Chloroform, methanol (MeOH), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), and glycerol were purchased from Synth (Diadema, São Paulo, Brazil). RNAagents Total RNA Isolation System was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and Power SYBR® Green PCR Master Mix reagent were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Rat Ox-LDL ELISA kit (Cat. number E-EL-R0710) was purchased from Elabscience Biotechnology Co., Ltd. (Wuhan, China), and kits for biochemical analysis were purchased from Labtest Diagnostica SA (Lagoa Santa, MG, Brazil).

**2.2. Açaí Pulp Preparation and Composition.** A single lot of pasteurized frozen açaí pulp without colorants or preservatives was obtained from Icefruit Comércio de Alimentos Ltda. (Tatuí, São Paulo, Brazil). The pulp was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use, when it was thawed and sieved through a 22-mesh sieve. The resultant filtered açaí pulp was directly administered to animals by oral gavage. The macronutrient composition of filtered açaí pulp was as follows (per 100 g): 96 g moisture, 1.196 g lipids, 0.059 g carbohydrates, and 0.416 g proteins, all determined according to the Association of Official Analytical Chemists [42], and 2.202 g neutral detergent fiber,



determined according to Van Soest and Wine [43]. The total caloric content of the filtered açai pulp was 12.7 kcal/100 g.

**2.3. Phytochemical Composition and DPPH Radical-Scavenging Assay.** Total phenolic content of filtered açai pulp was determined by colorimetric analysis using the Folin-Ciocalteu reagent, as described by Georgé et al. [44]. Briefly, 0.5 mL of the diluted sample or of a standard solution of gallic acid was added to 2.5 mL of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu reagent. After 2 min at room temperature, 2 mL of saturated sodium carbonate solution (7.5%) was added and mixed vigorously. After incubation at 50°C for 15 min, the mixture was placed in an ice bath. Absorbance at 760 nm relative to the blank was determined. The obtained measurement was compared to a gallic acid calibration curve, and results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of filtered pulp.

Total monomeric anthocyanin content of filtered açai pulp was determined by the differential pH method as described previously [45] and modified by Guerra et al. [36]. Samples were diluted with two different buffers: potassium chloride (0.025 M), pH 1.0, and sodium acetate (4.0 M), pH 4.5. Absorbance was determined simultaneously as absorption maxima for the visible light spectrum and at 700 nm after incubation in the dark for 30 min at room temperature. Total anthocyanin content was expressed in milligrams of cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g of filtered pulp. A molar absorptivity of  $26\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  and a molecular mass of 449.2 g/mol were used for cyanidin-3-glucoside.

Measurement of DPPH radical-scavenging activity was determined by the method of Brand-Williams et al. [46] with modifications. Briefly, a 100  $\mu\text{L}$  aliquot of filtered açai pulp was added to 3.9 mL of a MeOH solution containing 60  $\mu\text{M}$  DPPH. The mixture was homogenized and left to stand at room temperature for 30 min in the dark. Absorbance was measured spectrophotometrically at 515 nm against a MeOH blank. Antioxidant activity was determined by the reduction in the absorbance of the DPPH radical. Trolox was used as the antioxidant standard. The percentage of inhibition was determined according to the formula =  $(1 - A_{\text{Sample } 515}/A_{\text{Control } 515}) \times 100$ , where  $A_{\text{Sample } 515}$  and  $A_{\text{Control } 515}$  represent the absorbance of sample and control, respectively, at 515 nm. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) from 3 replicated measurements.

**2.4. Animals.** Rats Fischer 344 (F344) were used. The animals were kindly supplied by Dr. Enio Cardillo Vieira, Gnotobiology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, ICB, Brazil. Some of these animals were maintained in our laboratory (Bioterium of Experimental Nutrition Laboratory, School of Nutrition, Federal University of Ouro Preto, MG, Brazil) for many generations. Nine-week-old female rats weighing  $140 \pm 2$  g were used in this study. The animals were individually housed in wire-bottomed cages and maintained in a room with controlled conditions ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 55% humidity, and 12 h light/dark cycles), and food and filtered water were provided *ad libitum* for 8 weeks. All animal procedures were approved by the Ethics Committee

in Animal Research of the UFOP (Protocol number 2012/17).

**2.5. Experimental Design and Diets.** The animals were weighed one by one and placed in individual cages. After weighing 32 rats, mean weight was calculated, and if the difference between the average weights was  $\leq 2$  g, the experiment was started. The rats ( $n = 32$ ) were divided into 2 experimental groups of sixteen animals each. The first group served as the control (C) and received a standard AIN-93M diet [47]. The second group (HF) received a high-fat diet (containing 25% soy oil and 1% cholesterol) [19, 48]. After two weeks, the C group rats were subdivided into C and CA experimental groups with eight animals each, balanced for weight; and the HF group were subdivided into HF and HFA experimental groups with eight animals each, balanced for weight. The C and CA groups received the same standard diet, and H and HFA groups received the same HF diet. The CA and HFA groups were treated with filtered açai pulp, administered as a single dose (2 g/day) via gavage during the light phase for 6 weeks. The dose of açai used in this study mimics the consumption of a portion of this fruit in the human diet and corresponds to adding 2% of açai pulp to rat diet considering the rat daily average intake, as per previous studies [19, 38]. This dose had already been shown to have beneficial effects in experimental models [19, 36, 38, 49]. The C and HF groups received equal volumes of distilled water. The experimental diets were prepared in the Laboratory of Experimental Nutrition, School of Nutrition, Federal University of Ouro Preto, MG, Brazil, from semipurified ingredients and stored at 4°C. The compositions of the diets are described in Table 1.

**2.6. Sample Preparation.** At the end of the experimental period, the rats were fasted for 12 hours, anesthetized with isoflurane, and euthanized by total blood collection from adjacent vessels to the brachial plexus. Blood samples were collected in polypropylene tubes and centrifuged at  $3000 \times g$  for 15 min.

Afterwards, the serum was removed and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The liver was collected, washed in saline, and weighed. The small hepatic lobe was stored in buffered formalin for histopathological analysis and the rest of the liver was submerged in liquid nitrogen and immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent analysis.

**2.7. Serum Biochemical Analysis.** Serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured enzymatically using kits from Labtest.

**2.8. Measurement of Ox-LDL.** Ox-LDL levels were measured in a 96-well plate by a sandwich ELISA method using a kit from Elabscience. For the assay, 100  $\mu\text{L}$  of standard and diluted serum was added to wells that were coated with antibodies before incubation at 37°C for 90 min. The residual antigens that did not bind with antibodies were washed away. After that, biotin-antibodies were added into each well and incubated at 37°C for 1 h. The fluid in the wells was aspirated

TABLE I: Composition of the experimental diets (g/kg diet).

