



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado



**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA E ESTEATOSE
HEPÁTICA DE ANIMAIS OBESOS TRATADOS COM O
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
*SYZYGIUM CUMINI***

LUCAS MARTINS FRANÇA

São Luís

2018

LUCAS MARTINS FRANÇA

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA E ESTEATOSE
HEPÁTICA DE ANIMAIS OBESOS TRATADOS COM O
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
*SYZYGIUM CUMINI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

França, Lucas Martins.

Mecanismos Moleculares Envolvidos na Reversão da
Hipertrigliceridemia e Esteatose Hepática de Animais
Obesos Tratados com o Extrato Hidroalcoólico das Folhas de
Syzygium cumini / Lucas Martins França. - 2018.
113 f.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2018.

1. Doença hepática gordurosa não-alcoólica. 2.
Estresse do retículo endoplasmático. 3.
Hipertrigliceridemia. 4. Obesidade. 5. *Syzygium cumini*.
I. Paes, Antonio Marcus de Andrade. II. Título.

LUCAS MARTINS FRANÇA

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA E ESTEATOSE
HEPÁTICA DE ANIMAIS OBESOS TRATADOS COM O
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
*SYZYGIUM CUMINI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Maria Alicia Carrillo-Sepulveda
New York Institute of Technology (NYIT)

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Profa. Dra. Ana Paula Gameiro Cappelli
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Mário Alves de Siqueira Filho
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

*"Para criaturas tão pequenas como
nós, a vastidão só é suportável
através do Amor."*

Carl Sagan (Livro Contato, 1985)

*Dedico esta tese a minha avó
paterna (in memoriam) Lidia
Moreira de Almeida por todo amor
e carinho exalado em sua linda
existência.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e acima de tudo, queria agradecer a minha vida e formação para aqueles que fizeram e fazem de mim o que eu sou, meus pais: José de França Neto e Lúcia de Fátima Martins França. Sem todo o apoio e amor dos meus pais eu não poderia estar aqui, visto que mesmo nas situações mais difíceis não mediram esforços para me proporcionar a melhor educação que podiam, além de me ensinarem que “você pode perder tudo, mas o conhecimento ninguém tira de você”. Como parte de tudo isso, também agradeço ao meu irmão Rômulo Martins França, por todo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida, além de me presentear com sobrinhos maravilhosos: Maria Clara e Joaquim.

Agradecimento mais que especial vai para minha esposa e amor da minha vida, Marília Correia Bacelar, por todo amor dado nos nossos mais de 13 anos de convivência. Especialmente nesses 4 anos de doutorado, ela nunca hesitou em me apoiar em todas os momentos, dos mais alegres aos mais tristes, e principalmente naqueles que tivemos que nos distanciar por causa de experimentos. Obrigado por tudo, Amor!

Outra pessoa mais que responsável por esse momento é o meu grande amigo, parceiro, mestre, mentor e orientador, o professor Antonio Marcus de Andrade Paes. Muito da pessoa que sou hoje dentro da academia e, principalmente, o pesquisador que se aprimora a cada dia em mim é reflexo direto de todos os seus incentivos, ensinamentos e correções, que fizeram e fazem toda a diferença na minha vida e de muitos que já tiveram a chance de tê-lo como orientador. Obrigado por tudo, Mestre!

Agradeço a toda família do Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), que representam muito para mim e me orgulho de fazer parte. Em especial, agradeço àqueles amigos (as) do LeFisio que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho: Pâmela dos Santos, Karla Flister, Larissa Freitas, Caio Coêlho e Caroline Vale, Vinicyus Chagas, Renata Ohana, Jonas Sanches, Nathalee Ribeiro, Bruno Pinto, Renato Gaspar e Perla Freitas. Menção especial aos colegas e amigos de SEMUS Mirella Rego e Eduardo Bayma pela paciência e apoio incondicional durante toda minha trajetória.

Também agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (PPGCS-UFMA) pela oportunidade dada para realização do doutorado. Além disso, destaco os apoios financeiros mais que importantes dados pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) para realização dos experimentos e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização de sanduíche no exterior. Sanduíche que foi executado no College of Osteopathic Medicine do New York Institute of Technology (NYIT), onde recebi a orientação da Dra. Maria Alicia Carrillo-Sepulveda, a qual me apoiou incondicionalmente e muito me ensinou sobre cardiologia e o *milieu* da pesquisa americana, além de tornar minha adaptação nos EUA mais agradável.

Por fim, agradeço por estar vivo e com saúde!

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico:

Figura 1. Mecanismos responsáveis pelas patologias associadas à obesidade. A hipertrofia adipocitária decorrente da obesidade gera hipóxia local favorecendo o recrutamento de macrófagos e sua ativação para um fenótipo M1. Esses macrófagos produzem citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) que prejudicam a sinalização insulínica. Nos adipócitos, a resistência insulínica (RI) causa disfunção dessas células caracterizado pelo aumento da produção de leptina, diminuições da produção de adiponectina e da recirculação dos ácidos graxos livres (AGL). A maior concentração dos AGL na circulação favorece sua entrada em outros tecidos caracterizando o fenômeno da lipotoxicidade. No músculo, o influxo de AGL causa RI pela maior produção de intermediários da síntese de triglicerídeos (TG) como os diacilgliceróis (DAG), que junto com a RI no tecido adiposo favorece ao surgimento da diabetes mellitus tipo 2. No fígado, os AGL induzem síntese direta de triglicerídeos e DAG que também diminui a sensibilidade insulínica nesse órgão. Essa resistência insulínica hepática junto com hiperinsulinemia compensatória induzem a lipogênese *de novo* de triglicerídeos resultando na doença hepática gordurosa não-alcoólica. O fígado, na tentativa de reduzir o excesso de TG, estimula a exportação desse lipídio na forma de da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), resultando nas hiperlipidemias.....16

Figura 2. Consequências da resistência insulínica hepática seletiva. Na resistência insulínica associada à obesidade, há falha da insulina em suprimir a disfunção do tecido adiposo e a atividade da FOXO1 no fígado. Com isso, há o maior influxo de ácidos graxos e aumento das expressões da MTTP e ApoCIII nos hepatócitos, resultando em maior secreção de VLDL. Entretanto, ela estimula ainda mais a atividade da mTORC1, aumentando a lipogêneses *de novo* via SREBP-1c, e diminuindo a degradação da ApoB pela inibição da sortilina. Tudo isso resulta em maior síntese de triglicerídeos (TG) e aumento da hipertrigliceridemia.....18

Figura 3. Ativação do estresse do retículo endoplasmático (RE) ou da *unfolded protein response* (UPR). Acumulação de proteínas desenoveladas no lúmen do RE leva a dissociação da GRP78 de três sensores transmembrana: PERK, IRE1 e ATF6. A PERK homodimeriza e fosforila eIF2 α para inibir a tradução proteica. PERK também estimula fatores de transcrição como NRF-2 e ATF4, os quais induzem resposta antioxidante e pró-apoptótica via CHOP, respectivamente. O ATF4 também induz a expressão do GADD34 que defosforila o eIF2 α e reativar a tradução. A ativação da IRE1 resulta em *splicing* da XBP1, formando a XBP1s que induz a transcrição de chaperonas (ex: GRP78 e GRP94) e estimula a degradação proteica via degradação associada ao RE (ERAD). A IRE1 também diminui a tradução através da sua atividade RNAase (RIDD), embora a cronicidade desse mecanismo possa induzir apoptose, que também é estimulado pela maior fosforilação da JNK. O ATF6 é ativado e clivado e conduz ao aumento de chaperonas, todavia sua ativação crônica também pode induzir apoptose via CHOP.....21

Figura 4. Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA): um ciclo vicioso. A acumulação de lipídeos no hepatócito decorrente da obesidade ou de dietas lipogênicas promove modificações na composição da membrana do RE aumentando a razão fosfatidilcolina (FC):fosfatidiletanolamina (FE), o que induz estresse do RE por alterações na homeostase do Ca²⁺. A ativação da *unfolded protein response* (UPR) tenta

amenizar o acúmulo de gordura, mas se a sobrecarga lipídica não for diminuída, o estresse do RE torna o processo um ciclo vicioso por estimular lipogênese *de novo*. Isso contribui para manutenção e progressão da DHGNA, que pode evoluir para a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), caso esse ciclo não seja interrompido.....25

Figura 5. *Syzygium cumini* (L.) Skeels. A. Imagem de um espécime no campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA. B. Detalhes das folhas e frutos da espécie.....29

Figura 6. Compostos polifenólicos identificados no *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica. A quercetina e rutina podem diminuir a hiperglicemia pelo estímulo da secreção de insulina através do bloqueio de canais de Ca^{2+} tipo L nas células- β pancreáticas. Além disso, a rutina contribui através da inibição da produção hepática de glicose por aumentar a atividade da hexoquinase e diminuir a frutose-1,6-bifosfatase no fígado. A miricetina melhora a sensibilidade insulínica periférica por aumentar a expressão de GLUT-4 no tecido adiposo branco. Ácido gálico, quercetina e rutina diminuem a síntese de colesterol por inibirem a HMG-CoA redutase hepática. Além desses efeitos, a atividade antioxidante característica desses compostos e do *S. cumini* pode ser determinante para melhora das alterações glicêmicas e lipídicas observada na síndrome metabólica.....32

Capítulo I:

Figure 1. Main phenolic compounds identified in polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc). (A) Tetragalloylglucose, (B) hexahydroxydiphenoyl-glucose, (C) quercetin, (D) myricetin deoxyhexoside and (E) acylated myricetin deoxyhexoside.....40

Figure 2. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces fat accumulation in obese rats. (A) Evolution of body weight. (B) Daily food intake. (C) Lee index before and after 8-weeks treatment. (D) Retroperitoneal fat. (E) Periepididymal fat. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) as compared to ^aLean; ^bObese and ^cObese+HESc 0.5.....44

Figure 4. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reverses non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese rats. Analysis of liver histology with hematoxylin and eosin. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.....45

Figure 3. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) improves glucose homeostasis and serum lipid profile in obese rats. (A) Fasting glucose. (B) Total cholesterol. (C) Triglycerides. (D) Free fatty acids. (E) TyG index. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as mean

± SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean; ^bObese and ^cObese+HESc 0.5.....46

Figure 5. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) improves lipid profile and liver function of obese rats. (A) Liver weight. (B) Total liver fat. (C) Hepatic cholesterol. (D) Hepatic triglycerides. (E) Serum aspartate aminotransferase (AST). (F) Serum alanine aminotransferase (ALT). Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.....47

Figure 6. Administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces triglyceride content in VLDL particles of obese rats. (A) Protein content of high-(HDL), low-(LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL). (B) Cholesterol content of lipoproteins. (C) Triglyceride content of lipoproteins. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean absorbance of fast protein liquid chromatography (FPLC) (n = 7 per group).....48

Figure 7. Administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) attenuates endoplasmic reticulum stress in the livers of obese rats. Protein expression was determined by western blotting. (A) Glucose response protein 94 (GRP94). (B) Glucose response protein 78 (GRP78). (C) Calreticulin. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Lean: control group. Densitometry results are expressed as the mean ± SEM (n = 4 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.....49

Figure 8. The administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) inhibits the XBP-1s/PDI/MTP pathway in the livers of obese rats. Protein expression was determined by western blotting. (A) X-box binding protein 1 (XBP-1). (B) Protein disulfide isomerase (PDI). (C) Microsomal triglyceride-transfer protein (MTP). Lean: control group. Obese 0: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Densitometry results are expressed as the mean ± SEM (n = 4 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.....50

Figure 9. The administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces the export of liver triglycerides in rats with Triton WR 1339-induced acute hypertriglyceridemia. Acute hypertriglyceridemia was induced by an intraperitoneal injection of Triton WR 1339 (0.3 g/kg) 1 hour after a single dose of HESc was administered, and the rats were monitored for 72 h. Basal: control group. Triton WR 1339: hypertriglyceridemic group. +HESc 0.5: hypertriglyceridemic group treated with 0.5 g/kg of HESc. +HESc 1.0: hypertriglyceridemic group treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.....51

Capítulo 2:

Figura 1. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) reduz o acúmulo do tecido adiposo branco (TAB) de camundongos obesos-MSG. **A.** Evolução ponderal. **B.** Índice de Lee antes e após o tratamento. **C.** TAB retroperitoneal. **D.** TAB periepídídimal. **E.** Atividade lipolítica do TAB periepídídimal na condição basal (-) e estimulada por isoproterenol (Iso) (+). **F.** Ácidos graxos livres séricos. **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 7 por grupo). Letras indicam diferença contra a Magro e b Obeso em A, B, C, D, e F. Em F as letras representam diferenças contra a basal (-), b Magro (-), d Magro (+), c Obeso (-) e e Obeso (+). ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....70

Figura 2. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) melhora a homeostase glico-insulínica de camundongos obesos-MSG. **A.** Teste oral de tolerância à glicose (TOTG). **B.** Taxa de desaparecimento da glicose obtida pelo teste de tolerância à insulina (K_{ITT}). **C.** Índice de resistência insulínica Homeostasis Model Assessment 1 (HOMA1-RI). **D.** Índice TyG. **E.** Insulina sérica. **F.** Glicose sérica em jejum. **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 7 por grupo). Letras indicam diferença contra a Magro e b Obeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....71

Figura 3. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) melhora os perfis lipídicos hepático e sérico de camundongos obesos-MSG. **A.** Gordura total hepática **B.** Colesterol hepático. **C.** Triacilgliceróis hepáticos. **D.** Triacilgliceróis séricos. **E.** Colesterol sérico. **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 7 por grupo). Letras indicam diferença contra a Magro e b Obeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....72

Figura 4. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) diminui a expressão gênica (qPCR) de marcadores do metabolismo de triacilgliceróis no fígado de camundongos obesos-MSG. **A.** *Peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR- α). **B.** *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR- γ). **C.** *Sterol response element-binding protein-1c* (SREBP-1c). **D.** *Fatty acid synthase* (FAS). **E.** *Stearoyl-CoA desaturase-1* (SCD1). **F.** *Diacylglycerol acetyltransferase-2* (DGAT2). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como a média $\pm$ EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra a Magro e b Obeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....73

Figura 5. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) reduz a expressão gênica (qPCR) de marcadores da exportação de triacilgliceróis no fígado de camundongos obesos-MSG. **A.** *Apolipoprotein B* (ApoB). **B.** *Microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP). **C.** *Protein disulfide isomerase* (PDI). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas

com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como a média $\pm$ EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra $^{\alpha}$ Magro e $^{\beta}$ Obeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....74

Figura 6. Tratamento com extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) sobre a expressão gênica (qPCR) de marcadores do estresse do retículo endoplasmático hepático de camundongos obesos-MSG. A. *Glucose-regulated protein 78* (GRP98). B. *Activating transcription factor 6* (ATF6). C. *Inositol-requiring enzyme 1 α* (IRE1 α). D. *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK). E. *C/EBP homologous protein* (CHOP). F. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como a média $\pm$ EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra $^{\alpha}$ Magro e $^{\beta}$ Obeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).....75

Considerações finais:

Figura 1. Efeitos e mecanismos de ação do tratamento com o extrato rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) em modelos animais de obesidade e diabetes tipo 2 (DM2). O grande acúmulo de tecido adiposo branco (TAB) característico da obesidade induzida pelo MSG fovece a disfunção adipocitária que resulta tanto numa resistência insulínica (RI) como na menor recirculação dos ácidos graxos livres (AGL). A RI induz aumento dos níveis séricos de insulina que junto com os AGL estimulam a síntese *de novo* e direta de triacilgliceróis (TAG) no fígado, respectivamente. O maior influxo de AGL assim como a maior concentração de TAG hepático induz RI local e estresse do retículo endoplasmático (RE), favorecendo ainda mais síntese *de novo* de TAG, tornando o ciclo vicioso. O EHSc pode estar reduzindo o acúmulo de TG hepático e consequente exportação desse lipídeo para a circulação tanto pela diminuição da insulinemia resultante da melhora da sensibilidade insulínica provocada pelo menor acúmulo de TAG, como pela *downregulation* da PERK que é um dos principais sensores do estresse RE relacionados com a síntese de TAG via indução dos fatores de transcrição lipogênicos SREBP-1c e PPAR- γ . O EHSc também apresentou efeito inibitório sobre a via de formação e exportação de VLDL nesses animais obesos, como a XBP-1s/PDI/MTP, o que pode favorecer ainda mais seu efeito anti-hipertrigliceridêmico. Ademais, em ratos com DM2, além de melhorar o metabolismo lipídico hepático, o EHSc foi capaz de diminuir a pressão arterial e estimular o relaxamento da aorta nesses animais. Efeito que pode estar relacionado com o aumento das expressões da *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) e da *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP).....91

RESUMO

A obesidade é considerada a epidemia do século 21. A sua manifestação hepática, a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), está presente em mais de 80 % dos obesos. Por isso, a DHGNA é um problema de saúde pública, visto que é fator de risco direto para doenças cardiovasculares, principalmente, pela sua estreita relação com as dislipidemias. A espécie vegetal *Syzygium cumini*, cujo nome popular é jambolão, é amplamente utilizada na medicina tradicional para desordens associadas à obesidade como diabetes mellitus e dislipidemias. Em artigo anterior do nosso grupo, o extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* (EHSc) reduziu a esteatose hepática e a hipertrigliceridemia de ratos obesos induzidos pelo L-glutamato monossódico (MSG). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis mecanismos de ação do EHSc sobre o metabolismo lipídico hepático de animais obesos-MSG. No primeiro estudo desta tese, quando ratos Wistar obesos-MSG foram tratados (via oral) com EHSc (0,5 ou 1,0 g/kg/dia) ou veículo (0,1 ml/100g/dia) por 8 semanas houve diminuição do acúmulo de tecido adiposo branco (TAB) sem alterar o consumo de ração. O tratamento também reduziu os níveis sanguíneos da glicose em jejum, colesterol total, triacilgliceróis (TAG) e ácidos graxos livres, assim como o índice TyG. O EHSc restaurou a esteatose hepática dos ratos obesos e reduziu pela metade o conteúdo de TAG das *very-low-density lipoproteins* (VLDL). No fígado, foi observado diminuições das expressões proteicas da *splicing of X-box binding protein 1* (XBP-1s), *protein disulfide isomerase* (PDI) e *microsomal triglyceride-transfer protein* (MTP), as quais fazem parte da via de secreção de TAG. Esse efeito foi corroborado pela inibição aguda do acúmulo de TAG séricos promovido pelo EHSc após a injeção (0,3 g/kg, i.p.) do Triton WR1339 em outros ratos Wistar. Em outro trabalho, o tratamento por 4 semanas de camundongos Swiss obesos-MSG com a menor dose (0,5 g/kg/dia) também não alterou o padrão alimentar e reduziu o TAB, com melhora da atividade lipolítica desse tecido. De forma semelhante nos ratos, o EHSc melhorou a glicemia, o perfil lipídico sérico e a DHGNA. Além disso, o tratamento melhorou a sensibilidade insulínica pelas reduções dos índices HOMA1-IR, TyG e insulina sérica, e aumento do kITT. Nas análises moleculares hepáticas, o EHSc diminuiu a expressão gênica de fatores de transcrição (*sterol response element-binding protein 1c* e *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) e enzimas lipogênicas (*fatty acid synthase* e *diacylglycerol acyltransferase 2*), assim como de marcadores da exportação de TAG (*apolipoprotein B* e MTP). Além disso, houve a *downregulation* gênica de um braço do estresse do retículo endoplasmático (RE) nos animais tratados, com reduções da *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) e *nuclear factor erythroid 2-related factor*. Primeiramente, esses dados ratificam a eficácia do EHSc na reversão da DHGNA e hipertrigliceridemia de roedores obesos-MSG. E como dado inédito, este trabalho sugere que esses efeitos devam ser em parte pela melhora da sensibilidade insulínica nesses animais, mas também pela *downregulation* de vias do estresse do RE, como a XBP-1s e PERK, que são importante indutores da secreção e síntese de TAG no fígado, respectivamente. Portanto, esta tese destaca a importância do estresse do RE como alvo terapêutico de alterações do metabolismo lipídico hepático, além de contribuir para a validação da eficácia das folhas da espécie *S. cumini* sobre essas desordens associadas à obesidade.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*; doença hepática gordurosa não-alcoólica; obesidade; estresse do retículo endoplasmático; hipertrigliceridemia.