Nutrients	Diets	
	Standard diet (AIN-93M)	High-fat diet
Casein	140.0	140.0
Corn starch	622.5	402.5
Soybean oil	40.0	250.0
Cholesterol	—	10.0
Choline	2.5	2.5
Mineral mixture <sup>a</sup>	35.0	35.0
Vitamins mixture <sup>b</sup>	10.0	10.0
Cellulose	50.0	50.0
Saccharose	100.0	100.0
Energy content (kcal/kg) <sup>c</sup>	3810	4820

<sup>a</sup>Mineral and <sup>b</sup>vitamins mixture as recommended by the AIN-93M rodent diet.

<sup>c</sup>Conversion factors: protein, 4 kcal/g; fat, 9 kcal/g; sugars, 4 kcal/g.

and the wells were washed three times. Next, 100  $\mu$ L HRP-avidin was added into each well and incubated at 37°C for 30 min. The aspiration step was repeated and the wells were washed again five times. TMB substrate (90  $\mu$ L) was added to each well and then incubated at 37°C for 15 min protected from light. To stop the reaction, 50  $\mu$ L of stop solution was added and absorbance was read immediately at 450 nm.

**2.9. Determination of Liver Lipids Levels.** Hepatic lipids were extracted from liver tissue using a chloroform/MeOH solution (2:1, v/v), as described by Folch et al. [50]. The content of total lipids in the liver was quantified gravimetrically by evaporation of the solvents and dissolution of the dried lipids in 1 mL isopropanol. Triacylglycerols (TG) in this solution were determined using a kit from Labtest.

**2.10. Liver Lipid Peroxidation.** Lipid peroxidation was assessed by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay described by Buege and Aust [51]. Liver tissues (100 mg) were homogenized in Tris/HCl buffer (20 mM) and kept on ice. Homogenate (500  $\mu$ L) was transferred to tubes, mixed with 250  $\mu$ L of TCA (28% w/v in HCl 0.25 N), 250  $\mu$ L of TBA (1% acetic acid 0.25 N), and 125  $\mu$ L of BHT (125 mM in ethanol), and vortexed. The tubes were heated at 95°C for 15 min and placed in an ice bath and, after the addition of 0.6 mL butanol, centrifuged at 10 000  $\times$ g for 10 min at 4°C. The top phase of each solution was transferred to a 96-well plate and the absorbance was measured at 535 nm. The concentration of TBARS was calculated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. The concentration of total protein in the sample was determined by the Lowry assay [52]. Results are expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mg protein.

**2.11. Histological Examination.** Liver tissue fragments were fixed in 10% buffered formalin for 72 h, after which the fragments were dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Tissue sections (4  $\mu$ m) were cut with a microtome (Leica, Germany) and mounted on microscope slides. The slides

were then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and photographed at 400x magnification (Leica Application Suite, Germany). Liver histology was examined using 15 images obtained at random from the tissue and classified for the degree of macrovesicular steatosis. Ten low-power fields were examined in each of the images and the degree of lipid infiltration was graded with a semiquantitative score reflecting the percentage of hepatocytes containing lipid droplets. Steatosis scores of <33% of cells, 33–66% of cells, and >66% of cells were classified as grade I, grade II, and grade III, respectively [53].

**2.12. Preparation of Microsomal Fractions.** Microsomal fractions were prepared by a modification of the method of Bayrak et al. [54]. Frozen livers were homogenized in (1:4, w/v) ice-cold 5 mM Tris/HCl (pH 7.4) buffer containing 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10% glycerol, 10 mM NaCl, and 5  $\mu$ L/mL protease inhibitor cocktail. Fractionation of the sample was performed according to Cox and Emili [55] with modifications. The homogenate was centrifuged at 800  $\times$ g for 15 min at 4°C for nuclei removal, followed by centrifugation of supernatant at 6000  $\times$ g for 20 min at 4°C for separation of the mitochondrial pellet. The pellet was discarded and the ultracentrifugation of the supernatant was performed at 80 000  $\times$ g for 1 h at 4°C. The resulting microsomal pellet was resuspended in 9 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0) containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Solubilization of microsomal membranes was achieved by the addition of Triton X-100 at a final concentration of 0.1% and gentle stirring of the sample for 40 min. Subsequently, the sample was kept on ice for 30 min and recentrifuged at 80 000  $\times$ g for 1 h at 4°C, after which the supernatants were collected. The concentration of total protein in the fractions was determined by the Lowry assay [52].

**2.13. Serum and Liver PON1 Activity Measurement.** Serum and liver PON1 enzyme activity was measured as described by Beltowski et al. [56], with phenyl acetate as the substrate in an aliquot of serum or the microsomal suspension from the liver based on the initial rate of substrate hydrolysis to phenol, whose absorbance was monitored at 270 nm. The assay mixture contained 5  $\mu$ L of serum (diluted 1:3) or microsomal suspension in 2.5 mL of 9 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0) containing 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM phenyl acetate. The results were calculated assuming the molar extinction coefficient of phenyl acetate to be 1310 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. The values were expressed in units per milliliter of serum or per gram equivalent of liver microsomes, where 1 U of arylesterase hydrolyzes 1 mmol of phenyl acetate per minute.

**2.14. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay.** Total RNA was extracted from liver samples using the RNeasy Total RNA Isolation System according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 2  $\mu$ g of total RNA with random primers using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit



and following the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix reagent.

The sequences of oligonucleotide primers for PCR included 18S rRNA: 5'-GTAAGTGC GGTCATAAG-3' (forward); 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3' (reverse); PON1: 5'-AAGCTGGCTACACCCACATC-3' (forward); 5'-CAACATTCGTTGGTGAGCGG-3' (reverse); PON2: 5'-TCTTCAGGCGACATCTGGG-3' (forward); 5'-TCTGACGAGGGATGGTT-3' (reverse); PON3: 5'-AAGCTT-TGCACCAGACAAGC-3' (forward); 5'-GTCCTGGTC-GAACCCATCAC-3' (reverse); APOA-1: 5'-TTGGTCGCC-TACAGGAACAG-3' (forward); 5'-TGGAATTCATCC-AGGTGGGG-3' (reverse); AHR: 5'-GCCAATACGCAC-CAAAAGCA-3' (forward); 5'-TCGTCTGTTGGATC-AAGGC-3' (reverse); SREBP-2: 5'-AGCTGGCAAATC-AGAAAAACAAG-3' (forward); 5'-GATTAAGTCTT-CAATCTTCAAGTCCAC-3' (reverse). The PCR conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s (denaturation), and 60°C for 1 min (primer annealing and product extension). The specificity of the products obtained was confirmed by analysis of the amplified product dissociation curves. The data obtained were analyzed using the comparative Cq method. Target gene expression was determined relative to the expression of the endogenous 18S ribosomal RNA gene. All analyses were performed in triplicate.

**2.15. Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.00 version for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). The normality of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post hoc* test or the Kruskal-Wallis test and the Dunn posttest (for parametric and nonparametric data, resp.). Results were considered statistically significant for *p* values < 0.05. All data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) or as medians and interquartile ranges. Correlations were calculated using Pearson's and Spearman's correlation coefficients to measure the degree to which two variables were related.

### 3. Results

**3.1. Polyphenols and In Vitro Antioxidant Capacity of Açai.** The total polyphenol and total monomeric anthocyanin content of filtered açai pulp were 458.6 mg GAE/100 g and 13.59 mg/100 g, respectively. The ability of three different concentrations of filtered açai pulp (20, 40, and 100 mg/mL) to neutralize the DPPH radical was determined. As presented in Table 2, the filtered pulp displays increasing *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner. All the concentrations tested showed a high neutralization capacity, similar to the standard antioxidant Trolox in the range of 100 to 700 µM/L.

**3.2. Effect of Açai on Liver Injury and Hepatic Steatosis.** At the end of the experimental period, rats fed an HF diet

TABLE 2: Phytochemicals and antioxidant capacity of filtered açai pulp.

Compounds	Concentration	% of inhibition
Total phenolic (mg GAE/100 g)	458.60 ± 4.20	—
Total anthocyanins (mg/100 g)	13.59 ± 0.19	—
<i>DPPH radical-scavenging activity</i>		
<i>Filtered açai pulp</i>		
100 mg/mL	—	82.68 ± 0.23
40 mg/mL	—	54.67 ± 1.09
20 mg/mL	—	32.23 ± 0.34
<i>Trolox<sup>a</sup></i>		
700 µM/L	—	50.9
300 µM/L	—	21.23
100 µM/L	—	9.64

<sup>a</sup>TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity. DPPH values of AAE are expressed as mean ± SEM and Trolox values are expressed as mean. Total phenolics are expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of filtered açai pulp.

exhibited an increase in the activity of serum enzymes ALT and AST (*p* < 0.001 and *p* < 0.05, resp.) (Table 3). Furthermore, liver histology showed increased lipid deposition in the livers of the HF rats (Figure 1(c)), characterized by accentuated micro- and macrovesicular fat droplets. In the same group, infiltration of inflammatory cells into the liver can be seen. Hepatocytes abnormalities were not observed in the C group and CA group (Figures 1(a) and 1(b), resp.). Animals belonging to the HF group also had a higher steatosis score (*p* < 0.001) compared to those belonging to the C group (Figure 1(h)). Açai pulp administration promoted a 30% reduction in the serum ALT activity in HFA rats compared to that in HF group (*p* < 0.05) (Table 3). Indeed, açai pulp treatment relieved hepatic steatosis, as evidenced by the occurrence of mild steatosis, lower steatosis score, and less lipid-loaded hepatocytes in HFA rats (Figures 1(d) and 1(h)) compared to that in HF group (Figures 1(c) and 1(h)).

The HF and HFA groups also showed significantly higher liver weight, which was consistent with the significant increase of liver total fat and TG content in the same groups as compared to control groups (*p* < 0.001) (Figures 1(e), 1(f), and 1(g)). Livers from animals fed an HF diet and treated with açai pulp had 13.89% lower total fat and 24.45% lower TG content compared to those of animals fed the HF diet alone (Figures 1(f) and 1(g)).

**3.3. Effect of Açai on Serum LDL Oxidation and Liver Lipid Peroxidation.** As shown in Figure 2, HF group showed significantly increased serum ox-LDL concentration compared to C group (*p* < 0.05). Administration of açai pulp for 6 weeks promoted a 39% reduction in the ox-LDL levels in the HFA group in comparison with the HF group (*p* < 0.01).

Additionally, to estimate the extent of lipid peroxidation in the liver, TBARS were determined. Compared to control animals, HF rats showed a 1.4-fold increase in TBARS levels (*p* < 0.05). No statistical difference was found between the HF and HFA animals; however, the HFA group was not different to the control group (Table 3).



TABLE 3: Effect of filtered açai pulp on biomarker of oxidative stress in the liver and hepatic injury markers in rats fed either with control or high-fat diets.

Parameter	Experimental groups			
	C	CA	HF	HFA
TBARS (nmol MDA/mg protein)	0.34 ± 0,017	0.28 ± 0,023	0.48 ± 0,047*	0.36 ± 0,040
ALT (IU)	6.86 ± 1.19	11.02 ± 1.43	23.52 ± 1.92***	16.57 ± 1.78*#
AST (IU)	18.33 ± 1.19	17.63 ± 1.53	25.03 ± 1.84*	20.7 ± 1.05

TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances. Values are expressed as means ± SEM ( $n = 8$ ). \*Significant at  $p < 0.05$  with respect to control group. \*\*\*Significant at  $p < 0.001$  with respect to control group. #Significant at  $p < 0.05$  with respect to High-fat group.