ABSTRACT

Obesity is considered the epidemic of the 21st century, and its hepatic manifestation, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is present in more than 80 % of obese people. Therefore, NAFLD is a public health problem, since that is direct risk factor for cardiovascular diseases, mainly because of its close relationship with dyslipidemias. The plant species *Syzygium cumini*, whose popular name is jambolan, is widely used in traditional medicine for disorders associated with obesity such as diabetes mellitus and dyslipidemias. In previous paper from our group, the polyphenol-rich hydroethanolic extract of *S. cumini* (HESc) leaves reduced NAFLD and hypertriglyceridemia of monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity rats. Thus, the aim of this work was to investigate possible mechanisms of action of the HESc on the hepatic lipid metabolism of MSG-obese rats. In the first study of this doctoral dissertation, when male MSG-obese Wistar rats were orally treated with HESc (0.5 or 1.0 g/kg/day) or vehicle (0.1 ml/100 g/day) for 8 weeks there was decreasing white adipose tissue (WAT) accumulation without altering food intake. The treatment also reduced blood levels of fasting glucose, total cholesterol, triacylglycerols (TAG) and free fatty acids, as well as the TyG index. The HESc restored the hepatic steatosis of obese rats and halved the TAG content of very low-density lipoproteins (VLDL). In liver was seen protein expression reduction of splicing of X-box binding protein 1 (XBP-1s), protein disulfide isomerase (PDI) and microsomal triglyceride-transfer protein (MTP), which are part of the TAG secretion pathway. This effect was corroborated by the acute inhibition of serum TAG accumulation promoted by HESc after injection (0.3 g/kg, i.p.) of Triton WR1339 in other male Wistar rats. In another study, treatment for 4 weeks with the lowest dose (0.5 g/kg/day) in MSG-obese Swiss mice did not alter the dietary pattern and reduced BAT, in addition to improving the lipolytic activity of this tissue. Similarly in rats, HESc improved glycemia, serum lipid profile, and NAFLD. Moreover, treatment improved insulin sensitivity by decreases of HOMA1-IR and TyG indices, and serum insulin, and increases kITT. In the molecular analysis of the liver, HESc declined the gene expression of lipogenic transcription factors (sterol response element-binding protein 1c and peroxisome proliferator-activated receptor γ), and enzymes (fatty acid synthase and diacylglycerol acyltransferase 2), as well as markers for TAG exportation (apolipoprotein B and MTP). In addition, there was gene downregulation of an endoplasmic reticulum (ER) stress arm in treated animals, with reductions of PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and nuclear factor erythroid 2-related factor. First of all, these data confirm the efficacy of HESc in the reversion of NAFLD and hypertriglyceridemia from MSG-obese rodents. And as a novelty in literature, this work suggest that theses effects should be partly due to improved insulin sensitivity in these animals, but also by the downregulation of ER stress pathways, such as XBP-1s and PERK, which are important inducers of secretion and synthesis of TAG in the liver, respectively. Therefore, this dissertation highlights the importance of ER stress as a therapeutic target for changes in hepatic lipid metabolism, in addition to contributing to the validation of the efficacy of *S. cumini* on these obesity-associated disorders.

Keywords: *Syzygium cumini*; non-alcoholic fatty liver disease; obesity; endoplasmic reticulum stress; hypertriglyceridemia.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Referencial teórico.....	12
2.1 Obesidade: causas e consequências	12
2.2 Desordens do metabolismo lipídico hepático no contexto da obesidade	16
2.3 O estresse do retículo endoplasmático	19
2.4 O papel do estresse do RE sobre o metabolismo lipídico hepático	22
2.5 Tratamento farmacológico da DHGNA	25
2.6 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels e suas potencialidades para o tratamento de desordens metabólicas	28
3 Objetivos.....	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos	34
4 Resultados	34
4.1 Artigos publicados durante o doutorado	34
4.2 CAPÍTULO I – Polyphenol-rich Extract of <i>Syzygium cumini</i> Leaves Reverts Hypertriglyceridemia Via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-glutamate-induced Obese Rats	36
4.2.1 Introduction	38
4.2.2 Materials and Methods	39
4.2.2.1 Plant material and polyphenol-rich hydroethanolic extract preparation	39
4.2.2.2 MSG-obesity induction and experimental design	40
4.2.2.3 Serum biochemical analysis and assessment of insulin resistance	41
4.2.2.4 Liver histological analysis	41
4.2.2.5 Liver lipid profile	41
4.2.2.6 Chromatographic analysis of serum lipoproteins	42
4.2.2.7 Evaluation of protein expression by western blotting	42
4.2.2.8 Induction of acute hypertriglyceridemia with Triton WR1339	42
4.2.2.9 Statistical analysis	43
4.2.3 Results	43
4.2.3.1 HESc reduces adipose tissue accumulation in obese rats	43
4.2.3.2 HESc improves serum glycolipid profile in obese rats	44
4.2.3.3 HESc reverts NAFLD and improves liver function in obese rats	45
4.2.3.4 HESc reduces TG content in VLDL particles from obese rats	47
4.2.3.5 HESc reduces ER stress in the liver of obese rats	48
4.2.3.6 HESc inhibits the XBP-1s/PDI/MTP axis	49

4.2.4 Discussion	51
References	55
4.3 CAPÍTULO II – Extrato rico em polifenóis das folhas de <i>Syzygium cumini</i> melhora o metabolismo lipídico hepático de camundongos obesos-MSG através de uma ação conjunta sobre a resistência insulínica sistêmica e o estresse do retículo endoplasmático no fígado	60
4.3.1 Introdução	62
4.3.2 Material e Métodos	63
4.3.2.1 Material botânico e obtenção do extrato hidroalcoólico rico em polifenóis	63
4.3.2.2 Indução da obesidade pelo L-glutamato monossódico (MSG) e tratamento com EHSc	64
4.3.2.3 Atividade lipolítica ex vivo do TAB	65
4.3.2.4 Análises da homeostase glico-insulínica e do perfil bioquímico sérico	65
4.3.2.5 Perfil lipídico hepático	66
4.3.2.6 Expressão gênica por Real-Time PCR (qPCR)	66
4.3.2.7 Análise estatística	68
4.3.3 Resultados	69
4.3.3.1 EHSc reduz o acúmulo e melhora a atividade do TAB de camundongo obesos	69
4.3.3.2 EHSc melhora a homeostase glico-insulínica de camundongos obesos	70
4.3.3.3 EHSc melhora os perfis lipídicos hepáticos e séricos	71
4.3.3.4 Efeito do EHSc sobre marcadores da homeostase dos TAG no fígado	72
4.3.3.5 Efeito do EHSc sobre marcadores da exportação hepática dos TAG	73
4.3.3.6 Efeito do EHSc sobre vias do estresse do RE hepático	74
4.3.4 Discussão	75
Referências	82
5 Considerações finais	89
Referências	92
ANEXO A	108
ANEXO B	109
ANEXO C	110
ANEXO D	111
ANEXO E	112
ANEXO F	113

1 Introdução

A obesidade e o sobrepeso são desordens crônicas endócrina-metabólica com estimativa de prevalência de 39 % na população com 18 anos ou mais (WHO, 2017), sendo considerada por muitos como “a” epidemia do século 21 (DI CESARE et al., 2016). No Brasil, mais da metade (53,8 %) da população adulta das capitais está com excesso de peso e quase 19 % desta é obesa (BRASIL, 2017). Esse cenário é preocupante, uma vez que representa fator de risco de outras doenças crônico-degenerativas como doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e dislipidemias, que associadas ou mesmo sozinhas aumentam em várias vezes as chances do surgimento de doenças cardiovasculares, como o acidente vascular cerebral e o infarto agudo do miocárdio, as quais são as principais causas de morbimortalidade no mundo (NAGHAVI et al., 2015).

O excesso de tecido adiposo e a consequente hipertrofia adipocitária é determinante para o aparecimento das comorbidades associadas a obesidade, uma vez que o grande acúmulo de triglicerídeos (TG) no adipócito induz apoptose e maior migração macrofágica para esse tecido que em contato com os ácidos graxos livres (AGL) presentes no meio mudam de um fenótipo anti para pró-inflamatório (LAFONTAN, 2014). Com isso, há aumento de citocinas inflamatórias que associado ao estresse oxidativo também presente induz resistência insulínica, o que resulta em disfunção do adipócito, o qual passa a liberar em excesso os AGL e leptina e diminuir a produção de adiponectina (ATTIE e SCHERER, 2009). Esse maior influxo de AGL nos tecidos e seu acúmulo na forma de TG caracteriza o quadro de lipotoxicidade, que junto com as alterações plasmáticas das outras adipocinas induz resistência insulínica em vários tecidos (SHULMAN, 2014).

Dentre os órgãos que primeiro sentem as alterações adipocitárias destaca-se o fígado, que como tecido lipogênico que é, sintetiza TG tanto de forma direta pelo maior influxo de AGL como indiretamente através da síntese *de novo* de lipídeos, que se dá principalmente pela hiperinsulinemia, a qual é resultante da resistência insulínica periférica. Esse maior acúmulo de gordura hepática faz com que ele exporte mais TG na forma de *very low density lipoprotein* (VLDL), resultando no desenvolvimento tanto da DHGNA como da hipertrigliceridemia (CHOI e GINSBERG, 2011). Apesar desses mecanismos fisiopatológicos do metabolismo hepático estarem bem elucidados, há um pouco mais de uma década tem se discutido bastante o papel do retículo endoplasmático (RE) nessas patologias, uma vez que alguns estudos

demonstraram em roedores (ÖZCAN et al., 2004) e humanos (GREGOR et al., 2009) que o excesso de gordura no fígado perturba a homeostase do RE.

O RE é uma organela responsável pela síntese e controle de qualidade de proteínas, armazenamento de Ca^{2+} e síntese de fosfolípidos para as membranas celulares (VAN MEER et al., 2008). Entretanto, quando ocorre uma sobrecarga da capacidade de controle do enovelamento das proteínas sintetizadas, há o acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE, que resulta em ativação da *unfolded protein response* (UPR), também denominado estresse do RE. A UPR é iniciada quando há a ativação de três proteínas transmembrana do RE: PERK (*eukaryotic translation initiation factor 2- α -kinase 3* ou *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*); IRE1 (*inositol-requiring 1*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*). A atividade desses sensores resulta na indução de várias vias moleculares que tem como objetivo inicial o controle da homeostase do RE. Não obstante, com a cronificação do estresse do RE no fígado há o estímulo de vias inflamatórias, apoptóticas e lipogênicas (RON e WALTER, 2007). Condição que atualmente é considerada um dos mecanismos responsável pela manutenção e progressão da DHGNA e dislipidemias em indivíduos obesos (BAICEANU et al., 2016), sendo, assim, passível de alvo terapêutico para o controle dessas desordens do metabolismo lipídico hepático (MALHI e KAUFMAN, 2011).

Syzygium cumini (L.) Skeels (Myrtaceae) é uma árvore cultivada em vários países e com ampla distribuição no território brasileiro, onde é conhecida principalmente como jabolão e jamelão (LIM, 2012). Na prática popular, é utilizada para tratamentos de vários tipos de desordens, onde podemos destacar aquelas relacionadas a distúrbios metabólicos como a obesidade (DICKEL et al., 2007; CERCATO et al., 2015), hiperlipidemia (BRABOZA DA SILVA et al., 2012) e principalmente o diabetes mellitus do tipo 2 (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012), sendo assim, reconhecida pelo Ministério da Saúde do Brasil como uma espécie vegetal relevante no contexto etnofarmacológico do país, uma vez que faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009).

Nosso grupo tem destacado o potencial de várias partes de *S. cumini* no combate a doenças cardiometabólicas (CHAGAS et al., 2015). Com as folhas já foram observados efeitos hipoglicemiantes (SOARES et al., 2000), antioxidante (ESHWARAPPA et al., 2014) e, em estudo recente, nós verificamos que o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas melhora o quadro metabólico de ratos obesos induzidos pelo L-glutamato monossódio (MSG), com uma diminuição tanto do acúmulo de TG hepático como da hipertrigliceridemia nesse

modelo de obesidade (SANCHES et al., 2016). Várias classes de compostos que podem justificar os efeitos descritos acima já foram identificados das folhas, como taninos, ácidos fenólicos, terpenos e flavonoides (CHAGAS et al., 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre as vias moleculares pelos quais esses compostos estejam agindo, ou mesmo se esses efeitos sejam decorrentes do fitocomplexo, como pode acontecer quando da utilização de espécies vegetais (EFFERTH e KOCH, 2011; HERRANZ-LÓPEZ et al., 2012).

Como foi visto, a espécie *S. cumini* é utilizada amplamente pela população para o tratamento de distúrbios metabólicos e recentemente constatamos que o extrato hidroalcoólico das folhas reduzem a esteatose hepática e hipertrigliceridemia em roedores obesos induzidos por MSG (SANCHES et al., 2016). Patologias estas que estão relacionadas à ativação da UPR hepática nesses animais (FRANÇA et al., 2014). Portanto, é necessário investigar os efeitos do tratamento com esse extrato das folhas de *S. cumini* sobre os mecanismos moleculares hepáticos do estresse do RE envolvidos no controle de vias lipogênicas e de exportação de triglicerídeos nesses animais obesos-MSG, na tentativa de contribuir para validação da eficácia dessa espécie vegetal no combate de desordens do metabolismo lipídico associado à obesidade.

2 Referencial teórico

2.1 Obesidade: causas e consequências

A obesidade é determinada pelo desequilíbrio crônico entre as energias gasta e ingerida, levando a um saldo energético positivo, que é convertido em acúmulo de triglicerídeos nas células, principalmente nos adipócitos, resultando em excesso de tecido adiposo e aumento de peso (BRAY, 2006). De forma rápida e prática, essa patologia pode ser diagnosticada através de índices antropométricos, como índice de massa corporal (IMC), circunferência da cintura (CC), relação cintura-quadril (RCQ) e razão cintura-altura (RCA). Apesar do IMC ter sido utilizado por muitos anos, o mesmo deve entrar em desuso pois esses índices que avaliam a obesidade abdominal apresentam uma maior associação com fatores de risco cardiometabólicos, destacando-se o RCA, que é considerado a melhor ferramenta para a avaliação das consequências dessa patologia, principalmente, por poder ser utilizado para todas as faixas etárias, etnias e ambos os sexos, além de apresentar um único valor de corte ($RCA \geq$

0,5) para indicar risco de saúde associada à obesidade (ASHWELL e HSIEH, 2005; ASHWELL et al., 2012).

O desenvolvimento e o grau da obesidade dependem de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Em geral, uma obesidade grave em idades jovens é principalmente determinada por regulações gênicas que podem afetar o balanço energético, por exemplo, os polimorfismos no gene associado à obesidade e a massa adiposa (*FTO*) (FAWCETT e BARROSO, 2010), além de mecanismos epigenéticos como metilação de DNA e/ou acetilação de histonas que podem acontecer ainda no período gestacional, através de sub ou supernutrição da mãe, programando o indivíduo, que ainda vai nascer, a se tornar predisposto ao acúmulo de gordura durante toda vida (DESAI et al., 2015). Por outro lado, a obesidade mais tardia tem uma menor influência genética e um forte componente ambiental, como a elevada ingesta alimentar e baixa atividade física (BAQAI e WILDING, 2015).

Nos países do ocidente, profundas mudanças do padrão alimentar têm ocorrido nos últimos 30 a 40 anos, destacando-se o grande consumo de alimentos e bebidas de alto teor calórico, sendo uma das principais causas da obesidade na sociedade atual (POPKIN et al., 2012). Dentre os alimentos obesogênicos, aqueles ricos em gorduras e/ou açúcares simples (ex: sacarose, glicose e frutose) exerce um protagonismo nesse contexto, visto que têm baixo poder de saciedade, conduzindo ao fenômeno da compulsividade alimentar passiva (HOLLIS, 2016). Além disso, estudo recente em ratos afirma que essa maior ingesta alimentar pode ser decorrente de uma maior produção de acetato pelo microbioma intestinal induzido por essas dietas, uma vez que esse acetato estimula indiretamente a secreção de grelina (hormônio orexígeno) do estômago pela ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático, o que também contribui diretamente para o maior acúmulo de gordura através do aumento da secreção de insulina (PERRY et al., 2016).

Outro componente do estilo de vida moderno determinante para o desenvolvimento da obesidade é o sedentarismo, pois favorece um menor gasto energético, principalmente através de reduções da integridade e massa muscular (STENHOLM et al., 2008). O músculo esquelético é considerado um órgão secretório, produzindo várias substâncias denominadas miocinas, que exercem um importante papel no metabolismo energético. Dentre essas miocinas, deve-se destacar o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a interleucina 6 (IL-6), as quais estimulam a β -oxidação lipídica via proteína quinase ativada por AMP (AMPK), além da irisina, que estimula o *browning* do tecido adiposo branco, ou seja, induz termogênese nesse

tecido, principalmente, através do aumento da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) (PEDERSEN e FEBBRAIO, 2012).

Com esses fatores ambientais bastante presentes na sociedade, a prevalência da obesidade tem aumentado progressivamente ao longo dos últimos 30 anos. Em escala global, mais de 1,5 bilhão de adultos estão com sobrepeso, dos quais 500 milhões são obesos (ORGANIZATION, 2011). No Brasil, o último inquérito domiciliar realizado demonstrou que mais da metade (53,8 %) da população adulta das capitais está com excesso de peso e quase 19 % dessa está clinicamente obesa (BRASIL, 2017). Esse quadro se torna mais preocupante uma vez que a obesidade é fator de risco para doenças crônico-degenerativas como doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hiperlipidemia, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (colorretal, próstata e mama), além de problemas sociais e psicológicos como baixo autoestima e depressão, elevando os gastos públicos e diminuindo a qualidade e o tempo de vida do indivíduo acometido (DANAEI et al., 2009). Com isso, a obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública tanto em países industrializados como nos emergentes, sendo alvo constante de estratégias profiláticas por parte da Organização Mundial da Saúde (WELLS, 2012).

Essa estreita relação da obesidade com outras desordens crônico-degenerativas se deve a uma participação direta do tecido adiposo branco (TAB). O TAB é um tecido heterogêneo composto de adipócitos e várias células microvasculares e imunes na sua fração vascular estromal, liberando uma grande variedade de substâncias bioativas denominadas adipocinas como os ácidos graxos livres (AGL), leptina, adiponectina e citocinas inflamatórias, exercendo, assim, importantes funções parácrinas e endócrinas no controle da homeostase energética e inflamatória (ATTIE e SCHERER, 2009). A produção dessas adipocinas é constante no TAB, entretanto as suas concentrações no organismo vão depender do acúmulo de triglicerídeos (TG) nos adipócitos, ou seja, do tamanho destes. Em indivíduos com peso normal os adipócitos são menores, com uma baixa liberação dos AGL e leptina, e maior de adiponectina, além disso, há a presença de macrófagos M2 deixando o meio mais anti-inflamatório (LAFONTAN, 2014). Com o aumento do TAB, durante o desenvolvimento da obesidade, ocorre o maior armazenamento de TG, resultando na hipertrofia adipocitária, condição que diminui a produção de adiponectina e aumenta de leptina e AGL, além de uma maior infiltração macrofágica e mudança do perfil M2 para M1 o que torna o ambiente inflamatório através da maior síntese e liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β e MCP-1, o que

caracteriza a obesidade como doença inflamatória subclínica crônica (**Figura 1**) (LAFONTAN, 2014).

Com a evolução da hipertrofia dos adipócitos há redução do fluxo sanguíneo no TAB resultando em uma hipóxia local e, consequente, disfunção adipocitária, exacerbando o quadro inflamatório através de uma grande presença de macrófagos M1 e maior produção de citocinas inflamatórias (ex: TNF- α e IL-6), que através de ações autócrinas e parácrinas induzem resistência insulínica (RI) nesse tecido tanto pela ativação de quinases de resíduos de serina dos substratos do receptor de insulina (IRS) e da *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), como pela diminuição das expressões do transportador de glicose (GLUT-4) e dos próprios IRS nos adipócitos (ROTTER et al., 2003). A RI no TAB amplifica a disfunção nesse tecido, tanto pela maior atividade do hormônio lipase sensível, como pela menor expressão de transportadores dos AGL, resultando na maior liberação e menor recirculação dos AGL no TAB. Essa maior concentração dos AGL na corrente sanguínea favorece o quadro da lipotoxicidade, visto que o acúmulo dos AGL nos outros tecidos é maior do que sua capacidade de oxidá-los (IMRIE et al., 2010). O maior acúmulo de gordura ectópica (fora do TAB), associado à diminuição de adiponectina e elevações das citocinas inflamatórias e leptina induzem a uma RI periférica, contribuindo para o aparecimento das comorbidades relacionadas a obesidade, como DM2, DHGNA e hiperlipidemias, caracterizando o quadro de síndrome metabólica (ATTIE e SCHERER, 2009) (**Figura 1**).

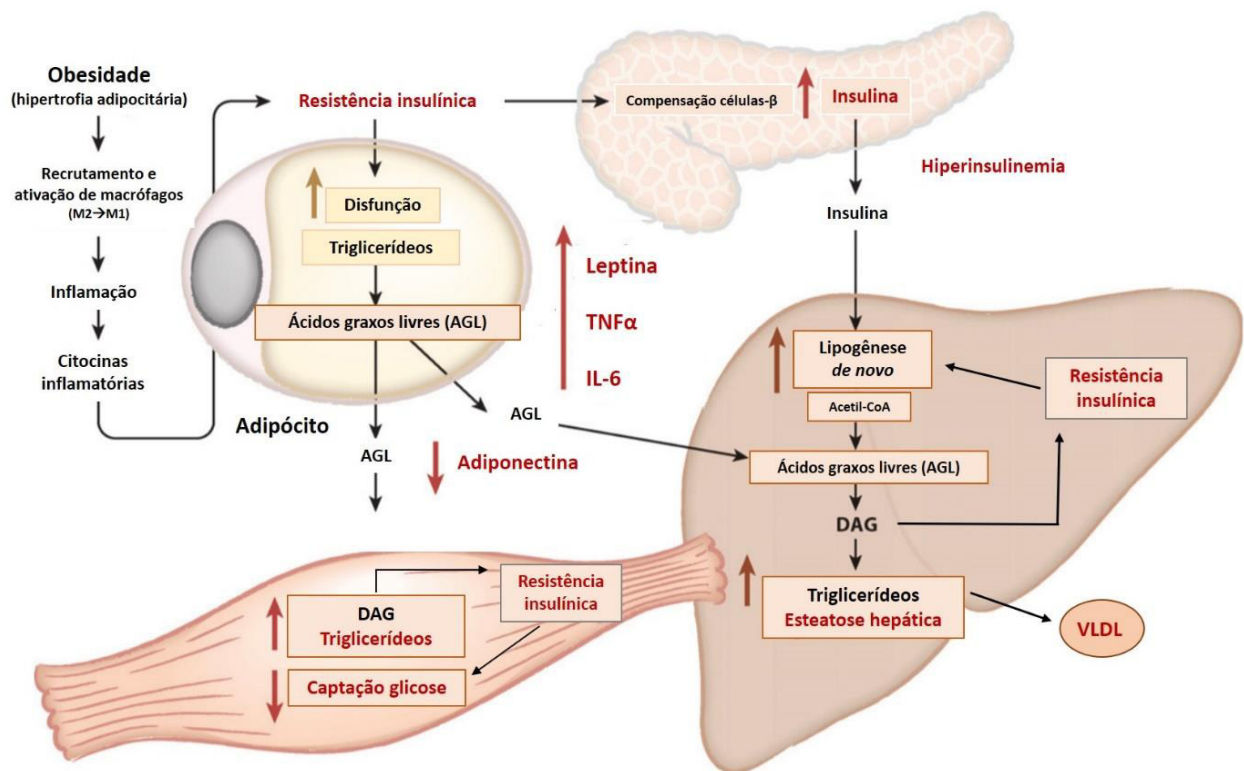


Figura 1. Mecanismos responsáveis pelas patologias associadas à obesidade. A hipertrofia adipocitária decorrente da obesidade gera hipóxia local favorecendo o recrutamento de macrófagos e sua ativação para um fenótipo M1. Esses macrófagos produzem citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) que prejudicam a sinalização insulínica. Nos adipócitos, a resistência insulínica (RI) causa disfunção dessas células caracterizado pelo aumento da produção de leptina, diminuições da produção de adiponectina e da recirculação dos ácidos graxos livres (AGL). A maior concentração dos AGL na circulação favorece sua entrada em outros tecidos caracterizando o fenômeno da lipotoxicidade. No músculo, o influxo de AGL causa RI pela maior produção de intermediários da síntese de triglicerídeos (TG) como os diacilgliceróis (DAG), que junto com a RI no tecido adiposo favorece ao surgimento da diabetes mellitus tipo 2. No fígado, os AGL induzem síntese direta de triglicerídeos e DAG que também diminui a sensibilidade insulínica nesse órgão. Essa resistência insulínica hepática junto com hiperinsulinemia compensatória induzem a lipogênese *de novo* de triglicerídeos resultando na doença hepática gordurosa não-alcoólica. O fígado, na tentativa de reduzir o excesso de TG, estimula a exportação desse lipídio na forma de da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), resultando nas hiperlipidemias.

Fonte: Attie & Scherer (2009) com modificações.

2.2 Desordens do metabolismo lipídico hepático no contexto da obesidade

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a acumulação patológica de gordura no fígado na ausência da ingestão de álcool (DIETRICH e HELLERBRAND, 2014). Descrita inicialmente somente a 36 anos atrás (ADLER e SCHAFFNER, 1979), atualmente é a principal causa de doença hepática em países desenvolvidos, com estimativa de prevalência de 20 – 30 % na população em geral (MOORE, 2010). A ocorrência de DHGNA está fortemente associado à obesidade, RI e dislipidemias. De um perspectiva nutricional e de saúde pública, as

duas maiores preocupações são a elevada incidência da DHGNA em crianças e as fortes evidências que essa desordem é um fator de risco independente para as doenças cardiovasculares (MOORE, 2010).

A DHGNA pode progredir de um simples acúmulo de gordura (esteatose) macrovesicular nos hepatócitos para uma esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) (presença de infiltrado inflamatório e possivelmente fibrose), que pode passar para uma completa fibrose ou cirrose e, em último grau, para um carcinoma hepatocelular (COHEN et al., 2011). A patogênese da DHGNA no contexto da obesidade acontece pelo maior influxo de AGL proveniente de um tecido adiposo hipertrófico e RI (**Figura 1**) (ATTIE e SCHERER, 2009). A entrada dos ácidos graxos (AG) no hepatócito ocorre com a participação de proteínas transportadoras de ácidos graxos como a proteína 1 ligada ao ácido graxo (FABP-1) e a ácido graxo translocase (CD36/FAT), cuja translocação para a membrana é estimulada pela ação da insulina (SU e ABUMRAD, 2009).

Em condições fisiológicas, os AG são oxidados no interior da mitocôndria provendo a célula de trifosfato de adenosina (ATP) e acetil-CoA para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Entretanto, com o excesso de AG, como geralmente acontece no indivíduo obeso, esses entram na via de síntese direta de TG, onde a glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) adiciona dois AG na molécula de glicerol formando os diacilgliceróis (DAG), que são utilizados pela diacilglicerol aciltransferase (DGAT) para a adição de mais uma cadeia de AG formando os TG (BECHMANN et al., 2012). Além disso, a síntese de TG é potencializada pela lipogênese *de novo*, onde o excesso de insulina e glicose resultante da RI aumenta a expressão de fatores de transcrição lipogênicos como as proteínas ligadas aos elementos reguladores de glicose (ChREBP) e esterol 1c (SREBP1c), as quais induzem a expressão das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1) que participam da síntese de AG a partir de acetil-CoA. Esses novos AG serão esterificados pelas enzimas GPAT e DGAT formando mais TG, resultando na DHGNA (POSTIC e GIRARD, 2008).

O excesso de intermediários da síntese de TG, como os DAG, induzem RI no fígado (**Figura 1**), uma vez que ativam a translocação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ) do citosol para membrana, inibindo a propagação da sinalização insulínica, por diminuírem a autofosforilação do receptor de insulina nos resíduos de tirosina (SHULMAN, 2014). Essa RI, paradoxalmente, estimula ainda mais a lipogênese *de novo*, visto que a RI hepática é seletiva a via de controle

da gliconeogênese (LAPLANTE e SABATINI, 2010) (**Figura 2**). Esse processo é regulado, principalmente, pelo *forkhead box O1* (FOXO1), cuja fosforilação está diminuída pela RI, resultando em sua maior permanência no núcleo, o que estimula a produção de glicose hepática, através da maior expressão de enzimas da gliconeogênese como *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) e *glucose-6-phosphatase* (G6Pase). Por outro lado, nesse contexto, a insulina, induz uma maior atividade da SREBP-1c via *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), o que resulta em mais síntese de TG (**Figura 2**) (TASKINEN e BORÉN, 2015).

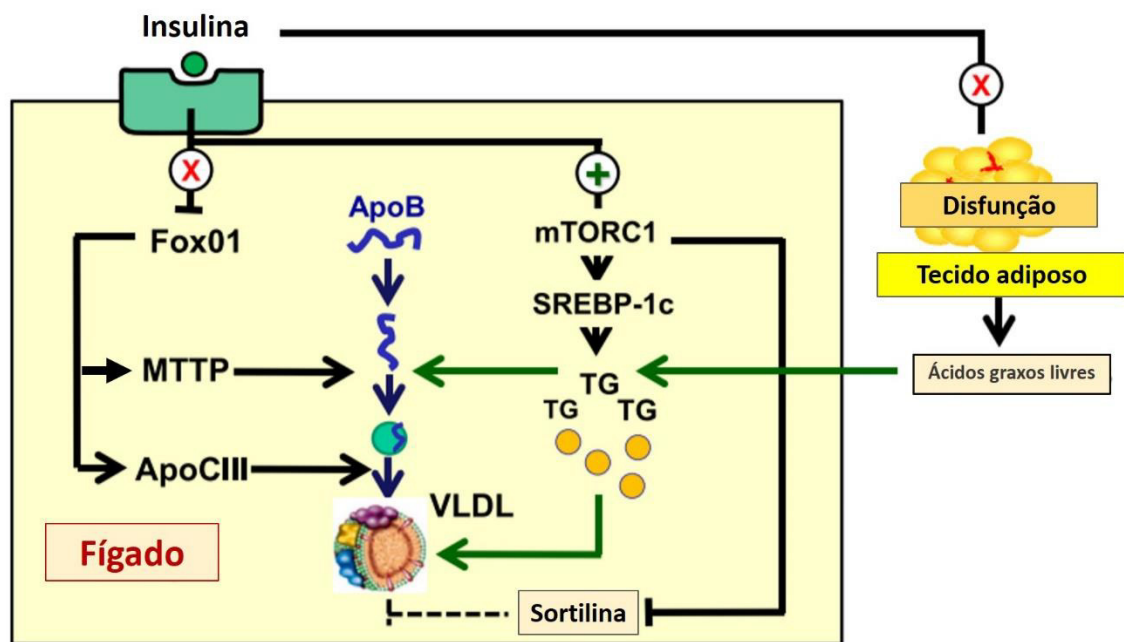


Figura 2. Consequências da resistência insulínica hepática seletiva. Na resistência insulínica associada à obesidade, há falha da insulina em suprimir a disfunção do tecido adiposo e a atividade da FOXO1 no fígado. Com isso, há o maior influxo de ácidos graxos e aumento das expressões da MTTP e ApoCIII nos hepatócitos, resultando em maior secreção de VLDL. Entretanto, ela estimula ainda mais a atividade da mTORC1, aumentando a lipogênese *de novo* via SREBP-1c, e diminuindo a degradação da ApoB pela inibição da sortilina. Tudo isso resulta em maior síntese de triglicerídeos (TG) e aumento da hipertrigliceridemia.

Fonte: Taskinen & Borén (2015) com modificações.

Na tentativa de diminuir a progressão da DHGNA, o fígado promove a exportação do excesso de TG através da formação de VLDL (**Figura 1**), que depende de uma atuação em conjunto das apolipoproteínas B (ApoB), CIII (ApoCIII) e da *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP), ocasionando aumento dos TG plasmáticos (CHOI e GINSBERG, 2011). Não obstante, essa hipertrigliceridemia também será potencializada e mantida pelo quadro de RI hepática em que FOXO1 mantida no núcleo aumenta a expressão da MTTP e APOCIII, e a maior atividade da mTORC1 provoca supressão da sortilina, que é uma proteína do maquinário lisossomal que aumenta a degradação da ApoB (STRONG et al., 2012) (**Figura 2**). Com isso,

o aumento das expressões da MTTP e ApoCIII e a menor degradação da ApoB é determinante para a manutenção da hipertrigliceridemia associada à DHGNA.

2.3 O estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela síntese e controle de qualidade de proteínas, além de controlar o estoque de Ca^{2+} , a detoxificação xenobiótica e biossíntese de lipídeos (VAN MEER et al., 2008). Proteínas bem enoveladas e maduras que passam pelo padrão de qualidade do RE são exportadas para o complexo de Golgi para posterior utilização pela célula, enquanto as mal enoveladas são alvo do sistema de degradação proteica associado ao RE (ERAD), que é a translocação dessas proteínas para o citosol para a degradação através da via ubiquitina/proteasoma. Quando ocorre um desbalanço entre a capacidade de enovelamento/maturação proteica e a degradação das proteínas mal enoveladas há acúmulo destas no interior do RE, resultando na ativação do estresse do RE, também chamado de *unfolded protein response* (UPR) (RON e WALTER, 2007).

O principal papel da UPR é restaurar a homeostase celular, diminuindo o acúmulo de proteínas mal enoveladas através da inibição da tradução e aumento da expressão de enzimas envolvidas no ERAD assim como aumento da capacidade de enovelamento dessa organela, principalmente via indução da expressão de chaperonas como as *glucose-regulated proteins* 78 (GRP78) e 94 (GRP94) e a *protein disulfide isomerase* (PDI), que atuam N-glicosilando e enovelando polipeptídeos nascentes em estruturas secundárias e terciárias, as quais são estabilizadas por pontes de dissulfeto (CNOP et al., 2012). A UPR é mediada primeiramente por três proteínas transmembrana do RE: a PERK (*eukaryotic translation initiation factor 2- α -kinase 3* ou *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*); IRE1 (*inositol-requiring 1*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*). Sob condições basais, esses três sensores estão ligados à mais abundante chaperona do RE, a GRP78 (também chamada de *binding immunoglobulin protein*; BiP), mantendo-os em estado inativo. Quando ocorre o estresse do RE, a GRP78 é sequestrada pelas proteínas mal enoveladas do lúmen, se desligando desses sensores, ativando, assim, a UPR (**Figura 3**) (WANG e KAUFMAN, 2016).

Após a liberação da GRP78, a PERK se homodimeriza resultando em autofosforilação que fosforiliza o eIF2 α (*eukaryotic translation initiation fator 2 α*) em serina 51. Essa ativação do eIF2 α inibi a formação do ribossomo 80S, ou seja, reduz o mecanismo traducional, o que

diminui a entrada de novas proteínas para o RE (DONNELLY et al., 2013). Paradoxalmente a essa inibição da síntese proteica, a ativação de eIF2 α aumenta a expressão do fator de transcrição ATF4 (*cyclic AMP-dependent transcription of factor 4*) (HARDING et al., 2000). A tradução de ATF4 é fortemente induzida sob condições de estresse do RE e pode conduzir a resposta mal adaptativa, pois aumenta a expressão de importante marcador pró-apoptótico da UPR, o *DNA damage-inducible transcript 3 protein*, também conhecido como *C/EBP homologous protein* (CHOP) (HARDING et al., 2000). O ATF4 também induz a expressão do *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34* (GADD34) que é capaz de desfosforilar o eIF2 α e reativar a tradução, *feedback* negativo essencial para a sobrevivência celular (HARDING et al., 2009). PERK também fosforila o *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), conduzindo ao seu desligamento do complexo com *kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) e consequente migração para núcleo, estimulando a tradução de enzimas antioxidantes, numa clara resposta de defesa celular (CULLINAN e DIEHL, 2004) (**Figura 3**).

O segundo braço da UPR envolve IRE1, proteína com atividades kinase e endoribonuclease (TIRASOPHON et al., 2000). Em resposta ao estresse do RE, a atividade RNase da IRE1 promove um singular *splicing* do RNAm da *X-box-binding protein 1* (XBP1), que irá gerar um potente fator de transcrição o XBP1 *spliced* (XBP1s) (YOSHIDA et al., 2001), o qual aumenta a expressão de componentes do ERAD, chaperonas e a biossíntese de fosfolípidos (CNOP et al., 2012). Este efeito produz expansão da membrana do RE, uma marca estrutural da ativação da UPR (SRIBURI et al., 2004). Independente da sua ação sobre a XBP1, IRE1 também pode diminuir a tradução, por aumentar a degradação de RNAm localizado nas proximidades do RE, por um mecanismo chamado *regulated IRE1-dependent decay* (RIDD) (MAUREL et al., 2014). Com o aumento da formação da XBP1s e ativação de RIDD, a IRE1 contribui para redução do estresse do RE. Entretanto, se esse estresse não for aliviado, a maior atividade da RIDD pode conduzir a morte celular através da redução de microRNAs que normalmente reprimem alvos pró-apoptóticos como *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) e caspase 2 (LERNER et al., 2012; UPTON et al., 2012). Além disso, por estar associado ao *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2), o IRE1 pode ativar *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) e JNK, favorecendo a apoptose (URANO et al., 2000; NISHITOH et al., 2002) (**Figura 3**).

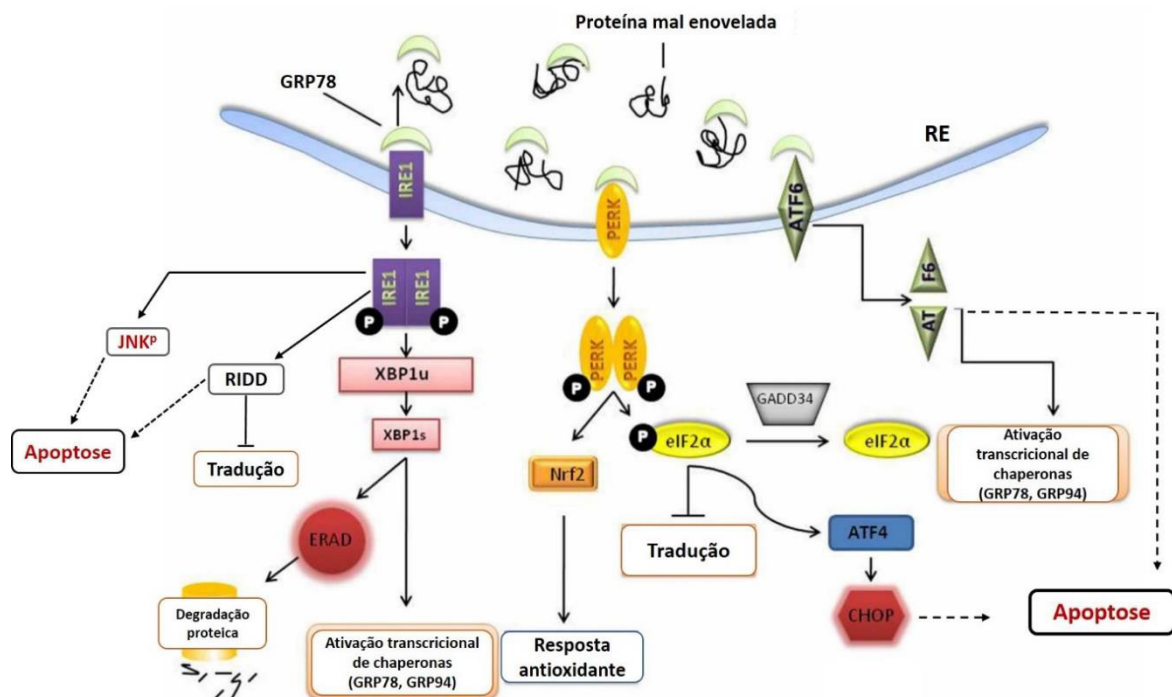


Figura 3. Ativação do estresse do retículo endoplasmático (RE) ou da *unfolded protein response* (UPR). O acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE leva a dissociação da GRP78 de três sensores transmembrana: PERK, IRE1 e ATF6. A PERK homodimeriza e fosforila eIF2α para inibir a tradução proteica. PERK também estimula fatores de transcrição como NRF-2 e ATF4, os quais induzem resposta antioxidante e pró-apoptótica via CHOP, respectivamente. O ATF4 também induz a expressão do GADD34 que defosforila o eIF2α e reativar a tradução. A ativação da IRE1 resulta em *splicing* da XBP1, formando a XBP1s que induz a transcrição de chaperonas (ex: GRP78 e GRP94) e estimula a degradação proteica via degradação associada ao RE (ERAD). A IRE1 também diminui a tradução através da sua atividade RNAse (RIDD), embora a cronicidade desse mecanismo possa induzir apoptose, que também é estimulado pela maior fosforilação da JNK. O ATF6 é ativado e clivado e conduz ao aumento de chaperonas, todavia sua ativação crônica também pode induzir apoptose via CHOP (BROWN e NAIDOO, 2007).