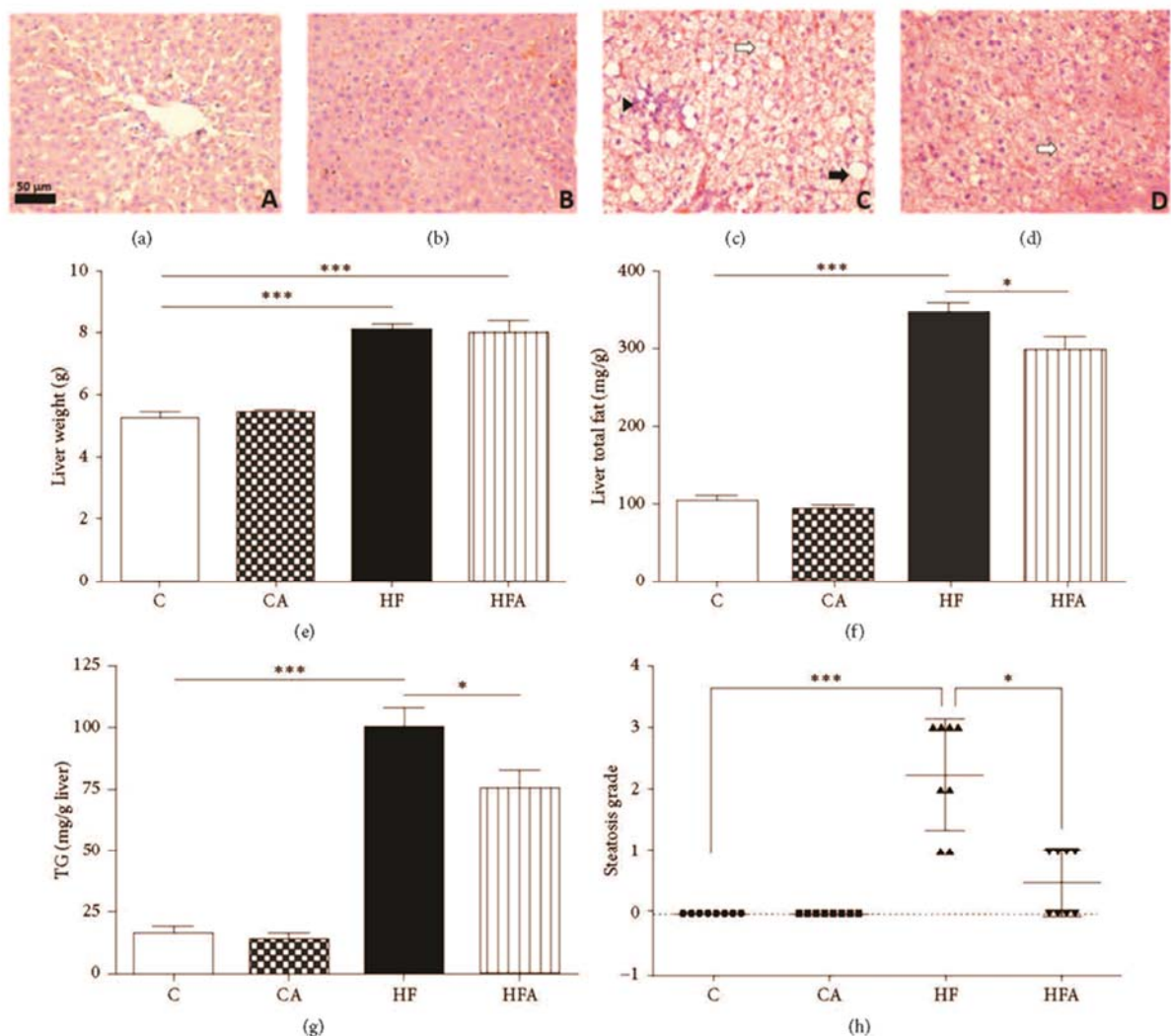


FIGURE 1: Hematoxylin and eosin staining of representative sections of livers from rats fed a control or high-fat diet treated with açai pulp. Hepatocytes abnormalities were not observed in the C group (a) and CA group (b). Severe hepatic steatosis was observed in the HF group (c) with the presence of macro- and microvesicular steatosis and inflammatory infiltrate. Steatosis and fat accumulation were reduced in the HFA group (d). Macrovesicular injury is indicated by the black arrow, microvesicular injury by white arrows, and inflammatory infiltrate by the black arrowhead. Images were photographed at 400x magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . Liver weight (e), liver total fat (f), hepatic triacylglycerol content (g), and grade of liver steatosis (h) of rats fed with control or high-fat diet treated with açai. Data in (e), (f), and (g) were represented as mean ± SEM ( $n = 8$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  by ANOVA test followed Tukey's posttest. Data in (h) were represented as median and interquartile range ( $n = 8$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's posttest.

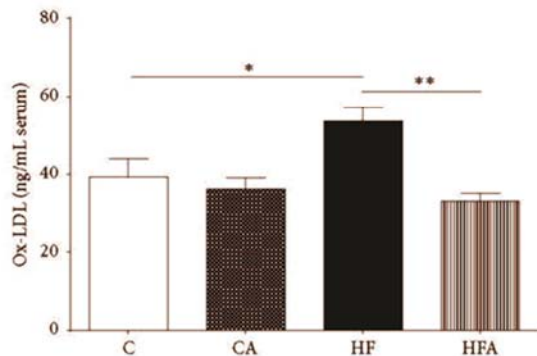


FIGURE 2: Oxidized LDL levels in serum of rats fed a control or high-fat diet treated with açai pulp. Values were expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by ANOVA test followed Tukey's posttest.

**3.4. Effect of Açai on Expression of PON Isoforms mRNA and Genes Related to PON1 Regulation in the Liver.** As shown in Figure 3(a), the HFA group exhibited approximately 1.5-fold increase in the expression of PON1 mRNA in comparison with the HF group ( $p < 0.01$ ). Moreover, in HFA animals, there was a trend toward increased liver PON3 mRNA expression compared to the HF group, although it was not significant. There was no difference in the expression of PON2 mRNA among the experimental groups.

Concerning the expression of APOA-1, AHR, and SREBP-2 mRNA (PON1 regulation-related genes), a significant increase in the hepatic mRNA expression of APOA-1 in HFA rats occurred, compared to that in HF rats ( $p < 0.05$ ) (Figure 3(b)). Animals fed the HF diet presented a decrease in SREBP-2 mRNA expression compared to control animals ( $p < 0.01$ ). The expression of SREBP-2 was not affected by açai treatment. No significant changes in the expression of AHR mRNA were found among the experimental groups (Figure 3(b)).

**3.5. Effect of Açai on Serum and Hepatic PON1 Activity.** As shown in Figures 4(a) and 4(b), both serum and hepatic arylesterase activity of PON1 were significantly lower in the HF group than in both control groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , resp.). Administration of açai pulp for 6 weeks promoted a 34% increase in the arylesterase activity of PON1 in serum and a 52% increase in the arylesterase of PON1 activity in the liver of HFA rats compared to that in HF rats ( $p < 0.05$ ).

**3.6. Relationship between Serum and Hepatic PON1 Activity and Liver Disease Variables.** Pooling the data from all groups, we found a negative correlation between serum PON1 and ALT and AST activities ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.0001$  and  $r = -0.49$ ,  $p < 0.001$ , resp.) (Figures 5(a) and 5(b)). Moreover, hepatic PON1 activity was negatively correlated with the amount of total fat extracted from the liver ( $r = -0.48$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5(c)) and serum PON1 activity was negatively correlated with the degree of steatosis ( $r = -0.60$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 5(d)).

## 4. Discussion

In this study, we examined the effects of filtered açai pulp on the progression of high-fat diet-induced fatty liver in rats. We provide evidence that the treatment with açai pulp, a source of polyphenols, prevents LDL oxidation by increasing serum and hepatic PON1 activity and mRNA expression. The treatment with açai also alleviated the severity of hepatic steatosis in rats fed a high-fat diet. Moreover, in the same animals, we observed a treatment effect on the increased ApoA-I mRNA expression levels.

Açai contains various bioactive secondary metabolites, mostly phenolic acids and flavonoids, which have been identified as potential antioxidants [57, 58]. As expected, our filtered açai pulp contained high levels of total phenolic compounds and total monomeric anthocyanins, which probably explain its high antioxidant capacity, as suggested elsewhere [59–61]. In addition to polyphenols, other nutrient fractions in açai pulp may exert beneficial biological effects. Among the constituents of açai pulp are very high amounts of fiber [34]. Although the amount of fiber was reduced in our filtered açai pulp, it was comparable to the açai pulp ingested by humans in another study [62]. Many of the health benefits ascribed to fiber are a consequence of fermentation by colonic microbiota and the secondary metabolites that are produced. There is mounting evidence that these metabolites may play a key role in the prevention and management of diseases [63].

Several studies have connected decreased PON1 activity with hepatic injury, including NAFLD [24, 64, 65]. PON1 is known to attenuate oxidative stress, which is augmented during steatosis progression [13, 66]. Our results show that rats fed a high-fat diet developed hepatic steatosis, evidenced by intense TG accumulation and micro- and macrovesicular fat droplets. In addition, the HF rats had increased oxidation of LDL in serum and TBARS levels in liver. The HF rats also showed reduced serum and liver PON1 activity. These findings corroborate with García-Heredia et al. [25] that showed that PON-deficient mice fed a high-fat high-cholesterol diet presented significant alterations in liver tissues, such as increased hepatic steatosis and the expression of makers of oxidative stress and inflammation.

There is a growing body of evidence that oxidized LDL (ox-LDL) may play a role in the pathophysiology of NAFLD. LDL oxidation is a well-known event in the development of atherosclerosis [67] and NAFLD has many features in common with cardiovascular diseases, including lipid accumulation, macrophage activation and infiltration, and inflammation. Recent animal studies have suggested that dietary cholesterol is a critical factor in induction of NAFLD and showed that *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice are more vulnerable to cholesterol-induced NAFLD than wild-type mice [68, 69]. One proposed theory points to an intrinsic defective mechanism of lipid traffic within the Kupffer cells, the resident liver macrophages. The activation of Kupffer cells by ox-LDL leads to a rapid release of various inflammatory mediators and signaling molecules such as cytokines, ROS, proteases, and lipid mediators and contributes to hepatic inflammation [70]. Similar to the formation of foam cells in atherosclerosis, hyperlipidemic mice showed hypertrophy of Kupffer cells, which was



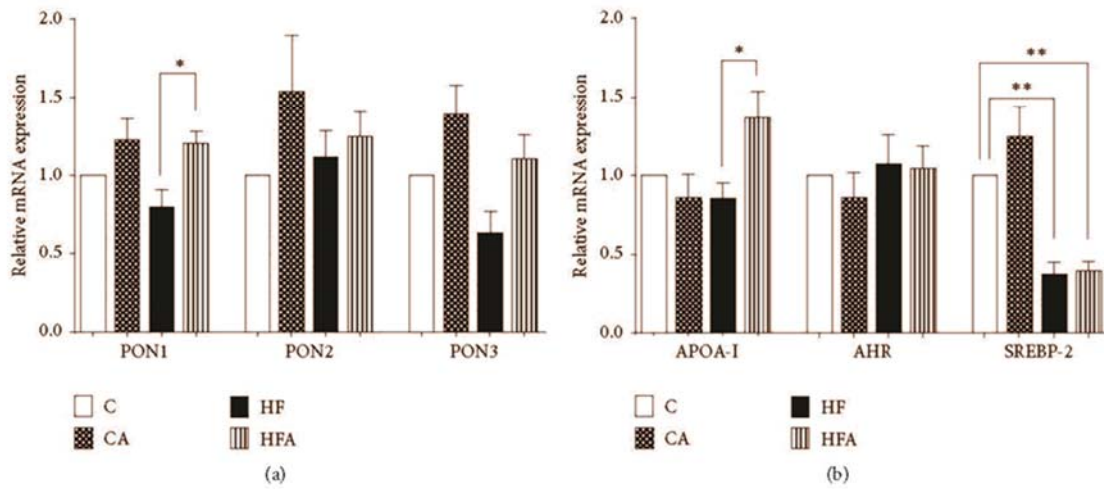


FIGURE 3: Relative expression of mRNA of genes of three isoforms of the enzyme paraoxonase PON1, PON2, and PON3 (a) and of genes APOA-1, AHR, and SREBP-2 (b) in rats fed a control or high-fat diet treated with açai pulp. Values are relative to the expression level of the 18S rRNA gene and were normalized by the control group. Values were expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by ANOVA test followed Tukey's posttest.

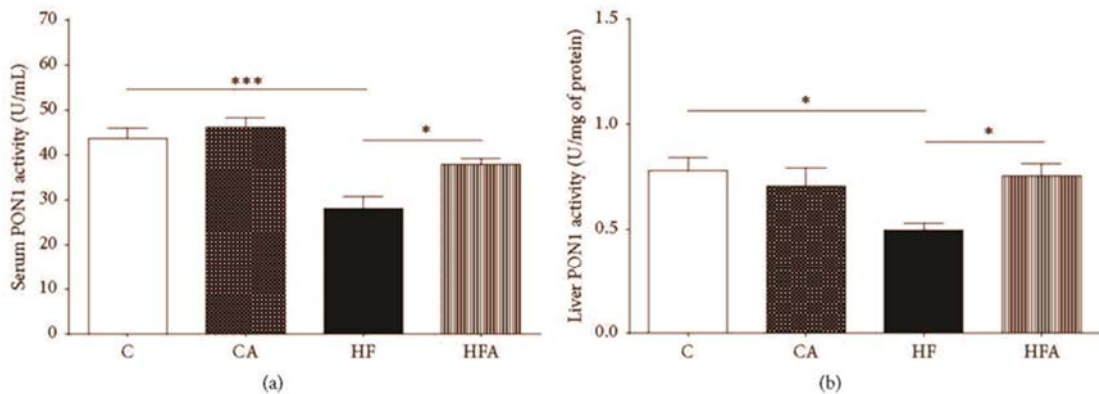


FIGURE 4: PON1 arylesterase activity in serum (a) and liver (b) of rats fed a control or high-fat diet treated with açai pulp. Values were expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  by ANOVA test followed Tukey's posttest.

correlated with liver inflammation in NAFLD [71]. In the present study, we demonstrated that filtered açai pulp protected LDL against oxidation and at the same time upregulated PON1 activity. Based on these findings, we propose that açai has a role in the regulation of PON1 activity and expression, which reduces the production and accumulation of lipoperoxides in LDL, leading to improvement of hepatic steatosis.

Dietary polyphenols such as those found in açai may play an important role in improving the antioxidant status, since they neutralize oxygen-reactive species (ROS), act as chelators of metal ions, and modulate the activity of enzymes, including PON [72–74]. A recent study involving women showed that the daily intake of 200 g of açai pulp for four weeks improved the antioxidant status by increasing the

activity of the enzyme catalase and total antioxidant capacity (TAC) in polymorphonuclear (PMN) cells and decreasing the production of ROS [62]. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin found in grapes and wine, was shown to increase PON1 activity levels in 24-month-old obese rats [75] and to increase PON1 gene expression in human hepatocyte primary cultures and in HuH7 cells [32]. Although isolated compounds have been explored as a potential nutritional therapy for a large number of diseases, our findings demonstrate that the açai pulp possesses important biological effects: improving the antioxidant status and alleviating NAFLD. Açai pulp may produce more pronounced effects than a single isolated compound, as crude extracts can exert additive and synergistic effects attributed to the complex mixture of phytochemicals [76].