Fonte: Brown e Nidoo (2007) com modificações.

O ATF6 é o terceiro sensor da UPR, que também está inativo pela ligação da GRP78. Com a dissociação desta chaperona, ATF6 é translocado para o Golgi e é ativado por mecanismo de proteólise intramembrana regulado pelas proteases ligadas à membrana *site-1* (S1P) e 2 (S2P) (YE et al., 2000). Uma vez clivado, o domínio ativo do ATF6 é translocado para o núcleo, onde ele induz a expressão de genes que codificam chaperonas do RE e outros marcadores da UPR como a própria GRP78, além da GRP94, CHOP e XBP1, demonstrando o *crosstalk* que existe entre as vias envolvidas na UPR (HETZ et al., 2015) (**Figura 3**). Assim, a coordenada ativação desses três braços da UPR objetiva aliviar ou reverter o estresse do RE. Entretanto, se este estresse não for resolvido, esses sensores podem ativar vias de morte celular como o aumento da CHOP pela PERK e ATF6, além da maior expressão da caspase 2 e atividade da JNK pela IRE1.

2.4 O papel do estresse do RE sobre o metabolismo lipídico hepático

Hepatócitos sintetizam a maioria das proteínas séricas do sangue, como albumina, transferrina, lipoproteínas, proteínas do sistema complemento e fatores de coagulação. Além disso, essas células são expostas a nutrientes e poluentes que chegam pela veia porta. Com isso, o fígado apresenta um transitório ou mesmo fisiológico estresse do RE (BAICEANU et al., 2016). Por exemplo, em ratos realimentados seguidos de jejum, a UPR é rapidamente e transitoriamente ativada, embora a causa dessa indução da UPR não tenha sido elucidada (BODEN et al., 2011).

Não obstante, no contexto da DHGNA, o estresse do RE se torna crônico em resposta ao acúmulo de gordura no fígado. Com isso, a ativação da UPR hepática já foi demonstrada em camundongos e ratos com fígado gorduroso induzidas por obesidade genética (*ob/ob*), por dietas ricas em ácidos graxos saturados ou sacarose (ÖZCAN et al., 2004; WANG et al., 2006) e pela obesidade por L-glutamato monossódico (MSG) (FRANÇA et al., 2014). O estresse do RE também tem sido observado no fígado de pacientes com esteatose e esteato-hepatite (PURI et al., 2008; GREGOR et al., 2009). A perda de peso após cirurgia de *bypass* gástrico diminuiu tanto o acúmulo de lipídeos como os níveis dos marcadores da UPR no fígado de pacientes obesos (GREGOR et al., 2009).

O acúmulo de lipídeos no hepatócito induz estresse do RE por três mecanismos principais. O primeiro é por mudanças na composição das membranas do RE e consequente perturbação da homeostase do Ca^{2+} . Isso acontece porque a sobrecarga de lipídeos interfere na constituição da membrana dessa organela pelo aumento da razão fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, que são os fosfolipídeos de maior abundância (HYSLOP et al., 1981). A elevação dessa razão, além de aumentar o empacotamento de lipídeos na forma de *lipid droplets* e VLDL (KIM et al., 2010), altera a fluidez da membrana e, consequentemente, a atividade das bombas de Ca^{2+} -ATPase, diminuindo o Ca^{2+} no RE. Esse mecanismo é considerado uma das maiores causas de estresse do RE induzidas por lipídeos, uma vez que a maioria das chaperonas são dependentes desse cátion para exercer suas ações de enovelamento proteico (FU et al., 2011; ARRUDA e HOTAMISLIGIL, 2015). O segundo mecanismo é pelo grande aumento da síntese de proteínas necessárias para a formação dos *lipid droplets* e VLDL, como perilipina-2 e a apolipoproteína B100, gerando estruturas desenoveladas que induzem a

UPR (SHELNESS et al., 1999; LEE, J.-S. et al., 2012). O terceiro é por uma ativação direta dos lipídeos, visto que ácidos graxos saturados como o palmitato podem induzir ativação da PERK e IRE1 com deleções dos domínios luminais de detecção de proteínas mal enoveladas (PROMLEK et al., 2011; VOLMER et al., 2013).

Além de ser induzido pelo acúmulo de lipídeos no hepatócito, o estresse do RE tem sido apresentado como mecanismo mantenedor e de progressão da DHGNA. Dentre os mecanismos envolvidos nesse processo destaca-se a indução da lipogênese *de novo*. Fisiologicamente a síntese *de novo* de lipídeos é ativada principalmente pela ingestão de carboidratos, que servem tanto como substrato como estímulo para a liberação de insulina, que é o maior indutor da expressão de genes lipogênicos. (FERRE e FOUFELLE, 2010; WANG et al., 2015). Esses efeitos transcricionais da insulina são mediados pelo SREBP1c, cuja atividade, ao nível pós-traducional, é determinada pela sua clivagem proteolítica (FERRE e FOUFELLE, 2010). Diferente da maioria dos fatores de transcrição, SREBP1c reside na membrana do RE em um complexo com uma proteína de retenção chamada *insulin-induced gene 1 protein* (INSIG1), que após a ação da insulina, se dissocia da SREBP1c. Esta é então transportada para o complexo de Golgi onde é clivada para se tornar ativa (HEGARTY et al., 2005). A SREBP1c madura é então translocada para o núcleo para exercer sua atividade transcricional, aumentando a expressão das enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos como a ACC, FAS e SCD1 (XU et al., 2013).

Como explicado anteriormente, a atividade da SREBP1c continua aumentada mesmo com a diminuição da sensibilidade insulínica hepática (**Figura 2**). Uma outra explicação para esse paradoxo de aumento da lipogênese *de novo* mesmo com uma resistência insulínica hepática é o estresse crônico do RE. Primeiramente, isso pode ocorrer porque o estresse do RE induz diretamente a clivagem da SREBP1c, ou seja, de uma maneira independente da ação da insulina (CNOP et al., 2012). Também foi constatado que esse estresse no fígado de camundongos obesos é inibido pela superexpressão da GRP78, reduzindo a clivagem da SREBP1c e a expressão de enzimas lipogênicas, o que melhorou a esteatose e a resistência insulínica hepática (KAMMOUN et al., 2009). O mecanismo pelo qual isso acontece ainda não está completamente elucidado, mas pode envolver a degradação da INSIG1 pela ERAD (LEE e YE, 2004).

A UPR também pode induzir síntese *de novo* de forma indireta, via ativação da IRE1 e PERK. Sobre a IRE1, estudos mostram que a XBP1s eleva a expressão de enzimas lipogênicas

tanto por uma ação direta na região promotora dos genes dessas enzimas (LEE et al., 2008), como por estimular o aumento da expressão da SREBP1c (NING et al., 2011). Por outro lado, um estudo mais recente demonstra que a superexpressão da XBP1s no fígado de camundongos *ob/ob* e alimentados com dietas ricas em gordura ou frutose reduz a expressão de genes lipogênicos, além de induzir maior oxidação lipídica através da ativação de autofagossomos no interior dos *lipid droplets* (*macrolipophagy*) (HERREMA et al., 2016). Assim, o que há de consensual sobre a ação da XBP1s no metabolismo lipídico hepático é que ela induz aumento da exportação de triglicerídeos (hipertrigliceridemia) (HERREMA et al., 2016), através da maior formação de VLDL pelos aumentos da expressão e atividade da PDI e MTTP, respectivamente (WANG et al., 2012).

Sobre a atuação da PERK, um estudo demonstra que a deleção dessa proteína está associada a redução da lipogênese *de novo* em glândulas mamárias e adipócitos de camundongos (BOBROVNIKOVA-MARJON et al., 2008). Outros são consistentes em demonstrar que a defosforilação da eIF2 α pela superexpressão da GADD34 (OYADOMARI et al., 2008) ou a deleção do gene ATF4 (XIAO et al., 2013) protegem o fígado de camundongos contra a esteatose induzida por dieta rica em gordura ou frutose, respectivamente. Além disso, a ativação da via PERK-ATF4 aumenta a expressão do receptor de VLDL em hepatócitos, o que resulta em maior entrada de lipoproteínas para o fígado, contribuindo, assim, para a manutenção da DHGNA (JO et al., 2013).

Portanto, embora a ativação da UPR seja, em um primeiro momento, importante para diminuir o estresse do RE induzido pelo aumento dos lipídeos hepáticos, a não resolução desse maior acúmulo de gordura pode exacerbar o estresse do RE de uma maneira a induzir mais síntese de lipídeos, podendo tornar a ativação da UPR, no contexto da esteatose hepática, um ciclo vicioso, agravando o quadro da DHGNA pelo estímulo de vias inflamatórias e apoptóticas (**Figura 4**).

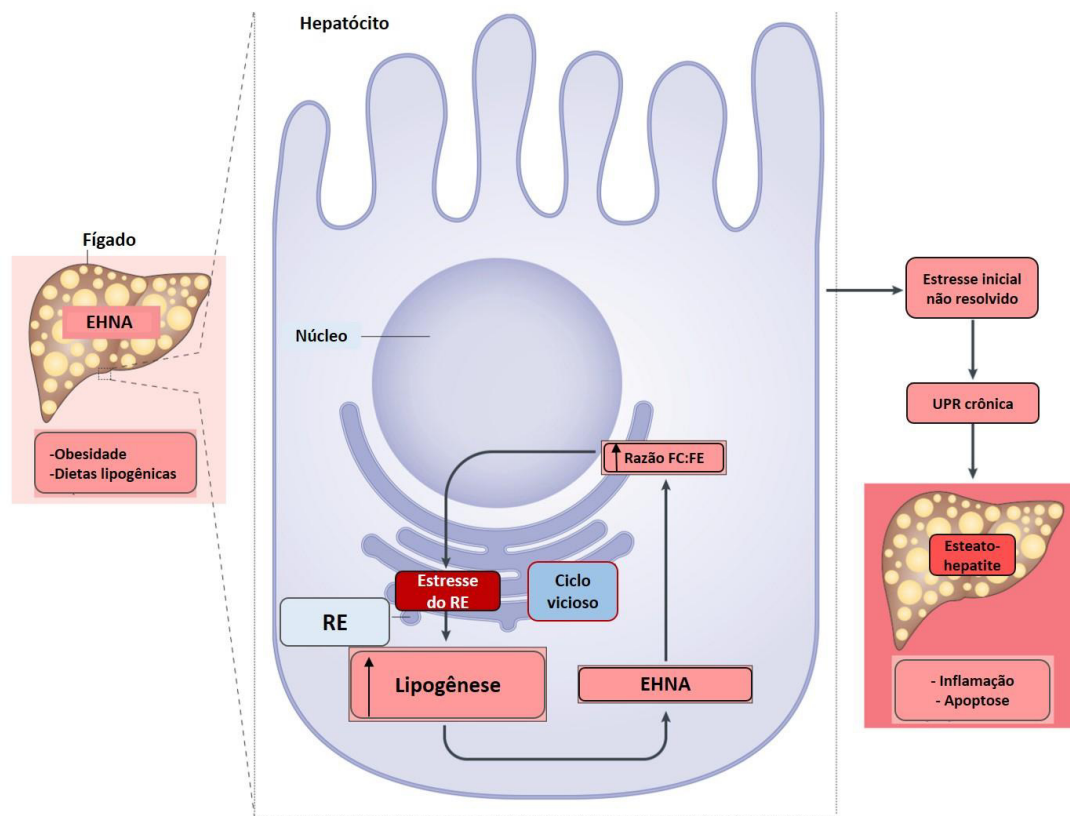


Figura 4. Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA): um ciclo vicioso. O acúmulo de lipídeos no hepatócito decorrente da obesidade ou de dietas lipogênicas promove modificações na composição da membrana do RE aumentando a razão fosfatidilcolina (FC):fosfatidiletanolamina (FE), o que induz estresse do RE por alterações na homeostase do Ca^{2+} . A ativação da *unfolded protein response* (UPR) tenta amenizar o acúmulo de gordura, mas se a sobrecarga lipídica não for diminuída, o estresse do RE torna o processo um ciclo vicioso por estimular lipogênese *de novo*. Isso contribui para manutenção e progressão da DHGNA, que pode evoluir para a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), caso esse ciclo não seja interrompido. Fonte: Baiceanu et al. (2016) com modificações.

2.5 Tratamento farmacológico da DHGNA

O manejo da DHGNA, assim como das outras patologias associadas à obesidade, deve ser focado em mudanças no estilo de vida, principalmente através do consumo de alimentos com baixos teores de carboidratos simples (sacarose, glicose e frutose) e gordura animal, associado ao aumento da atividade física (CHALASANI et al., 2012). Isso contribui para a manutenção de uma saudável distribuição da gordura corporal (circunferência da cintura < 94 cm em homens e <80 cm em mulheres), cujo acúmulo, principalmente na região abdominal é fator de risco direto não só para a esteatose hepática, mas para as outras desordens crônico-degenerativas (HAN e LEAN, 2015), como visto no primeiro tópico deste trabalho.

Embora as mudanças no estilo de vida, como destacado anteriormente, permaneçam como primeira linha de tratamento para a DHGNA, a dificuldade de adesão a longo prazo dos pacientes para essas mudanças permanecem um desafio que pode ser amenizado pela participação de uma equipe multiprofissional (MONTESI et al., 2016). Além disso, uma abordagem farmacológica muitas vezes poderia auxiliar de forma significativa a terapêutica dessa doença, como ocorre no DM2 e hipertensão (SOLEYMANI et al., 2016). Entretanto, até o momento, não há nenhum fármaco, aprovado pelos órgãos de regulamentação (ex: *Food and Drug Administration* – FDA, EUA), indicado para o tratamento da DHGNA. No entanto, estudos clínicos têm avançado na tentativa de validar fármacos que possam ter indicação específica para DHGNA (RINELLA e SANYAL, 2016), sendo os principais abordados abaixo.

A vitamina E apresenta-se como um dos compostos que mais se destacam para o tratamento dessa patologia hepática, visto que já foi avaliada em dois ensaios clínicos de fase IIb, sendo um em adultos (SANYAL et al., 2010) e o outro em crianças e adolescentes (LAVINE et al., 2011). Nesses ensaios, o tratamento com 800 UI por dia de vitamina E por 96 semanas melhorou a histologia hepática de pacientes com DHGNA sem diabetes, em relação ao placebo, embora em nenhum dos dois houve melhora da fibrose dos indivíduos (SANYAL et al., 2010; LAVINE et al., 2011). A toxicidade promovido pelo uso a longo prazo dessa vitamina permanece inconclusivo, uma vez que alguns estudos mostram esse uso associado a mortalidade (MILLER et al., 2005) e câncer de próstata (LIPPMAN et al., 2009) e outros não (YE et al., 2013; CURTIS et al., 2014). Além disso, uma meta-análise concluiu que essa vitamina parece possuir ação protetora sobre infartos trombóticos, fato que pode aumentar o risco de infartos hemorrágicos (SCHURKS et al., 2010). Com isso, os riscos e benefícios da utilização da vitamina E para o tratamento da EHNA deve ser bem avaliado pelo prescritor e os pacientes devem ser informados que seu uso é *off-label* (RINELLA e SANYAL, 2016).

Outro fármaco que apresenta vários ensaios clínico realizado em indivíduos com DHGNA é o sensibilizador de insulina pioglitazona, cujo o consumo diário de 30 mg melhorou as características histológicas da EHNA em vários ensaios clínicos (MAHADY et al., 2011). Contudo, o uso dessa tiazolidinediona é limitado pelos seus vários efeitos adversos como osteopenia, aumento do risco de fraturas, retenção de líquidos, insuficiência cardíaca congestiva, câncer de bexiga e ganho de peso, o qual continua após o tratamento (NEUSCHWANDER-TETRI et al., 2003; SANYAL et al., 2010).

Substâncias como a pentoxifilina e os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI ω -3) também devem ser destacados. A primeira apresenta potencial para tratamento da DHGNA, visto que, em dois estudos pilotos já realizados, a administração de 1200 mg diariamente por 12 meses reduziu a esteatose hepática dos pacientes sem efeitos adversos significantes em relação ao placebo (VAN WAGNER et al., 2011; ZEIN et al., 2011). Contudo, ensaios mais longos e com maior número de indivíduos são necessários para melhor entendimento do seu potencial contra a DHGNA. De forma diferente, apesar de trabalhos terem demonstrado os efeitos hipotrigliceridemiante (RAMBJOR et al., 1996; GRIMSGAARD et al., 1997) e de redução da EHNA (PARKER et al., 2012) em humanos tratados com AGPI ω -3, em três ensaios mais recentes, com 12 meses de duração e várias doses utilizadas, esses ácidos graxos não foram capazes de melhorar a esteatose hepática dos pacientes (SANYAL et al., 2014; ARGO et al., 2015; DASARATHY et al., 2015), fazendo com que sua efetividade sobre essa patologia seja questionada.

Há algum tempo os ácidos biliares tem se mostrado não apenas reguladores da homeostase lipídica intestinal, mas também capazes de controlar vias lipídicas através de receptores específicos em outros tecidos, como o hepático (THOMAS et al., 2008). Por exemplo, a ativação do receptor nuclear de ácidos biliares farnesoide X (FXR) reduz a trigliceridemia de camundongos dislipidêmicos induzidos por dieta ocidental através da diminuição da lipogênese hepática (EVANS et al., 2009). Assim, tem se estudado cada vez mais o uso desses ácidos para desordens do metabolismo lipídico (LI e CHIANG, 2014). Um exemplo é o ácido obeticólico, um semissintético, que em um ensaio piloto a administração de 25 ou 50 mg por 6 meses aumentou a sensibilidade insulínica e reduziu marcadores inflamatórios e de fibrose hepática em pacientes com EHNA e DM2 (MUDALIAR et al., 2013). Ademais, em um único ensaio considerado de fase II, com mais de 140 indivíduos por grupo, o tratamento com 25 mg/dia com esse ácido biliar durante 18 meses melhorou a EHNA analisado após biópsia do fígado, embora tenha havido elevação do colesterol-LDL após o tratamento (NEUSCHWANDER-TETRI et al., 2015).

Por fim, há a liraglutida, análogo do *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), que é licenciada para o tratamento do DM2 associado ao sobrepeso desde 2009 (ARMSTRONG et al., 2016). Estudos em murinos com EHNA tem demonstrado que tanto essa (MELLS et al., 2012) como outros análogos da GLP-1 (LEE, J. et al., 2012; TREVASKIS et al., 2012) melhoram o perfil lipídico hepático desses animais. Além disso, outros trabalhos reportaram que esses análogos

podem agir, *in vitro*, diretamente em hepatócitos humanos, reduzindo a esteatose pela diminuição da lipogênese *de novo* e aumento da oxidação de ácidos graxos (DING et al., 2006; GUPTA et al., 2010; BEN-SHLOMO et al., 2011). Entretanto, avaliações sobre os efeitos desses compostos sobre fígado gorduroso se restringiam a estudos de casos (TUSHUIZEN et al., 2006; ELLRICHMANN et al., 2009) até ARMSTRONG et al. (2016) realizarem um ensaio de fase 2, onde o tratamento com injeções subcutâneas de liraglutida (1,8 mg/dia) por 48 semanas reverteu a EHNA de pacientes com sobrepeso em relação ao placebo. Contudo, além desse fármaco ter apresentado efeitos adversos intestinais, não fica claro quanto o grau de redução de peso apresentado pelo grupo tratado pode ter contribuído para a melhora do perfil hepático dos indivíduos (ARMSTRONG et al., 2016).

2.6 *Syzygium cumini* (L.) Skeels e suas potencialidades para o tratamento de distúrbios metabólicos

Como visto anteriormente, a busca por agentes farmacológico que possam ser utilizados especificamente para tratamento da DHGNA tem avançado, principalmente pelos importantes efeitos deletérios dessa patologia tanto ao nível hepático como sistêmico (LONARDO et al., 2018). Contudo, o risco-benefício do uso *off-label* deve ser bem avaliado pelos prescritores, visto que os relatos de efeitos adversos também foram frequentes quando da utilização dos fármacos relatados acima. Além disso, por se tratar de uma desordem multifatorial (BYRNE e TARGHER, 2015), há carência de estudo mais prolongados, com maior número de indivíduos e com comorbidades como obesidade e/ou DM2 presentes. Neste contexto, as plantas medicinais podem se destacar como uma potencial ferramenta terapêutica que pode atuar em vários alvos ao mesmo tempo, visto que possuem uma grande variedade de compostos bioativos com característica químicas e farmacológicas diferentes (MUKHERJEE et al., 2015).

A família Myrtaceae compreende em torno de 121 gêneros com 3800-5800 espécies de arbustos e árvores distribuídas principalmente em áreas tropicais e subtropicais (STEFANELLO et al., 2011). Dentre as várias espécies dessa família daremos destaque para *Syzygium cumini* (L.) Skeels (sinonímia: *Syzygium jambolanum* D.C., *Eugenia jambolana* Lam.). Este vegetal é uma árvore de grande porte com frutos violetas escuros quando maduros (**Figuras 5A e B**), nativa da Indomálasia, mas amplamente cultivada em vários países da África, Ásia e América do Sul (SRIVASTAVA e CHANDRA, 2013). É popularmente conhecida como

black plum ou *jambolan* na língua inglesa, *jan* ou *jamun* na Índia, *guayabo* *pesgua* em países de língua espanhola e jambolão ou jamelão no Brasil (LIM, 2012).

A várias partes de *S. cumini* são amplamente usadas na medicina tradicional para tratamento de uma grande variedade de desordens. As folhas são utilizadas para constipação, leucorreia, gastropatias e dermatopatias (BHANDARY et al., 1995); as cascas como adstringente, antihelmintico e carminativo (KUNWAR et al., 2009); os frutos usados no tratamento de faringites e doenças esplênicas; enquanto as sementes como adstringente e diurético (BALIGA et al., 2011). Entretanto, o mais propalado uso de *S. cumini*, sendo comum a todas as partes da planta é como antidiabético, com estudos que reportam o relato desse uso tradicional na medicina ocidental há mais de 100 anos (HELMSTÄDTER, 2008). Além disso, estudos mais recentes têm demonstrado a sua utilização para o tratamento da hiperlipidemia (BRABOZA DA SILVA et al., 2012) e perda de peso (DICKEL et al., 2007; CERCATO et al., 2015). Por isso e pela sua grande presença e uso em nosso país, *S. cumini* foi reconhecido pelo Ministério da Saúde do Brasil como uma espécie relevante no nosso contexto etnofarmacológico através da sua presença na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009).

A



B



Figura 5. *Strychnos cumini* (L.) Skeels. **A.** Imagem de um espécime no campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA. **B.** Detalhes da folhas e frutos da espécie.
Fonte: própria.

As potencialidades do *S. cumini* sobre desordens do metabolismo foram destacadas recentemente pelo nosso grupo (CHAGAS et al., 2015). Sobre seus efeitos em distúrbios da

homeostase glicêmica, o tratamento com o extrato das sementes rico em flavonoides reduziu a glicemia e melhorou a tolerância à glicose em ratos com diabetes induzidos com estreptozotocina (STZ) (SHARMA, BALOMAJUMDER, et al., 2008; SHARMA, VISWANATH, et al., 2008). Esses efeitos podem ser atribuídos tanto ao aumento da atividade da glicose-6-fosfatase e hexoquinase no fígado dos animais STZ, o que aumenta a biossíntese de glicogênio, como por um efeito insulínico nas células- β desses animais, favorecendo a maior captação da glicose periférica (SHARMA, BALOMAJUMDER, et al., 2008). Extratos das folhas também apresentaram efeitos anti-hiperglicêmicos *in vivo* (SOARES et al., 2000; SCHOENFELDER et al., 2010). Entretanto, poucos estudos tentam demonstrar os mecanismos pelos quais as folhas podem promover essas ações, destacando-se uma avaliação *in vitro* em que a incubação de células musculares L6 com o extrato metanólico das folhas por 24 h aumentou a captação da glicose associado à elevação das expressões do GLUT-4 e *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3 kinase) (ANANDHARAJAN et al., 2006). Além dessa ação *insulin-simile*, dado recente do nosso grupo constatou uma ação insulínica do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* tanto em ilhotas isoladas de ratos resistentes à insulina tratados por 30 dias (500 mg/kg/dia), como em células- β humanas INS-1E incubadas por 1 h com esses extrato (100 μ g/mL) (SANCHES et al., 2016).

Nas desordens do metabolismo lipídico, a maioria dos trabalhos se restringem em avaliar o efeito do *S. cumini* em ratos diabéticos por STZ, que também apresentam dislipidemias. Nesses animais, o tratamento com os extratos rico em flavonoides das sementes (300 mg/kg/ dia, 15 dias) (SHARMA, VISWANATH, et al., 2008), hidroalcoólico da amêndoa da semente (100 mg/kg/dia, 30 dias) (RAVI et al., 2005) e aquoso da polpa dos frutos nas doses de 100 e 200 mg/kg (REKHA et al., 2008) reduziu as concentrações séricas de colesterol total (CT), colesterol-HDL e triglicerídeos (TG). A administração de uma única dose (125 mg/kg) do extrato etanólico das folhas reduziu o CT e TG plasmáticos de ratos diabéticos induzidos por aloxana (SCHOENFELDER et al., 2010). Além disso, um estudo recente constatou que a suplementação com o pó das sementes (10g/dia) melhorou significativamente a dislipidemia de pacientes com DM2 a partir do 60º dia de administração (SIDANA et al., 2016).

Como essas ações do *S. cumini* sobre as dislipidemias muitas vezes são consideradas efeitos secundários a sua ação hipoglicêmica, há poucos estudos que tentam elucidar por quais mecanismos hipolipêmicos essa espécie esteja agindo. Uma das suposições pode ser pelo possível aumento da atividade dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ

(PPAR- γ) e α (PPAR- α) observado em adipócitos 3T3-L1 após a incubação com o extrato rico em flavonoides das sementes por 24 h (SHARMA, VISWANATH, et al., 2008). Como exposto anteriormente, o fígado é um órgão chave no controle do metabolismo lipídico, entretanto o único estudo que avaliou a ação dessa espécie sobre a lipogênese hepática foi o nosso, em que o tratamento com extrato hidroalcoólico rico em polifenóis (500 mg/kg) por 30 dias diminuiu a esteatose hepática de ratos obesos induzidos pelo L-glutamato monossódico (MSG), sendo, também, o primeiro estudo que avalia o efeito dessa planta em um modelo de obesidade (SANCHES et al., 2016).

Como destacado por a CHAGAS et al. (2015), há numerosos compostos identificados no *S. cumini* que podem ser responsáveis por essas ações sobre as desordens metabólicas propaladas acima. Os primeiros que podemos enfatizar são os flavonoides como a rutina (0,5-8 mM), que aumenta a secreção de insulina em ilhotas de ratos STZ (ESMAEILI et al., 2009); além de estimular a atividade da hexoquinase e inibir da frutose-1,6-bifosfatase no fígado e músculo de ratos diabéticos STZ, diminuindo a produção de glicose por esses tecidos (**Figura 6**) (PRINCE e KAMALAKKANNAN, 2006). A quercetina também melhora a homeostase glicêmica tanto por uma atividade secretagoga de insulina através da ativação dos canais de cálcio tipo-L em células- β pancreática (**Figura 6**) (BARDY et al., 2013), como por aumentar a concentração plasmática de adiponectina em ratos alimentados com dieta rica em gordura, fato que está diretamente relacionado a uma maior sensibilidade insulínica periférica observada nesses animais (WEIN et al., 2010).

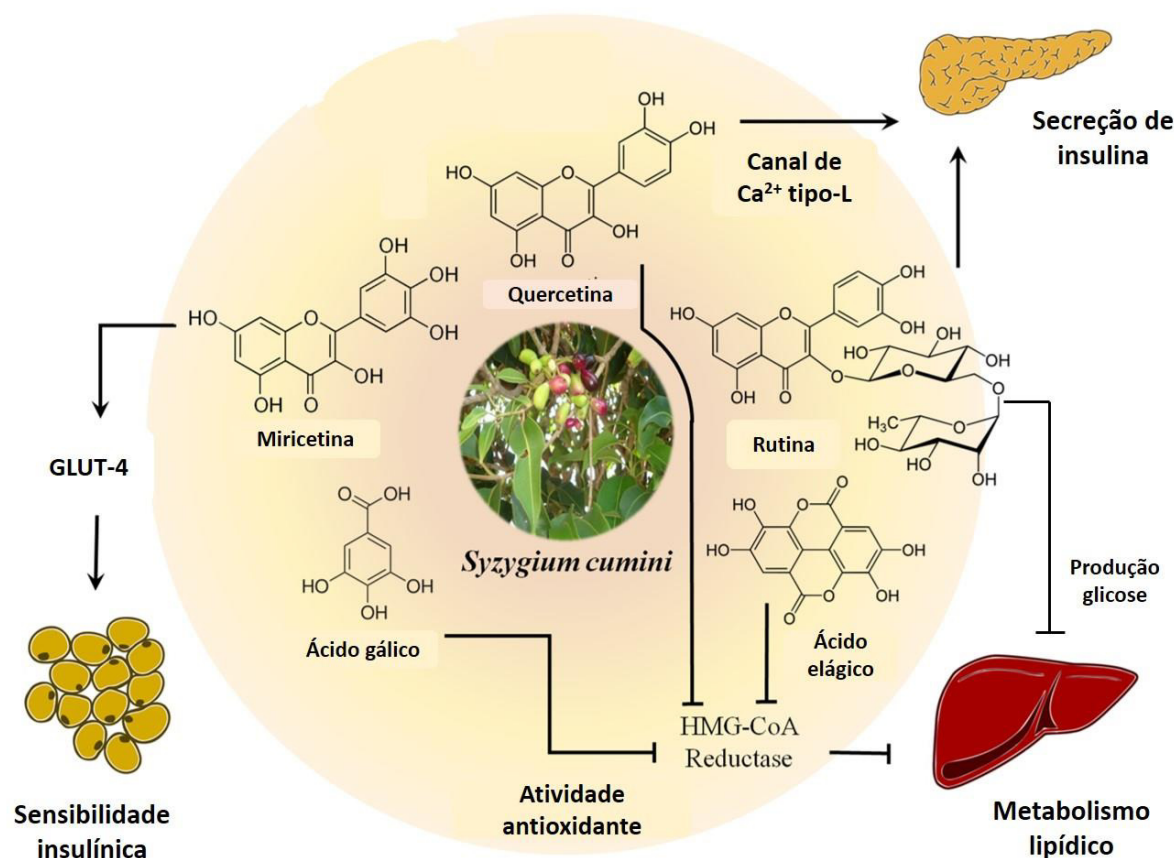


Figura 6. Compostos polifenólicos identificados no *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica. A quercetina e rutina podem diminuir a hiperglicemia pelo estímulo da secreção de insulina através do bloqueio de canais de Ca²⁺ tipo L nas células-β pancreáticas. Além disso, a rutina contribui através da inibição da produção hepática de glicose por aumentar a atividade da hexoquinase e diminuir a frutose-1,6-bifosfatase no fígado. A miricetina melhora a sensibilidade insulínica periférica por aumentar a expressão de GLUT-4 no tecido adiposo branco. Ácido gálico, quercetina e rutina diminuem a síntese de colesterol por inibirem a HMG-CoA redutase hepática. Além desses efeitos, a atividade antioxidante característica desses compostos e do *S. cumini* pode ser determinante para melhora das alterações glicêmicas e lipídicas observada na síndrome metabólica.

Fonte: Chagas et al. (2015) com modificações.

A miricetina, que é um dos mais prevalentes polifenóis das folhas de *S. cumini* (CHAGAS et al., 2015) pode reduzir a hiperglicemia por aumentar a expressão do GLUT-4 tanto no músculo esquelético como no tecido adiposo branco (**Fig. 6**) (LIU et al., 2007). Além disso, ela estimula oxidação lipídica hepática através do aumento da expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α (PPAR- α) no fígado (CHANG et al., 2012). Outros polifenóis presentes em várias partes dessa espécie como o ácido gálico (PUNITHAVATHI et al., 2011), ácido elágico (KANNAN e QUINE, 2013) e quercetina (BOK et al., 2002) podem inibir a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) redutase hepática, enzima limitante da síntese de colesterol (BJÖRKHEM et al., 2013) (**Figura 6**).

O estresse oxidativo é fator etiológico e mantenedor de várias patologias, dentro das desordens metabólicas, a hiperglicemia e hiperlipidemia decorrente da alimentação induzem desbalanço redox, tanto pelo maior vazamento de elétrons mitocondriais decorrente do excesso de nutrientes como pela ativação das NADPH oxidase, complexo enzimáticos produtor de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (SPAHS et al., 2016). Essa maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio diminuem a β -oxidação lipídica e induzem vias de resistência insulínica em todos os tecidos através da maior ativação de quinases de serina/treonina como a JNK e IKK β (HENRIKSEN et al., 2011). Essas espécies reativas podem, ao mesmo tempo que diminuem a sensibilidade insulínica, ativar a UPR por alterarem a atividade de chaperonas como a PDI, podendo, dessa forma, estimular vias lipogênicas, inflamatórias e apoptóticas através do estresse do RE (ASHRAF e SHEIKH, 2015).

Como visto anteriormente, a espécie *S. cumini* apresenta uma grande quantidade de compostos polifenólicos, fazendo com que ela tenha uma elevada capacidade antioxidante. Essa propriedade já foi comprovada em vários estudos *in vitro* através de uma atividade *scavenger* de espécies radicalares como o DPPH $\cdot$ e ABTS $\cdot^+$ observado com os extratos metanólico (ESHWARAPPA et al., 2014) e hidroalcoólico (SANCHES et al., 2016) das folhas, e etanólico das frutas e sementes (AQIL et al., 2012). Avaliações *in vivo* também demonstram que o tratamento com o extrato aquoso das sementes reduziu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes como glutathione S-transferase, superóxido dismutase e catalase em camundongos com estresse oxidativo induzido por uretano 7,12-dimetil benzotraceno (ARUN et al., 2011). O extrato metanólico dos frutos reduziu a formação de malondialdeído hepático e aumentou os níveis de glutathione reduzida em ratos injetados com ciclofosfamida (TRIPATHI et al., 2013). Com isso, essa ação de controle do desbalanço redox, pode ser, em parte, a responsável pelos efeitos do *S. cumini* sobre as desordens metabólicas (**Figura 6**).

Entretanto, são escassos os estudos que avaliem a ação dessa espécie em modelos experimentais de desordens do metabolismo lipídico como a DHGNA e dislipidemias associado à obesidade, existindo apenas um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo em que observamos uma redução da lipotoxicidade hepática e sistêmica de animais obesos MSG tratados com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* (SANCHES et al., 2016). Além disso, não existe na literatura avaliações do efeito dessa planta no controle ou

modulação do estresse do retículo endoplasmático, que, como vimos, é um importante mecanismo associado ao surgimento e manutenção dessas patologias.

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos hipolipemiante e de reversão da doença hepática gordurosa não-alcoólica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) em roedores obesos-MSG.

3.2 Específicos

Verificar se o tratamento com o EHSc promove alterações morfométricas em roedores obesos-MSG;

Avaliar a atividade lipolítica do tecido adiposo branco desses roedores obesos tratados com EHSc;

Investigar o efeito do tratamento com EHSc sobre a morfologia e conteúdo lipídico do fígado desses roedores obesos;

Avaliar o efeito de uma única administração do EHSc sobre a hipertrigliceridemia aguda;

Determinar os perfis lipídico, lipoprotéicos, glicêmicos e de resistência insulínica dos animais obesos tratados com o EHSc;

Verificar o efeito do tratamento com esse extrato sobre a expressão de fatores de transcrição, enzimas e proteínas reguladoras de vias de síntese e exportação de lipídeos hepáticos;

Avaliar a expressão hepática de marcadores do estresse do retículo endoplasmático dos animais obesos-MSG tratados com EHSc.

4 Resultados

4.1 Artigos publicados durante o doutorado

CHAGAS, VINICYUS TELES; **FRANÇA, LUCAS MARTINS**; MALIK, SONIA ; PAES, ANTONIO MARCUS DE ANDRADE. **Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 6, p. 1-8, 2015. (Anexo A).

Fator de impacto: 4,418

Qualis Medicina I: A2

SANCHES, JONAS R.; **FRANÇA, LUCAS M.**; CHAGAS, VINICYUS T.; GASPAR, RENATO S. ; DOS SANTOS, KAYQUE A. ; GONÇALVES, LUCIANA M. ; SLOBODA, DEBORAH M. ; HOLLOWAY, ALISON C. ; DUTRA, RICHARD P. ; CARNEIRO, EVERARDO M. ; CAPPELLI, ANA PAULA G. ; PAES, ANTONIO MARCUS DE A. **Polyphenol-Rich Extract of Syzygium cumini Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 7, p. 1-16, 2016. (Anexo B).

Fator de impacto: 4,418

Qualis Medicina I: A2

GASPAR, RENATO SIMÕES; BENEVIDES, RENATA OHANA ALVES; FONTELLES, JOÃO LUCAS DE LIMA ; VALE, CAROLINE CASTRO ; **FRANÇA, L. M.** ; BARROS, PAULO DE TARSO SILVA ; PAES, A. M. A. . **Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG-obese female rats.** *Journal of Endocrinology*, v. 229, p. 61-72, 2016. (Anexo C).

Fator de impacto: 4,038

Qualis Medicina I: A2

PINTO, BRUNO ARAÚJO SERRA; MELO, THAMYS MARINHO ; FLISTER, KARLA FRIDA TORRES ; **FRANÇA, L. M.** ; KAJIHARA, DANIELA ; TANAKA, LEONARDO YUJI ; LAURINDO, FRANCISCO RAFAEL MARTINS ; PAES, A. M. A. . **Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats.** *Metabolic Brain Disease*, v. 31, p. 1-11, 2016. (Anexo D).

Fator de impacto: 2,603

Qualis Medicina I: B1

4.2 CAPÍTULO I – Polyphenol-rich Extract of *Syzygium cumini* Leaves Reverts Hypertriglyceridemia Via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-glutamate-induced Obese Rats

Lucas Martins França ¹, Caio Fernando Ferreira Coêlho ¹, Larissa Nara Costa Freitas ¹, Victor Debbas ², Thais Martins de Lima ³, Heraldo Possolo de Souza ³, Francisco Rafael Martins Laurindo ², Antonio Marcus de Andrade Paes ^{1*}

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

² Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

³ Laboratory of Medical Investigation (LIM-51), Emergency Medicine Department, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

***Corresponding author**

Antonio Marcus de Andrade Paes, PhD.

Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, N. 1966. São Luís, MA, 65080-805 (Brazil).