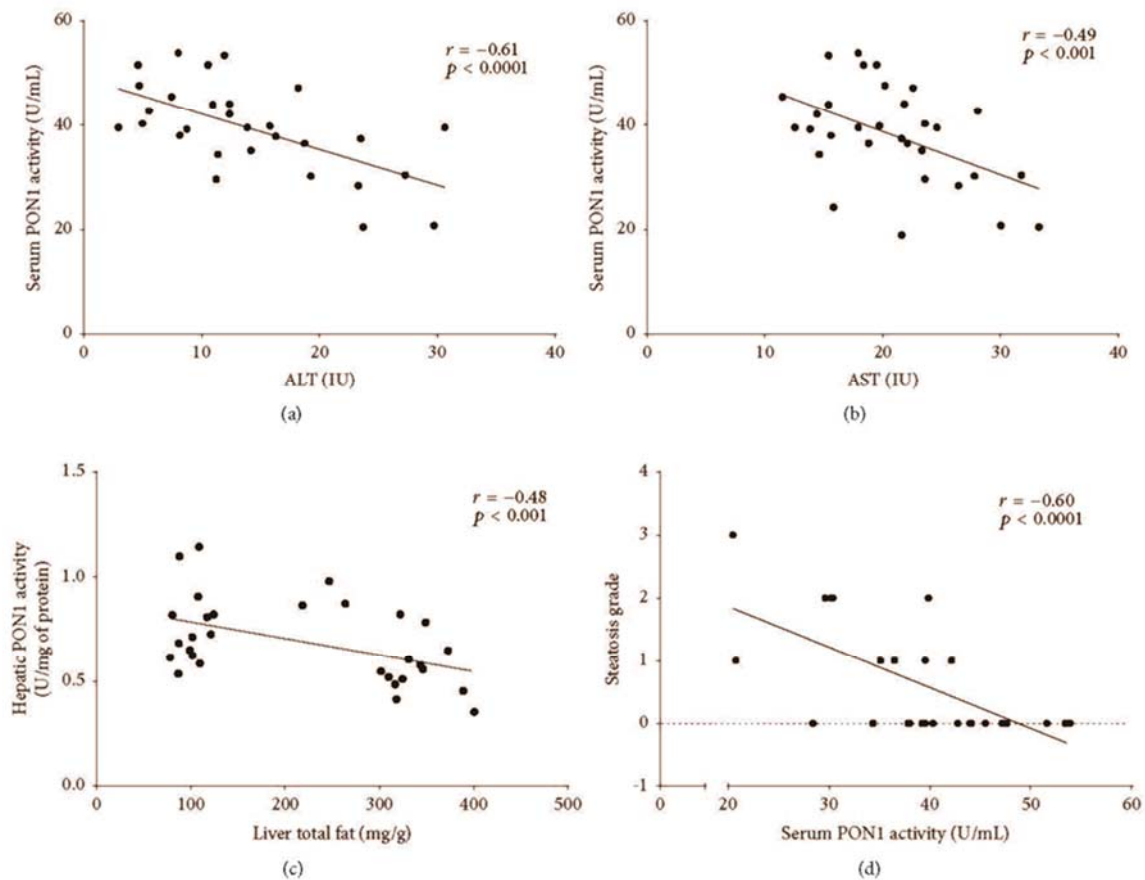


FIGURE 5: Correlation between serum and hepatic PON activities and variables in the rat nonalcoholic fatty liver disease experimental model: (a) correlation between serum PON1 and ALT activities; (b) correlation between serum PON1 and AST activities; (c) correlation between hepatic PON1 activity and total liver fat; (d) correlation between serum PON1 activity and the grade of steatosis.

Our group has previously shown that dietary açai pulp modulates gene expression of hepatic enzymes in diabetic rats and increases serum activity of PON1 in a hypercholesterolemic rat model [19, 36]. However, that study did not assess the expression of PON isoforms. In mice, Guerra et al. [40] demonstrated that administration of açai extract reduced hepatic steatosis by modulation of pathways related to hepatic lipid metabolism but did not evaluate possible effects on antioxidant enzymes.

In this study, we demonstrated that açai treatment increased serum and hepatic PON1 activity and PON1 mRNA expression. We did not find a significant treatment effect on the expression of other isoforms of PON. At the same time, we observed that açai treatment of rats fed with an HF diet protected against liver damage and reduced liver TG content, serum ALT enzyme activity, and the degree of steatosis, as confirmed by the decline in the number of macrovesicular vacuoles. We also found a negative correlation between serum PON1 activity and progression of steatosis in rats receiving açai pulp. Our results corroborate the report of Guerra et al.

[40] and therefore strengthen the hypothesis that açai acts by retarding oxidative stress-associated liver damage induced by HF diet.

Factors known to influence PON1 activity and/or concentration include PON1 interaction with oxidized lipids and/or other oxidants [77, 78]. Other mechanisms by which polyphenols affect PON1 activity may be present. Studies have reported upregulation of hepatocyte PON1 mRNA expression and activity by polyphenols in an aryl hydrocarbon receptor (AhR-) dependent manner via activation of a xenobiotic responsive element-like sequence [32, 79]. In addition, the sequence in the PON promoter region containing the binding site for the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) has also been shown to be a target for upregulation of PON1 [80]. In our study, açai treatment did not change the gene expression levels of AHR. In addition, we demonstrated that rats fed with an HF diet exhibited a lower expression of SREBP-2 and that açai treatment did not restore these levels. These findings do not support the hypothesis that açai can activate the PON



transcription via activation of these pathways. More investigation of the targets of these pathways may help elucidate the mechanisms by which açai regulates PON1 expression and activity.

As known, the PON1 enzyme serum levels are strongly associated with apolipoprotein A-I (ApoA-I) in HDL. ApoA-I is synthesized in the liver and to a lesser extent in the intestine [81]. The role of ApoA-I and PON1 in inhibition of atherosclerosis has been reported [82]. In this study, we found that açai pulp treatment upregulated the expression of ApoA-I mRNA. Moore et al. [83] showed that ApoA-I deficiency provoked a reduction in PON1 activity and did not alter the levels of HDL in C57BL/6 ApoA-I<sup>-/-</sup> mice. Moreover, it was demonstrated that C57BL/6 ApoA-I<sup>-/-</sup> mice developed NAFLD, suggesting that ApoA-I can be an important modulator of processes associated with deposition of lipids in the liver and development of diet-induced NAFLD. Our findings reinforce the notion of antiatherogenic effects of açai, as suggested elsewhere [84].

In summary, previous studies and the results presented here suggest that the hepatoprotective role of açai in the development of NAFLD is partly mediated by PON1, an antioxidant enzyme also involved in diseases such as hypercholesterolemia [19], atherogenesis [11], and neurological disorders [85]. In the context of the increased interest in and demand for açai in recent years, attributable to evidence that its use is associated with several beneficial health effects, the present study adds to our current understanding of the biological effects of açai on NAFLD.

## 5. Conclusion

Our data reveal that dietary açai improves response to oxidative stress by upregulating PON1 and prevents LDL oxidation, exerting a protective role in the progression of NAFLD. These findings indicate that açai is suitable as a potential nutritional therapy and can possibly be of benefit in prevention of diseases such as NAFLD and atherosclerosis. This study provides new perspectives for the understanding of the antioxidant effect of this fruit. Future epidemiological studies aimed at populations in regions that consume significant amounts of açai pulp in their diet should be undertaken to determine if these populations show a lower incidence of NAFLD, NASH, or end-stage liver disease.

## Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG Foundation (Research Support Foundation of Minas Gerais State), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), and Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil.