Tel. +55 98 33018557

marcuspaes@ufma.br

Journal

Cellular Physiology and Biochemistry

Fator de impacto (2015): 5,104

Qualis Medicina I: A1

Abstract

Background/Aims: *Syzygium cumini* has been traditionally used for the treatment of metabolic syndrome associated disorders. In a previous report, we described the anti-hypertriglyceridemic effect of a polyphenol-rich extract of *S. cumini* leaf (HESc) in monosodium L-glutamate (MSG) obese rats. Thus, the present work sought to investigate the molecular mechanism underlying that effect. **Methods:** MSG obese Wistar rats were orally treated with HESc (0.5 or 1.0 g/kg/day) or saline solution (0.1 ml/100 g/day) for 8 weeks. Moreover, acute effects of HESc on Triton WR1339-induced hypertriglyceridemic Wistar rats were also assessed. **Results:** HESc decelerated weight gain without altering food intake of obese rats. HESc also decreased fasting serum levels of glucose, total cholesterol, triglyceride and free fatty acids, as well as insulin resistance index TyG. Fast protein liquid chromatography analysis showed that HESc halved triglyceride content into very low-density lipoprotein particles, as well as restored liver steatosis on obese rats. Hepatic protein expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP 94 was decreased. HESc downregulated triglyceride secretion pathway by reducing the splicing of X-box binding protein 1 (XBP-1s), as well as expression of protein disulfide isomerase (PDI) and microsomal triglyceride-transfer protein (MTP). This action was further corroborated by the acute inhibitory effect of HESc on triglyceride accumulation on Triton WR1339-treated rats. **Conclusion:** Our data support the downregulation of XBP-1s/PDI/MTP axis as a feasible mechanism for the anti-hypertriglyceridemic effect promoted by the polyphenolic phytocomplex within *S. cumini* leaf.

Keywords: *Syzygium cumini*, Endoplasmic reticulum stress, hypertriglyceridemia, liver, jambolan, microsomal triglyceride-transfer protein.

4.2.1 Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered the main hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS) [1]. Under MetS, white adipose tissue hypertrophy causes local insulin resistance that, in turn, increases adipocyte lipolytic activity and decreases free fatty acids (FFA) recycling, raising serum FFA levels. Increased FFA uptake by hepatocytes leads to ectopic fat accumulation and lipotoxicity due to the limited liver capacity to oxidize and/or export FFA excess [2]. Hyperinsulinemia additionally imposes *de novo* lipogenesis oversizing hepatic fat accumulation, an outcome partially compensated by increased triglycerides (TG) secretion via very low-density lipoprotein (VLDL) particles, but that ultimately leads to hypertriglyceridemia [3]. Hypertriglyceridemia is an independent risk factor for cardiovascular diseases, which are the leading cause of morbimortality worldwide [4].

Despite the abovementioned processes, molecular mechanisms involved in MetS-related NAFLD and hypertriglyceridemia remains unclear. Recently, endoplasmic reticulum (ER) stress has been shown to play an important role mainly related to the unfolded protein response (UPR) that occurs when ER capacity to properly fold nascent proteins becomes overloaded and causes malformed proteins accumulate within the lumen [5]. The latter elicits inositol-requiring enzyme 1 α (IRE-1 α) phosphorylation and subsequent splicing of X-box binding protein 1 (XBP-1) mRNA to render the spliced XBP-1 (XBP-1s), a transcription factor importantly involved in the reestablishment of ER homeostasis during UPR [6]. Several studies conducted by us and others have consistently demonstrated the importance of the IRE1 α /XBP-1s pathway in the control of hepatic lipid metabolism, through both lipogenesis induction [7, 8] and stimulation of TG secretion via activation of microsomal triglyceride-transfer protein (MTP) and protein disulfide isomerase (PDI) expression in hepatocytes [9, 10]. Hence, this XBP-1s/PDI/MTP axis has emerged as a potential therapeutic target for the treatment of lipid metabolism disorders, specially hypertriglyceridemia [11].

Syzygium cumini (L.) Skeels (syn: *S. jambolanum* D.C., *Eugenia jambolana* Lam.) is an Indian native tree from Myrtaceae family widely cultivated throughout the world and popularly known as jambolão, jambolan, java plum or black plum [12]. *S. cumini* is traditionally used to treat a variety of illnesses, most of them already validated by pharmacological studies, including those related to MetS such as inflammation [13], type II *diabetes mellitus* [14], weight loss [15], hyperlipidemia [16] and oxidative stress [17]. Recently, we showed that the polyphenol-rich hydroethanolic extract of *S. cumini* leaf (HESc) improved the metabolic profile of monosodium

L-glutamate (MSG)-induced obese rats, specially by reverting TG accumulation in both liver and serum. These effects were related to the improvement of peripheral insulin sensitivity and insulin secretion modulation, pharmacological properties ascribed to the polyphenolic phytocomplex within HESc, which is mainly composed by myricetin derivatives, as well as other flavonoids and tannins [18].

The ethnopharmacological relevance of *S. cumini* has been recognized by the Brazilian Ministry of Health, which included it in the National Index of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System, acronymically RENISUS [19]. Accordingly, we have recently highlighted the therapeutic potential of several parts of *S. cumini* for the treatment of cardiometabolic disorders [20]. Thus, taking into account our previous reports that hypertriglyceridemia in MSG-obese rats is associated to activation of the XBP-1s/PDI/MTP axis [9] and that HESc reverted their characteristic NAFLD and hypertriglyceridemia [18], in the present study we sought to investigate the molecular mechanisms underlying the anti-hypertriglyceridemic activity of HESc in MSG-obese rats.

4.2.2 Materials and Methods

4.2.2.1 Plant material and polyphenol-rich hydroethanolic extract preparation

S. cumini leaves were collected from specimens located in the Dom Delgado Campus (2°33'11.7''S 44°18'22.7''W) of the Federal University of Maranhão (Universidade Federal do Maranhão – UFMA; São Luís, Maranhão, Brazil). An exsiccated sample of the plant species was identified by Prof. Dr. Eduardo Bezerra Almeida Jr., botanist at the Herbarium of Maranhão (MAR), and stored under the register number 4574. After collection, HESc was obtained as previously described [18]. Upon lyophilization, HESc powder was freshly resuspended in 0.9% NaCl at proper concentrations for administration to the animals. Polyphenolic composition of HESc has been previously characterized [18] and the main compounds identified by HPLC-MS/MS are shown in Figure 1.

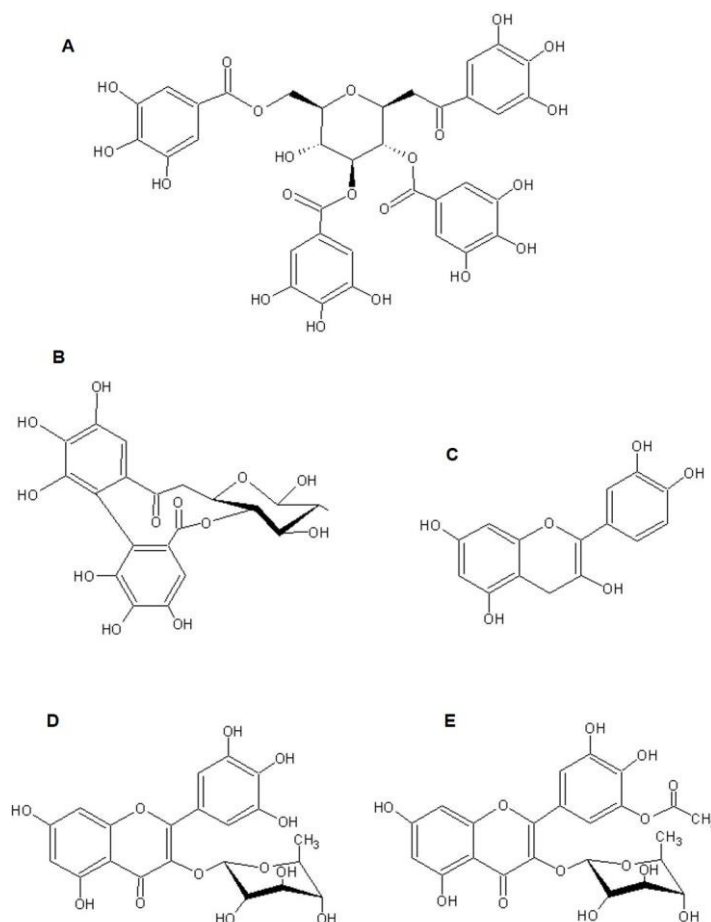


Figure 1. Main phenolic compounds identified in polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc). (A) Tetragalloylglucose, (B) hexahydroxydiphenyl-glucose, (C) quercetin, (D) myricetin deoxyhexoside and (E) acylated myricetin deoxyhexoside.

4.2.2.2 MSG-obesity induction and experimental design

Newborn male Wistar rats were subcutaneously injected with the MSG solution (4 g/kg/day, Sigma-Aldrich, USA, Cat# G1626) or equimolar saline solution (0.1 mL/kg/day) accordingly to our previous report [9]. From birth, all animals were kept under controlled conditions of temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and light (12 h light/12 h dark) with filtered water and regular chow (Nuvilab CR-1, Brasil) provided *ad libitum*. At 8 weeks of age, obesity development was assessed by calculating the Lee index (LI) [body weight (g)^{1/3}/naso-anal length (cm) x 1000] [21]. MSG obese rats and their appropriated lean controls were randomized and divided into 4 groups, as follows: **Lean**: lean rats receiving 0.1 mL/kg/day saline solution ($n = 7$); **Obese**: MSG-obese rats receiving 0.1 mL/kg/day saline solution ($n = 7$); **Obese+HESc**

0.5: MSG-obese rats receiving 0.5 g/kg/day HESc ($n = 7$); **Obese+HESc 1.0:** MSG-obese rats receiving 1.0 g/kg/day HESc ($n = 7$).

Body weight and food intake were measured twice a week throughout 8 weeks of treatment. At the end, the LI was again calculated to evaluate the effects of the treatment on body mass. Next, upon overnight fasting, animals were anesthetized for blood collection via abdominal aorta puncture, followed by euthanasia by exsanguination. The liver and both retroperitoneal and periepididymal fat pads were collected and weighed for morphometric evaluation and other analyses. All protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Maranhão under ruling number 23115.01983/2013-41 (ANEXO E).

4.2.2.3 Serum biochemical analysis and assessment of insulin resistance

Glucose, total cholesterol (TC), TG, FFA, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were assessed in serum samples using spectrophotometric commercial kits according to manufacturers' instructions (Labtest, MG, Brazil and Wako, VA, USA). Insulin resistance was inferred by calculating the TyG index ($\text{TyG} = \text{Ln} [\text{fasting TG (mg/dL)} \times \text{fasting GL (mg/dL)/2}]$) [22].

4.2.2.4 Liver histological analysis

Liver slides stained with hematoxylin-eosin (HE) were assessed for determination of the NAFLD activity score (NAS), where 2 independent researchers performed a double-blind analysis of the degrees of steatosis, hepatocellular ballooning and lobular inflammation [23].

4.2.2.5 Liver lipid profile

The hepatic lipid profile was assessed as previously described [24]. Briefly, a chloroform:methanol (2:1) solution was used to extract total fat from 500 mg liver samples, which were resuspended in a Triton-X100:Methanol (2:1) solution for measurement of TG and TC levels as described in section 2.3.

4.2.2.6 *Chromatographic analysis of serum lipoproteins*

Serum lipoproteins were separated by fast protein liquid chromatography (FPLC) in a Superose 6 HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Sweden) under constant Tris buffer flow at a rate of 0.5 ml/min (pH 7.0; 10 mmol Tris, 150 mmol NaCl, 1 M EDTA and 0.03 % NaN₃). A total of 60 fractions were collected in a chronological order representing the density of each lipoprotein particle. Specifically, fractions 1 – 15 were labeled as VLDL, 16 – 30 were labeled as low-density lipoprotein (LDL), 31 – 45 were labeled as high-density lipoprotein (HDL), and 45 – 60 were labeled as other serum proteins. TC and TG contents in each fraction were measured as described in section 2.3. Total protein content was determined from absorbance at 280 nm [25].

4.2.2.7 *Evaluation of protein expression by western blotting*

Liver samples were homogenized by sonication with lysis buffer containing protease inhibitors (1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin and 10 mM PMSF). For each sample, 30 µg of total protein was diluted with sample buffer and eluted into a SDS-PAGE gel for protein separation, which were transferred to nitrocellulose membranes. For detection of the proteins of interest, membranes were incubated with primary antibodies: anti-KDEL (Enzo Life Sciences, USA, Cat# ADI-SPA-827), anti-XBP1 (Enzo Life Sciences, USA, Cat#ADI-905-739), anti-PDI (Enzo Life Sciences, USA, Cat# ADI-SPA-891) and anti-MTP (Sigma-Aldrich, USA, Cat# AV43618), followed by incubation with peroxidase-conjugated secondary antibodies for chemiluminescent detection (peroxidase-H₂O₂-luminol).

4.2.2.8 *Induction of acute hypertriglyceridemia with Triton WR1339*

3 months-old male non-obese Wistar rats were randomized and received a single oral dose of 0.9% NaCl (0.1 ml/100 g) or either 0.5 g/kg or 1.0 g/kg HESc. After 1-hour, rats treated with HESc were injected with 0.3 g/kg Triton WR1339 (Sigma-Aldrich, USA, Cat# T8761) intraperitoneally, and the groups referred as +HESc 0.5 g/kg and +HESc 1.0 g/kg (n = 7 per group). Saline-treated rats were injected with either equal Triton WR1339 dose (Triton WR1339 group, n = 7) or 0.9% NaCl (0.1 ml/100 g; Basal group, n = 7). Blood samples were

collected from tail vein before (0 h) as well as 24, 48 and 72 h after administration of Triton WR1339 for the determination of TG levels [26].

4.2.2.9 Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The normality of data was ensured by Shapiro-Wilk test. The groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls as post-test with Prism 7.0 (GraphPad, USA). Statistically significant differences were set at 5% with $p < 0.05$.

4.2.3 Results

4.2.3.1 HESc reduces adipose tissue accumulation in obese rats

Lean group had higher mean body weight than obese groups throughout the 8-weeks treatment period (Figure 2A), as peculiarly shown for this animal model. However, MSG-obese rats presented a LI value c.a. 11% higher than lean group (Figure 2C), accompanied by a 4-fold increase of retroperitoneal and periepididymal fat pads (Figures 2D and 2E, respectively), denoting their obese condition. HESc treatment (0.5 and 1.0 g/kg/day) reduced the weight gain of obese rats by 15% regardless of the administered dose (Figure 2A), though no effect had been detected on food intake (Figure 2B). Besides, LI was reduced by 7% and 10% in the obese+HESc 0.5 and obese+HESc 1.0 groups, respectively (Figure 2C). Weight loss was followed by strong decrease of white adipose tissue accumulation, since retroperitoneal and periepididymal fat pads were respectively reduced by nearly 47% and 40% despite the dose. (Figures 2D and 2E).

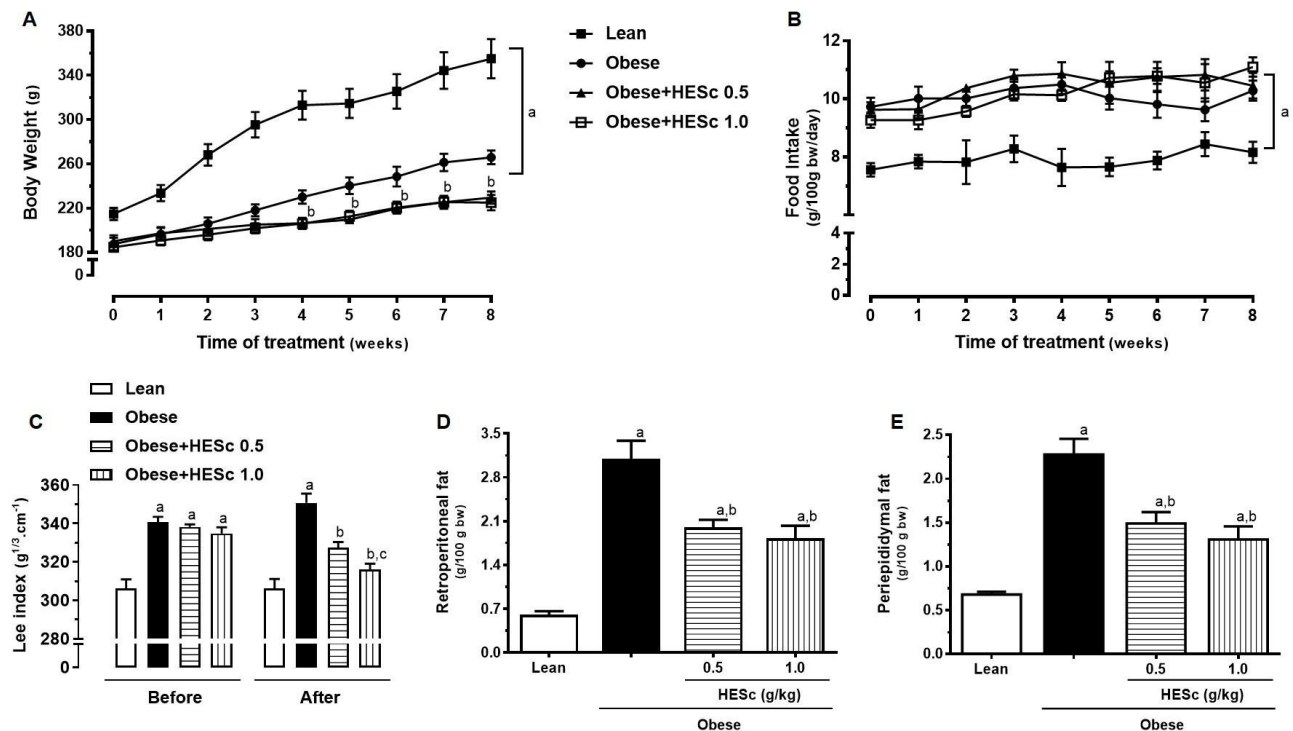


Figure 2. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces fat accumulation in obese rats. (A) Evolution of body weight. (B) Daily food intake. (C) Lee index before and after 8-weeks treatment. (D) Retroperitoneal fat. (E) Periepididymal fat. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 7$ per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) as compared to ^aLean; ^bObese and ^cObese+HESc 0.5.

4.2.3.2 HESc improves serum glycolipid profile in obese rats

At the end of treatment, obese rats presented serum fasting glucose levels 2-fold higher than lean ones, which was dose-dependently reduced by 27% and 43% in the obese+HESc 0.5 and obese+HESc 1.0 groups, respectively (Figure 3A). TC and TG levels of HESc-treated groups were completely restored despite the dose (Figures 3B and 3C). HESc also reduced the circulating FFA levels in a dose-dependent manner by 23% and 49% in the obese groups treated with doses of 0.5 and 1.0 g/kg, respectively (Figure 3D). TyG index was used as a surrogate method for insulin sensitivity assessment. Data in Figure 3E indicates higher insulin resistance in obese group, which was abolished in HESc-treated obese animals.

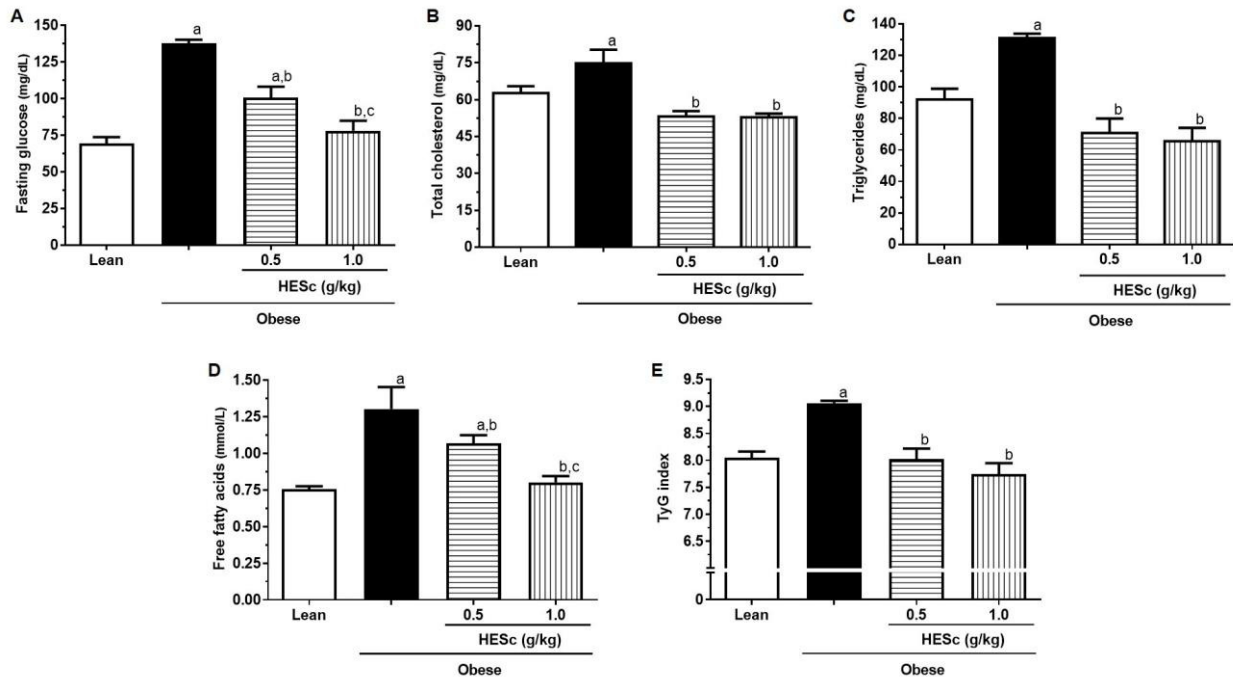


Figure 3. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) improves glucose homeostasis and serum lipid profile in obese rats. (A) Fasting glucose. (B) Total cholesterol. (C) Triglycerides. (D) Free fatty acids. (E) TyG index. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean; ^bObese and ^cObese+HESc 0.5.

4.2.3.3 HESc reverts NAFLD and improves liver function in obese rats

As shown in Figure 4, NAS score for obese animals supported the presence of hepatic steatosis, cell ballooning and suggested low-grade inflammation, putting these animals in an intermediate way toward non-alcoholic steatohepatitis (NASH). However, the administration of HESc reverted these features in both groups. Noteworthy, obese+HESc 1.0 animals did not score in any assessed parameters. Histological analysis was corroborated by data from liver lipid profile. Even though no difference had been seen in the livers' relative weights (Figure 5A), total fat content was increased by nearly 50% in the obese group, as compared to lean. Again, HESc reduced such accumulation by 13% in obese+HESc 0.5 and 27% in obese+HESc 1.0 (Figure 5B). Alike, TG levels were strongly increased by 76% in obese animals as compared to lean controls, but backward reduced by 44% and 57% in the obese+HESc 0.5 and obese+HESc 1.0 groups, respectively (Figure 5D). No difference was observed in liver cholesterol content among groups (Figure 5C). To evaluate at which extent this fat

accumulation impaired liver function, the activities of AST and ALT were assessed. As Figure 5E shows, there was a 60% increase in AST activity in obese rats compared to lean controls, whereas HESc reduced its activity by nearly 35% at both doses. On the other hand, there was no change in ALT activity among groups (Figure 5F).

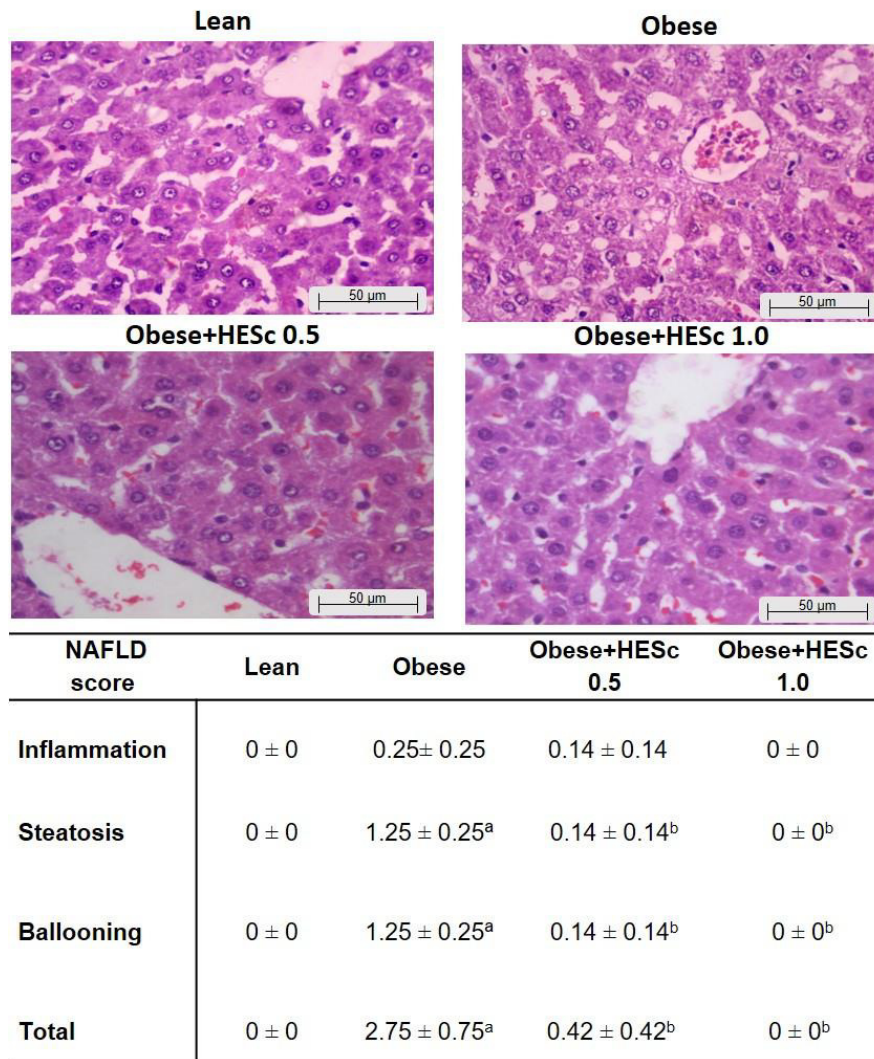


Figure 4. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reverses non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese rats. Analysis of liver histology with hematoxylin and eosin [23]. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 7 per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.

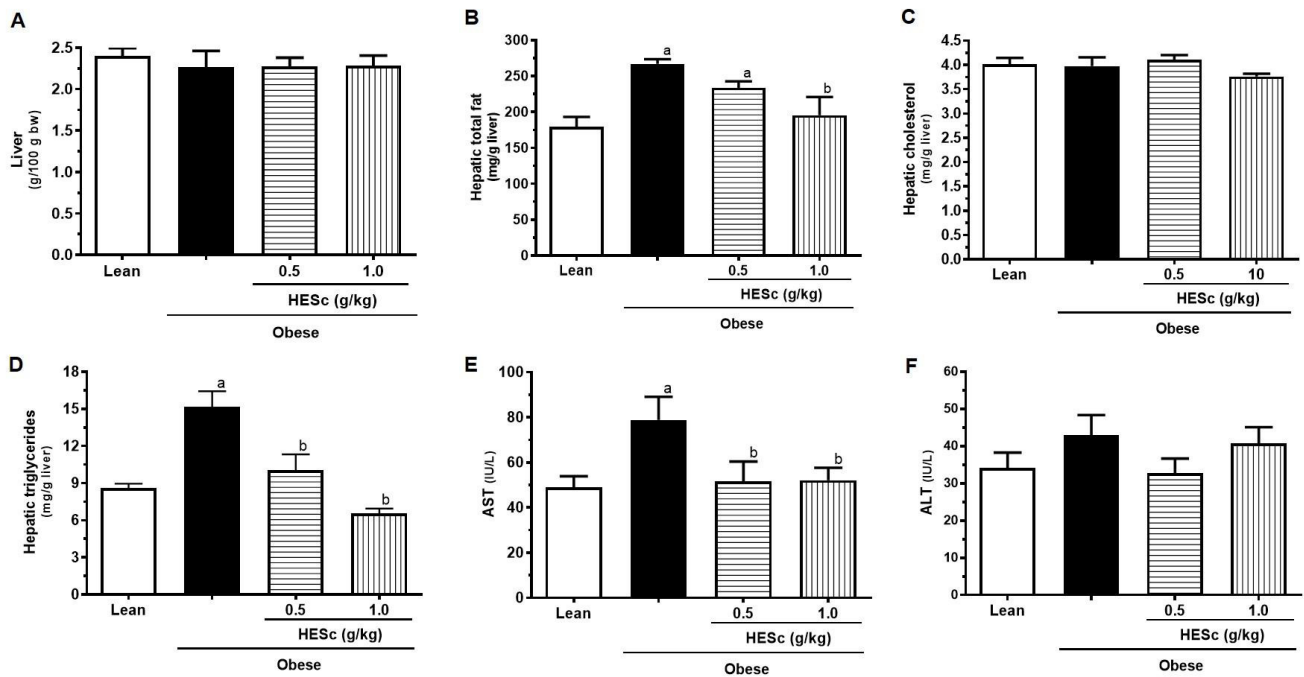


Figure 5. Administration of polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaves (HESc) improves lipid profile and liver function of obese rats. (A) Liver weight. (B) Total liver fat. (C) Hepatic cholesterol. (D) Hepatic triglycerides. (E) Serum aspartate aminotransferase (AST). (F) Serum alanine aminotransferase (ALT). Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 7$ per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.

4.2.3.4 HESc reduces TG content in VLDL particles from obese rats

FPLC analysis of serum samples showed that non-lipoprotein particle-bound protein content (fractions 45 – 60) of obese animals was 48% higher than in lean animals, which was fully restored in the animals treated with HESc (Figure 6A). In fractions corresponding to HDL particles (fractions 30 – 45), protein content was 30% lower in obese animals as compared with lean animals, whereas treatment with HESc at 0.5 and 1.0 g/kg increased these levels in 30% and 72%, respectively, in comparison with the former (Figure 6A). Likewise, cholesterol content in HDL fractions from obese group exhibited 36% higher levels than lean group. HESc treatment did not change cholesterol content in HDL particles, but restored it in VLDL particles (fractions 1 – 15; Figure 6B). Noteworthy, VLDL particles from obese rats contained 3-fold more TG levels than those lean controls. HESc dropped down these levels by nearly 50% in both treated groups (Figure 6C).

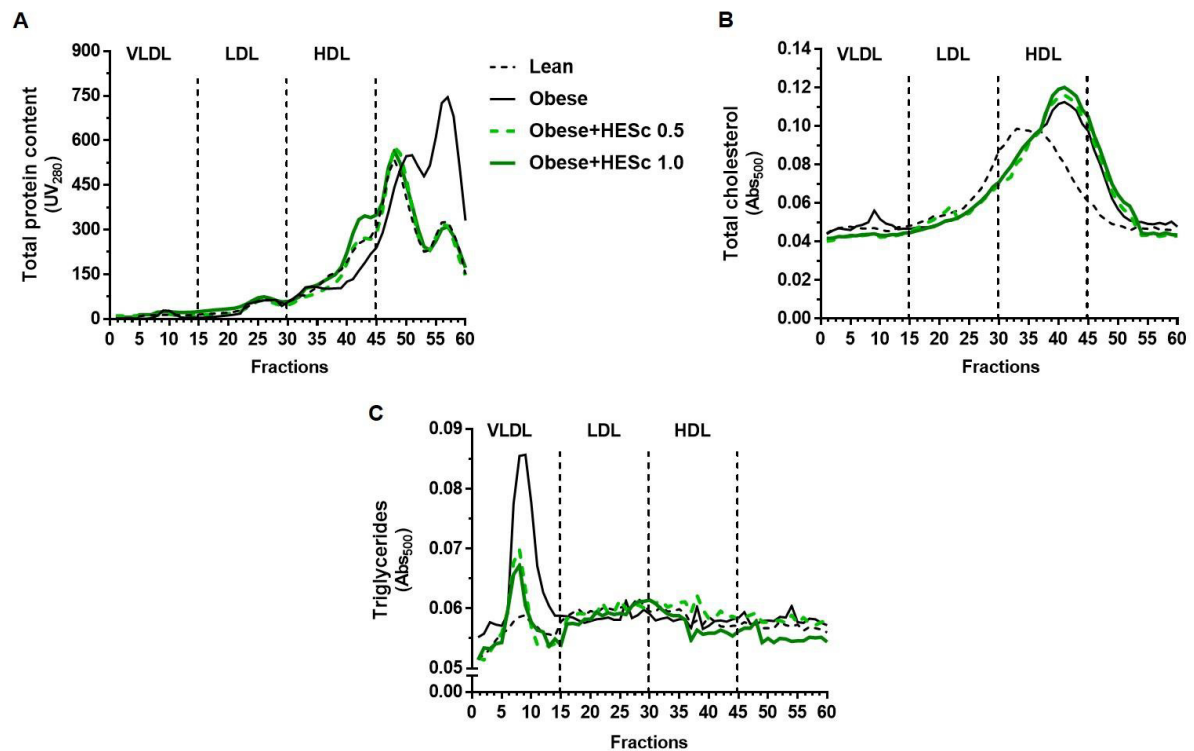


Figure 6. Administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces triglyceride content in VLDL particles of obese rats. (A) Protein content of high-(HDL), low-(LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL). (B) Cholesterol content of lipoproteins. (C) Triglyceride content of lipoproteins. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean absorbance of fast protein liquid chromatography (FPLC) (n = 7 per group).

4.2.3.5 HESc reduces ER stress in the liver of obese rats

Measurement of protein levels of KDEL chaperones, which are involved in hepatic UPR, exhibited a 3-fold increase for GRP94 in obese rats as compared to lean. HESc treatment reduced this protein expression by 27% and 33% at doses of 0.5 and 1.0 g/kg, respectively. On the other hand, GRP78 expression was increased by 83% in obese group, but only marginally reduced in HESc treated animals, since difference did not reach statistically significant values. Likewise, there was no difference in calreticulin expression among groups (Figure 7).

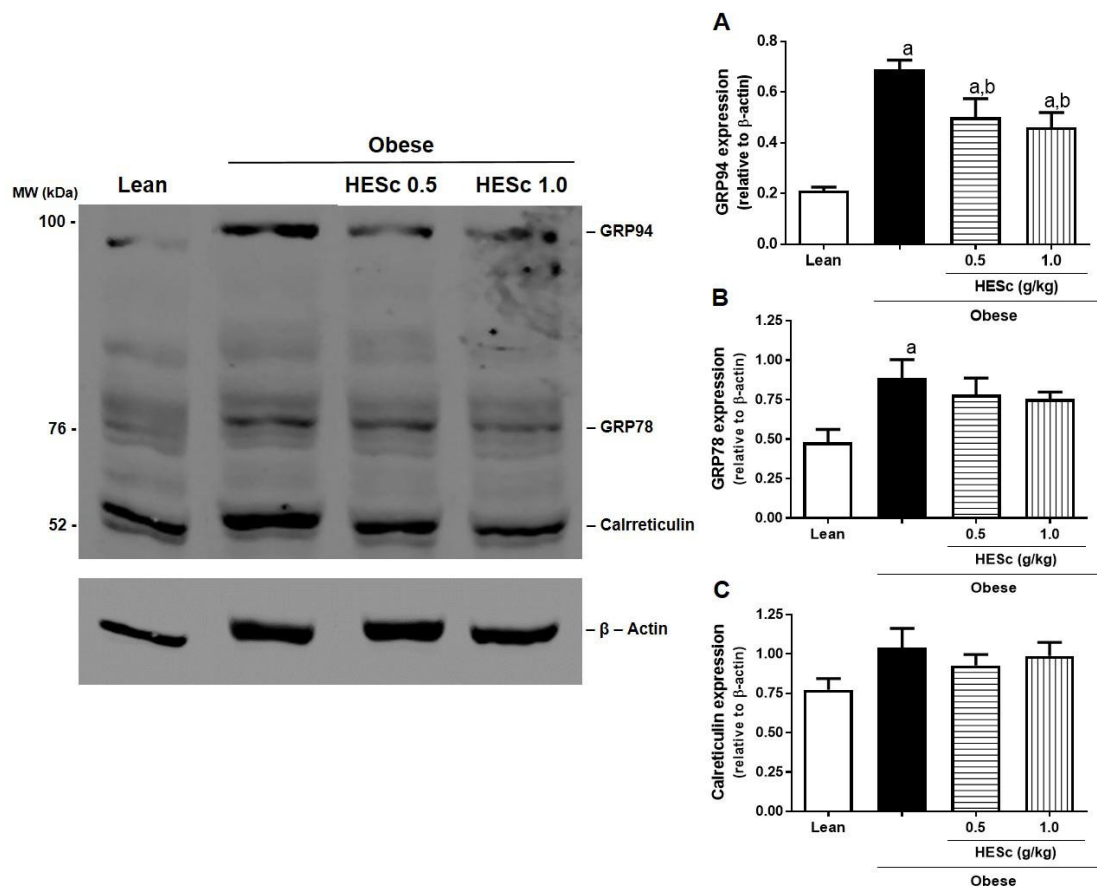


Figure 7. Administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) attenuates endoplasmic reticulum stress in the livers of obese rats. Protein expression was determined by western blotting. (A) Glucose response protein 94 (GRP94). (B) Glucose response protein 78 (GRP78). (C) Calreticulin. Lean: control group. Obese: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Lean: control group. Densitometry results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 4$ per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.

4.2.3.6 HESc inhibits the XBP-1s/PDI/MTP axis

Assessment of XBP-1 protein expression for both spliced (XBP-1s) and unspliced (XBP-1u) forms revealed a 2.5-fold higher splicing rates in obese rats than in lean controls. This increase was reduced to values very much alike to lean group upon treatment with both doses of HESc (Figure 8A). PDI expression was increased by 52% in non-treated obese animals, but brought back to intermediate levels in obese+HESc 1.0 group, with a reduction of 21% (Figure 8B). Similarly, MTP expression was 2-fold higher in obese group and reduced to lean-like levels in animals from obese+HESc 1.0 group (Figure 8C). In order to further verify the

effect of HESc on MTP function, this enzyme's activity was assessed in non-obese rats acutely injected with Triton WR1339, which is a well-known model of MTP-mediated hypertriglyceridemia [26]. Oral administration of HESc, at the same abovementioned doses, 1-hour prior induction reduced serum TG accumulation within 24 h, as well as hastened its clearance in the following 48 h (Figure 9), which is in line with a lower rate of VLDL particles assembly and secretion from the liver.

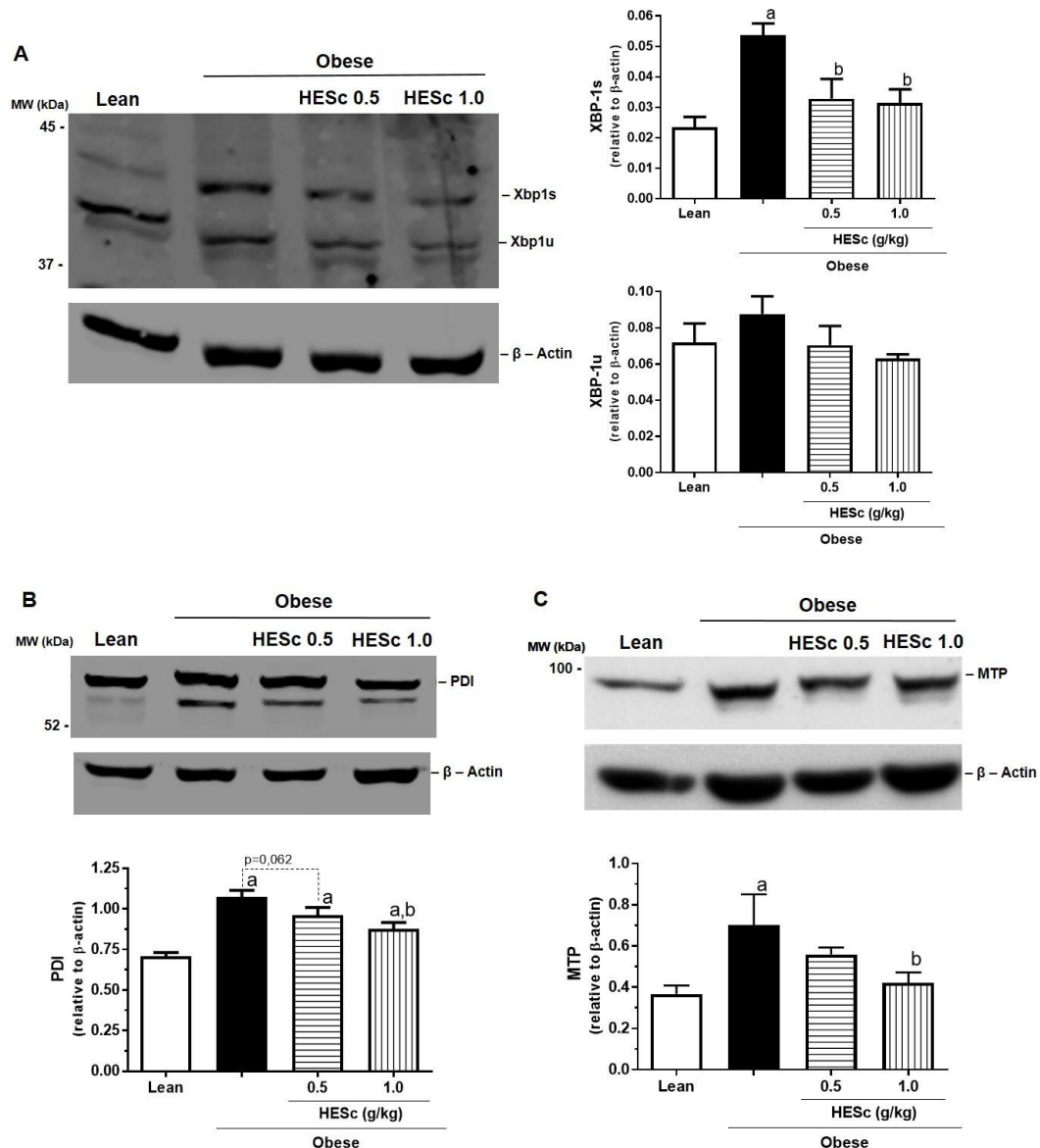


Figure 8. The administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) inhibits the XBP-1s/PDI/MTP pathway in the livers of obese rats. Protein expression was determined by western blotting. (A) X-box binding protein 1 (XBP-1). (B) Protein disulfide isomerase (PDI). (C) Microsomal triglyceride-transfer protein (MTP). Lean: control group. Obese 0: obese group. Obese+HESc 0.5: obese animals treated with 0.5 g/kg of HESc. Obese+HESc 1.0: obese animals treated with 1.0 g/kg of HESc. Densitometry results are

expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 4$ per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.