## References

- [1] G. Vernon, A. Baranova, and Z. M. Younossi, "Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 34, no. 3, pp. 274–285, 2011.
- [2] P. Wainwright and C. Byrne, "Bidirectional relationships and disconnects between NAFLD and features of the metabolic syndrome," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 3, p. 367, 2016.
- [3] J. D. Browning and J. D. Horton, "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 2, pp. 147–152, 2004.
- [4] C. P. Day and O. F. W. James, "Steatohepatitis: a tale of two 'hits'?" *Gastroenterology*, vol. 114, no. 4 I, pp. 842–845, 1998.
- [5] A. P. Rolo, J. S. Teodoro, and C. M. Palmeira, "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 1, pp. 59–69, 2012.
- [6] J. Camps, J. Marsillach, and J. Joven, "The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 46, no. 2, pp. 83–106, 2009.
- [7] L.-P. Précourt, D. Amre, M.-C. Denis et al., "The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation," *Atherosclerosis*, vol. 214, no. 1, pp. 20–36, 2011.
- [8] B. N. La Du, "Structural and functional diversity of paraoxonases," *Nature Medicine*, vol. 2, no. 11, pp. 1186–1187, 1996.
- [9] E. Y. Sözmen, B. Sözmen, F. K. Girgin et al., "Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low-density lipoprotein from oxidation," *Clinical and Experimental Medicine*, vol. 1, no. 4, pp. 195–199, 2001.
- [10] D. I. Draganov, P. L. Stetson, C. E. Watson, S. S. Billecke, and B. N. La Du, "Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 43, pp. 33435–33442, 2000.
- [11] M. I. Mackness, S. Arrol, and P. N. Durrington, "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein," *FEBS Letters*, vol. 286, no. 1–2, pp. 152–154, 1991.
- [12] M. I. Mackness, S. Arrol, C. Abbott, and P. N. Durrington, "Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase," *Atherosclerosis*, vol. 104, no. 1–2, pp. 129–135, 1993.
- [13] N. Ferré, J. Camps, E. Prats et al., "Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage," *Clinical Chemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 261–268, 2002.
- [14] S. T. Reddy, D. J. Wadleigh, V. Grijalva et al., "Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 542–547, 2001.
- [15] C. J. Ng, D. J. Wadleigh, A. Gangopadhyay et al., "Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 48, pp. 44444–44449, 2001.
- [16] D. M. Shih, L. Gu, Y.-R. Xia et al., "Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis," *Nature*, vol. 394, no. 6690, pp. 284–287, 1998.
- [17] M. Boemi, I. Leviev, C. Sirolla, C. Pieri, M. Marra, and R. W. James, "Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients

- compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation," *Atherosclerosis*, vol. 155, no. 1, pp. 229–235, 2001.
- [18] A. Gugliucci, K. Kotani, and S. Kimura, "Paraoxonase 1 in chronic kidney failure," *Journal of Lipids*, vol. 2012, Article ID 726048, 10 pages, 2012.
- [19] M. O. de Souza, M. Silva, R. de Paula Oliveira, and M. L. Pedrosa, "Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats," *Nutrition*, vol. 26, no. 7-8, pp. 804–810, 2010.
- [20] P. M. Erlich, K. L. Lunetta, L. A. Cupples et al., "Serum paraoxonase activity is associated with variants in the PON gene cluster and risk of Alzheimer disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 33, no. 5, pp. 1015.e7–1015.e23, 2012.
- [21] N. Ferré, J. Marsillach, J. Camps et al., "Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases," *Journal of Hepatology*, vol. 45, no. 1, pp. 51–59, 2006.
- [22] K. G. Abdel-Wahhab, H. Fawzi, and F. A. Mannaa, "Paraoxonase-1 (PON1) inhibition by tienilic acid produces hepatic injury: antioxidant protection by fennel extract and whey protein concentrate," *Pathophysiology*, vol. 23, no. 1, pp. 19–25, 2016.
- [23] V. Kedage, M. S. Muttigi, M. S. Shetty et al., "Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders," *Saudi Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 2, pp. 79–83, 2010.
- [24] S. S. Kilic, S. Aydin, N. Kilic, F. Erman, S. Aydin, and İ. Celik, "Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 11, no. 46, pp. 7351–7354, 2005.
- [25] A. García-Heredia, E. Kensicki, R. P. Mohny et al., "Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach," *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 4, pp. 1946–1955, 2013.
- [26] M. Gong, M. Garige, R. Varatharajalu et al., "Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 379, no. 4, pp. 1001–1004, 2009.
- [27] R. Varatharajalu, M. Garige, L. C. Leckey, K. Reyes-Gordillo, R. Shah, and M. R. Lakshman, "Protective role of dietary curcumin in the prevention of the oxidative stress induced by chronic alcohol with respect to hepatic injury and antiatherogenic markers," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 5017460, 10 pages, 2016.
- [28] L. Ding, J. Li, B. Song et al., "Curcumin rescues high fat diet-induced obesity and insulin sensitivity in mice through regulating SREBP pathway," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 304, pp. 99–109, 2016.
- [29] P. R. B. de Oliveira, C. A. da Costa, G. F. de Bem et al., "Euterpe oleracea mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 12, Article ID e0143721, 2015.
- [30] J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 109, no. 9, pp. 1125–1131, 2002.
- [31] M. Garige, M. Gong, R. Varatharajalu, and M. R. Lakshman, "Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression via sterol regulatory element binding protein 2 that translocates from the endoplasmic reticulum to the nucleus where it specifically interacts with sterol responsive element-like sequence in paraoxonase 1 promoter in HuH7 liver cells," *Metabolism*, vol. 59, no. 9, pp. 1372–1378, 2010.
- [32] C. Gouédard, R. Barouki, and Y. Morel, "Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 12, pp. 5209–5222, 2004.
- [33] D. Litvinov, H. Mahini, and M. Garelnabi, "Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases," *North American Journal of Medical Sciences*, vol. 4, no. 11, pp. 523–532, 2012.
- [34] A. G. Schauss, X. Wu, R. L. Prior et al., "Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8604–8610, 2006.
- [35] W. Marcason, "What is the açai berry and are there health benefits?" *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 109, no. 11, p. 1968, 2009.
- [36] J. F. C. Guerra, C. L. B. Magalhães, D. C. Costa, M. E. Silva, and M. L. Pedrosa, "Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 49, no. 3, pp. 188–194, 2011.
- [37] L. F. Bonomo, D. N. Silva, P. F. Boasquivis et al., "Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e89933, 2014.
- [38] M. O. de Souza, L. Souza e Silva, C. L. Brito Magalhães et al., "The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat," *Nutrition Research*, vol. 32, no. 12, pp. 976–984, 2012.
- [39] C. Xie, J. Kang, R. Burris et al., "Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities," *Atherosclerosis*, vol. 216, no. 2, pp. 327–333, 2011.
- [40] J. F. C. Guerra, P. S. Maciel, I. C. M. E. Abreu et al., "Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice," *Journal of Functional Foods*, vol. 14, pp. 192–202, 2015.
- [41] S. Morán-Ramos, A. Avila-Nava, A. R. Tovar, J. Pedraza-Chaverri, P. López-Romero, and N. Torres, "Opuntia ficus indica (Nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats," *The Journal of Nutrition*, vol. 142, no. 11, pp. 1956–1963, 2012.
- [42] H. William, *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, 1970.
- [43] P. V. Soest, "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds," *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 46, pp. 825–835, 1963.
- [44] S. Georgé, P. Brat, P. Alter, and M. J. Amiot, "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 5, pp. 1370–1373, 2005.
- [45] M. Giusti and R. E. Wrolstad, "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy," in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, UNIT F1.2, 2001.
- [46] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.



- [47] P. G. Reeves, F. H. Nielsen, and G. C. Fahey Jr., "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," *Journal of Nutrition*, vol. 123, no. 11, pp. 1939–1951, 1993.
- [48] I. C. M. E. Abreu, J. F. C. Guerra, R. R. Pereira et al., "Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 58, no. 3, pp. 251–259, 2014.
- [49] X. Sun, J. Seeberger, T. Alberico et al., "Açaí palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet," *Experimental Gerontology*, vol. 45, no. 3, pp. 243–251, 2010.
- [50] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957.
- [51] J. A. Buege and S. D. Aust, "[30] Microsomal lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 52, pp. 302–310, 1978.
- [52] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [53] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, and B. R. Bacon, "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions," *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 94, no. 9, pp. 2467–2474, 1999.
- [54] T. Bayrak, A. Bayrak, E. Demirpençe, and K. Kılınc, "Purification and kinetic properties of rabbit liver paraoxonase 1," *Journal of Chromatography B*, vol. 878, no. 21, pp. 1791–1795, 2010.
- [55] B. Cox and A. Emili, "Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 4, pp. 1872–1878, 2006.
- [56] J. Bełtowski, G. Wójcicka, and A. Jamroz, "Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat," *Polish Journal of Pharmacology*, vol. 54, no. 6, pp. 661–671, 2001.
- [57] A. G. Schauss, X. Wu, R. L. Prior et al., "Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8598–8603, 2006.
- [58] A. Y. Odendaal, A. G. Schauss, R. Watson, V. Reedy, and S. Zibadi, *Potent Antioxidant and Anti-Inflammatory Flavonoids in the Nutrient-Rich Amazonian Palm Fruit, Açaí (Euterpe spp.)*, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2014.
- [59] D. Del Pozo-Insfran, C. H. Brenes, and S. T. Talcott, "Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 6, pp. 1539–1545, 2004.
- [60] G. S. Jensen, X. Wu, K. M. Patterson et al., "In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8326–8333, 2008.
- [61] D. Honzel, S. G. Carter, K. A. Redman, A. G. Schauss, J. R. Endres, and G. S. Jensen, "Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8319–8325, 2008.
- [62] P. O. Barbosa, D. Pala, C. T. Silva et al., "Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women," *Nutrition*, vol. 32, no. 6, pp. 674–680, 2016.
- [63] J. M. W. Wong, R. De Souza, C. W. C. Kendall, A. Emam, and D. J. A. Jenkins, "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 40, no. 3, pp. 235–243, 2006.
- [64] W. Samy and M. A. Hassanian, "Paraoxonase-1 activity, malondialdehyde and glutathione peroxidase in non-alcoholic fatty liver disease and the effect of atorvastatin," *Arab Journal of Gastroenterology*, vol. 12, no. 2, pp. 80–85, 2011.
- [65] B. Ustundag, I. H. Bahcecioglu, K. Sahin et al., "Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 52, no. 8, pp. 2006–2014, 2007.
- [66] M. Aviram, M. Rosenblat, S. Billecke et al., "Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 7–8, pp. 892–904, 1999.
- [67] R. Kato, C. Mori, K. Kitazato et al., "Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 1, pp. 33–39, 2009.
- [68] S. Subramanian, L. Goodspeed, S. Wang et al., "Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice," *Journal of Lipid Research*, vol. 52, no. 9, pp. 1626–1635, 2011.
- [69] V. Bieghs, F. Verheyen, P. J. van Gorp et al., "Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in kupffer cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e34378, 2012.
- [70] S. M. A. Walenbergh, G. H. Koek, V. Bieghs, and R. Shiri-Sverdlov, "Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins," *Journal of Hepatology*, vol. 58, no. 4, pp. 801–810, 2013.
- [71] K. Wouters, P. J. van Gorp, V. Bieghs et al., "Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis," *Hepatology*, vol. 48, no. 2, pp. 474–486, 2008.
- [72] M. Lodovici, F. Guglielmi, C. Casalini, M. Meoni, V. Cheynier, and P. Dolara, "Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine," *European Journal of Nutrition*, vol. 40, no. 2, pp. 74–77, 2001.
- [73] G. P. Jarvik, N. T. Tsai, L. A. McKinstry et al., "Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 8, pp. 1329–1333, 2002.
- [74] W. Rock, M. Rosenblat, R. Miller-Lotan, A. P. Levy, M. Elias, and M. Aviram, "Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8704–8713, 2008.
- [75] A. L. Zagayko, G. B. Kravchenko, O. A. Krasilnikova, and Y. O. Ogai, "Grape polyphenols increase the activity of HDL enzymes in old and obese rats," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 593761, 7 pages, 2013.
- [76] S. Chandra, K. Sah, A. Bagewadi et al., "Additive and synergistic effect of phytochemicals in prevention of oral cancer," *European Journal of General Dentistry*, vol. 1, no. 3, pp. 142–147, 2012.

- [77] M. Aviram, S. Billecke, R. Sorenson et al., "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 18, no. 10, pp. 1617–1624, 1998.
- [78] L. Jaouad, C. Milochevitch, and A. Khalil, "PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity," *Free Radical Research*, vol. 37, no. 1, pp. 77–83, 2003.
- [79] J. Khateeb, A. Gantman, A. J. Kreitenberg, M. Aviram, and B. Fuhrman, "Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR- $\gamma$  pathway," *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 1, pp. 119–125, 2010.
- [80] S. Deakin, I. Leviev, S. Guernier, and R. W. James, "Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, no. 11, pp. 2083–2089, 2003.
- [81] V. M. Bolanos-Garcia and R. N. Miguel, "On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 83, no. 1, pp. 47–68, 2003.
- [82] D. J. Rader, "High-density lipoproteins and atherosclerosis," *American Journal of Cardiology*, vol. 90, no. 8, pp. 62i–70i, 2002.
- [83] R. E. Moore, M. Navab, J. S. Millar et al., "Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation," *Circulation Research*, vol. 97, no. 8, pp. 763–771, 2005.
- [84] C. A. Feio, M. C. Izar, S. S. Ihara et al., "*Euterpe oleracea* (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis," *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 19, no. 3, pp. 237–245, 2012.
- [85] V. P. Androutsopoulos, K. Kanavouras, and A. M. Tsatsakis, "Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 256, no. 3, pp. 418–424, 2011.