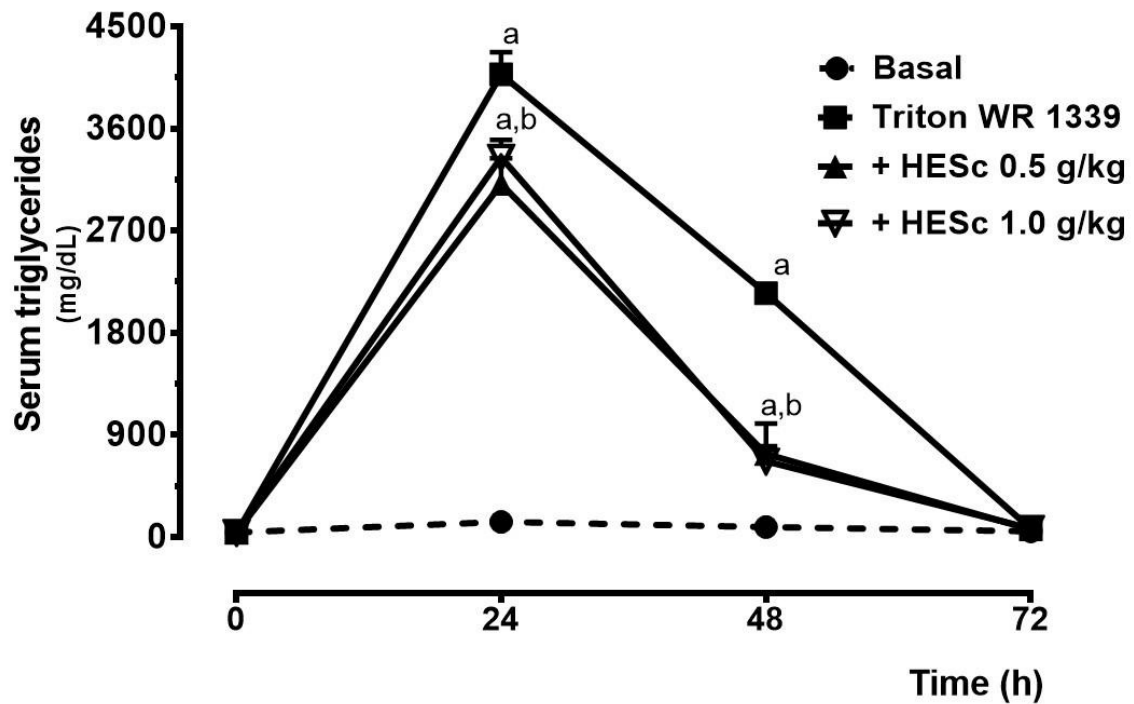


Figure 9. The administration of polyphenol-rich extracts of *Syzygium cumini* leaves (HESc) reduces the export of liver triglycerides in rats with Triton WR 1339-induced acute hypertriglyceridemia. Acute hypertriglyceridemia was induced by an intraperitoneal injection of Triton WR 1339 (0.3 g/kg) 1 hour after a single dose of HESc was administered, and the rats were monitored for 72 h. Basal: control group. Triton WR 1339: hypertriglyceridemic group. +HESc 0.5: hypertriglyceridemic group treated with 0.5 g/kg of HESc. +HESc 1.0: hypertriglyceridemic group treated with 1.0 g/kg of HESc. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 7$ per group). Letters indicate differences ($p < 0.05$; ANOVA; Newman-Keuls) with respect to ^aLean and ^bObese.

4.2.4 Discussion

This study strengthens *S. cumini* pharmacological potentialities since it corroborates our previous report that HESc restores serum TG levels in hypertriglyceridemic MSG-obese rats [18]. Data herein presented expand these findings by showing that oral administration of HESc to MSG-obese rats for 8 weeks retains weight gain, improves fatty liver disease and reverts hypertriglyceridemia, besides other metabolic outcomes typically found in this MetS rodent model. Specifically, this study shows that HESc dually inhibited hepatic MTP expression and

activity by downregulation of XBP-1s/PDI/MTP axis, decreasing incorporation of TG into VLDL particles and consequently lowering circulating TG levels.

Neonatal administration of MSG damages hypothalamic nuclei, e.g. arcuate nucleus, leading to impaired growth hormone secretion, therefore adult animals are shorter but fatter than age-mated controls [27]. Furthermore, these animals also exhibit autonomic unbalance characterized by enhanced vagus nerve tonus, which imposes increased insulin secretion and consequent development of peripheral insulin resistance and elevation of fat stores [28]. In this study, treatment with HESc reduced body weight gain in obese rats, but did not affect their food intake. Although an extract from *S. cumini* leaf had been shown to decrease food intake on non-obese rats [29], the lower weight gain displayed by our treated obese rats is most likely related to the lipolytic action of HESc, as we had previously described [18]. HESc is particularly rich in tetragalloylglucose (Figure 1A), gallotannin whose lipolytic effects have been ascribed to the modulation of proliferative peroxisome-activated receptor gamma (PPAR γ) [30], a mechanism shared by the compound vitalbosine A isolated from *S. cumini* seed [31].

Besides anti-obesity effects, HESc also improved serum lipid profile of obese rats. Particularly, it reverted the remarkable hypertriglyceridemia peculiarly displayed by MSG-obese rats [9], an effect further extensive to serum total cholesterol and FFA levels. In accordance with that, TG content into VLDL particles from HESc-treated obese rats was halved in comparison to non-treated obese animals. HESc also reduced the excessive ectopic liver fat in obese rats, an effect centered on TG but not cholesterol content. This lipid-lowering effect of HESc seems to be responsible for the complete restoration of the hepatic histopathological pattern of obese rats, whose NAS score was brought back to values very similar to lean healthy animals. These effects might be related to improved hepatic insulin sensitivity promoted by HESc, which is further supported by the reduced TyG index value found in treated obese animals. Importantly, TyG index has been proposed as a biomarker of NAFLD initiation and progression even in asymptomatic subjects [32].

Studies carried out with *S. cumini* seed extract in HepG2 cells [33] and livers from streptozotocin-induced diabetic rats [34] have attributed its hypolipidemic effect to increased PPAR γ activity and expression. Myricetin (Figure 1D,E), the most prevalent flavonoid in HESc [18], has been shown to improve insulin sensitivity [35] and promote hepatic lipid oxidation by increasing PPAR α expression in the liver [36]. Despite the extensive knowledge on *S. cumini* effects on PPAR γ / α pathways, we hypothesized that the polyphenols gathered up into HESc

phytochemical would interfere with a different pathway, since our previous report showed that MSG-obese rats presented upregulation of XBP-1s/PDI/MTP axis as a plausible mechanism for its hypertriglyceridemia [9].

In the past decade, hepatic ER stress has been proposed as a main contributing factor for NAFLD onset and progression, as well as MetS-associated dyslipidemias [5, 37]. Initial UPR is characterized by elevated gene/protein expression of the KDEL chaperones, namely glucose-regulated protein 94 (GRP94), GRP78 and calreticulin, to mitigate protein misfolding and reestablish ER homeostasis within a negative feedback loop [37]. Our obese rats showed an expressive increase of hepatic GRP94 and GRP78 expression, denoting active UPR, which was partially attenuated in HESc-treated obese rats. Many actions of HESc, such as improved insulin sensitivity and lower FFA circulating levels, might be involved in this effect since it has been shown that increased serum FFA levels might induce hepatic ER stress [38].

Studies have demonstrated that IRE1 α /XBP-1s pathway is the most conserved arm of UPR [39], which is importantly involved in the control of glucose homeostasis and lipid metabolism [7, 8]. Regardless of a recent discussion about its lipogenic [8] or anti-lipogenic role [40] in the liver, it is well established that XBP-1s acts as a hypertriglyceridemic factor [40, 41]. XBP-1s activates the expression of MTP and its active subunit PDI, which favors the incorporation of TG into nascent VLDL particles [10]. In a previous report, we showed that XBP-1/PDI/MTP axis is overexpressed in MSG-obese rats, leading to elevated TG content into VLDL particles and hypertriglyceridemia [9]. Here, HESc downregulated this pathway, since obese-treated animals presented lower splicing of XBP1s along with lesser expression of both PDI and MTP in comparison to obese non-treated rats. Inhibitory effects of HESc on XBP-1/PDI/MTP axis were further supported by its acute action on Triton WR1339-induced hypertriglyceridemic rats, which not only reduced total TG accumulation in 24 h, but also hastened its clearance. To the best of our knowledge, this is the first study to describe a feasible anti-hypertriglyceridemic mechanism for *S. cumini*.

Several studies have demonstrated the effects of polyphenol-rich extracts or polyphenols *per se* on ER stress pathways. Pre-incubation of polyphenol-rich extract of *Vitis rotundifolia* has been shown to inhibit thapsigargin-induced ER stress in human retinal endothelial cells [42]. Administration of polyphenol-rich extracts from pomegranate and green tea, for 20 weeks, to high-fat diet obese mice attenuated UPR activation in the skeletal muscle by reducing gene expression of GRP78 and XBP1 splicing [43], an action also described for

kaempferol in ischemic cardiomyocytes [44] and for apigenin in neuronal cells with ER stress induced by thapsigargin or brefeldin A [45]. Notwithstanding, since oxidative stress is enrolled as UPR inducer [46], polyphenols contained in HESc would also attenuate ER stress by reestablishing cellular redox balance in the liver of our treated MSG-obese rats, an obesity model whose oxidative stress has already been characterized [47, 48]. However, future studies must specifically address this issue, as well as, assess the effects of isolated compounds in order to identify the suitable responsible for the present mechanism.

In conclusion, data herein presented reinforce the prominent cardiometabolic properties of *S. cumini* leaf. The recovery of normal serum TG levels on HESc-treated obese rats discloses a new pharmacological usage for this species, via inhibition of hepatic assembly and secretion of VLDL particles. Hepatic MTP inhibitors have been considered important agents to treat familial dyslipidemia, as that seen in abetalipoproteinemia, but whose clinical utility has been restricted by their potential to induce hepatic steatosis [49, 50]. Noteworthy, besides its anti-hypertriglyceridemic property, HESc also restored the hepatic histopathological pattern of obese rats. This secondary, but not less important, property is probably associated to the aforementioned anti-lipogenic effect of *S. cumini* via PPAR γ / α pathways, which must be addressed in future studies. Finally, this joint action further emphasizes the pharmacological potentialities of polyphenolic compounds contained into HESc as a multi-target phytocomplex against MetS-derived metabolic disturbances.

Conflict of Interest

The authors declare there is no conflict of interest to be disclosed.

Acknowledgments

We really appreciate the support given by the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico, Tecnológico e Inovação do Estado do Maranhão (FAPEMA) through the grants Universal 00280/12, PAEDT 00297/14 and Universal 00643/15. CC and LNF received scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A special thank you to LeFisio's staff for all technical support during the experimental procedures.

References

- 1 Yoon H, Cha BS: Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2014;6:800-811.
- 2 Fabbrini E, Sullivan S, Klein S: Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010;51:679-689.
- 3 Shulman GI: Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med* 2014;371:1131-1141.
- 4 Boren J, Matikainen N, Adiels M, Taskinen MR: Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clin Chim Acta* 2014;431:131-142.
- 5 Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M: Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768-1776.
- 6 Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K: XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881-891.
- 7 Ning J, Hong T, Ward A, Pi J, Liu Z, Liu HY, Cao W: Constitutive role for IRE1 α -XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. *Endocrinology* 2011;152:2247-2255.
- 8 So JS, Hur KY, Tarrio M, Ruda V, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Koteliansky V, Lichtman AH, Iwawaki T, Glimcher LH, Lee AH: Silencing of lipid metabolism genes through IRE1 α -mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice. *Cell metabolism* 2012;16:487-499.
- 9 Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, Silva LA, Debbas V, Laurindo FR, Paes AM: Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:725-730.
- 10 Wang S, Chen Z, Lam V, Han J, Hassler J, Finck BN, Davidson NO, Kaufman RJ: IRE1 α -XBPs induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell metabolism* 2012;16:473-486.
- 11 Piperi C, Adamopoulos C, Papavassiliou AG: XBP1: A Pivotal Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:119-122.

- 12 Ayyanar M, Subash-Babu P: *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2:240-246.
- 13 Maciel MC, Farias JC, Maluf MJ, Gomes EA, Pereira PV, Aragao-Filho WC, Frazao JB, Costa GC, Sousa SM, Silva LA, Amaral FM, Russo M, Guerra RN, Nascimento FR: *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. *BMC Complement Altern Med* 2008;8:57.
- 14 Baldissera G, Sperotto ND, Rosa HT, Henn JG, Peres VF, Moura DJ, Roehrs R, Denardin EL, Dal Lago P, Nunes RB, Saffi J: Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. *Journal of ethnopharmacology* 2016;194:1012-1021.
- 15 Cercato LM, White PA, Nampo FK, Santos MR, Camargo EA: A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *Journal of ethnopharmacology* 2015;176:286-296.
- 16 Braboza Da Silva N, Del Fino A, Esquibel M, Santos J, de Almeida M: Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II–Bahia, Brasil. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2012;11:435-453.
- 17 Eshwarappa RS, Iyer RS, Subbaramaiah SR, Richard SA, Dhananjaya BL: Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *Bioimpacts* 2014;4:101-107.
- 18 Sanches JR, Franca LM, Chagas VT, Gaspar RS, Dos Santos KA, Goncalves LM, Sloboda DM, Holloway AC, Dutra RP, Carneiro EM, Cappelli AP, Paes AM: Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Front Pharmacol* 2016;7:48.
- 19 BRASIL R: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. [portal saúde gov br/portal/arquivos/pdf/RENISUS pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf) Accessed in: 07/24/2016 2009
- 20 Chagas VT, Franca LM, Malik S, Paes AM: *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Front Pharmacol* 2015;6:259.
- 21 Bernardis LL, Patterson BD: Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *The Journal of endocrinology* 1968;40:527-528.

- 22 Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F: The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic syndrome and related disorders* 2008;6:299-304.
- 23 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
- 24 Freedman BD, Lee EJ, Park Y, Jameson JL: A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J Biol Chem* 2005;280:17118-17125.
- 25 Jerico MM, De Camargo Chiquito F, Kajihara K, Moreira MA, Gonzales R, Machado FL, Nunes VS, Catanozi S, Nakandakare ER: Chromatographic analysis of lipid fractions in healthy dogs and dogs with obesity or hyperadrenocorticism. *J Vet Diagn Invest* 2009;21:203-207.
- 26 Silva RM, Santos FA, Maciel MA, Pinto AC, Rao VS: Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. *Planta Med* 2001;67:763-765.
- 27 Millard WJ, Martin JB, Jr., Audet J, Sagar SM, Martin JB: Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-treated rats is the result of a deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1982;110:540-550.
- 28 Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito Mdo N, Andreazzi AE, Mathias PC, Torrezan R: Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 2007;31:142-148.
- 29 Oliveira AC, Endringer DC, Amorim LA, das Gracas LBM, Coelho MM: Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of ethnopharmacology* 2005;102:465-469.
- 30 Yang MH, Vasquez Y, Ali Z, Khan IA, Khan SI: Constituents from *Terminalia* species increase PPARalpha and PPARgamma levels and stimulate glucose uptake without enhancing adipocyte differentiation. *Journal of ethnopharmacology* 2013;149:490-498.
- 31 Thiyyagarajan G, Muthukumaran P, Sarath Kumar B, Muthusamy VS, Lakshmi BS: Selective Inhibition of PTP1B by Vitalboside A from *Syzygium cumini* Enhances Insulin

Sensitivity and Attenuates Lipid Accumulation Via Partial Agonism to PPARgamma: In Vitro and In Silico Investigation. *Chemical biology & drug design* 2016;88:302-312.

32 Simental-Mendia LE, Simental-Mendia E, Rodriguez-Hernandez H, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F: The product of triglycerides and glucose as biomarker for screening simple steatosis and NASH in asymptomatic women. *Ann Hepatol* 2016;15:715-720.

33 Sharma B, Balomajumder C, Roy P: Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2376-2383.

34 Sharma AK, Bharti S, Kumar R, Krishnamurthy B, Bhatia J, Kumari S, Arya DS: *Syzygium cumini* ameliorates insulin resistance and beta-cell dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF-alpha in type 2 diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 2012;119:205-213.

35 Choi HN, Kang MJ, Lee SJ, Kim JI: Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Nutr Res Pract* 2014;8:544-549.

36 Chang CJ, Tzeng TF, Liou SS, Chang YS, Liu IM: Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:787152.

37 Cnop M, Foulfelle F, Velloso LA: Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 2012;18:59-68.

38 Nivala AM, Reese L, Frye M, Gentile CL, Pagliassotti MJ: Fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress in vivo: differential response to the infusion of Soybean and Lard Oil in rats. *Metabolism* 2013;62:753-760.

39 Cox JS, Shamu CE, Walter P: Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 1993;73:1197-1206.

40 Herrema H, Zhou Y, Zhang D, Lee J, Salazar Hernandez MA, Shulman GI, Ozcan U: XBP1s Is an Anti-lipogenic Protein. *J Biol Chem* 2016;291:17394-17404.

41 Lee A-H, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH: Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492-1496.

42 Ha JH, Shil PK, Zhu P, Gu L, Li Q, Chung S: Ocular inflammation and endoplasmic reticulum stress are attenuated by supplementation with grape polyphenols in human retinal pigmented epithelium cells and in C57BL/6 mice. *J Nutr* 2014;144:799-806.

- 43 Rodriguez J, Gilson H, Jamart C, Naslain D, Pierre N, Deldicque L, Francaux M: Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *Eur J Nutr* 2015;54:377-389.
- 44 Kim DS, Ha KC, Kwon DY, Kim MS, Kim HR, Chae SW, Chae HJ: Kaempferol protects ischemia/reperfusion-induced cardiac damage through the regulation of endoplasmic reticulum stress. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2008;30:257-270.
- 45 Choi AY, Choi JH, Lee JY, Yoon KS, Choe W, Ha J, Yeo EJ, Kang I: Apigenin protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int* 2010;57:143-152.
- 46 Bozaykut P, Sahin A, Karademir B, Ozer NK: Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mech Ageing Dev* 2016;157:17-29.
- 47 Park CH, Kim MY, Sok DE, Kim JH, Lee JH, Kim MR: Butterbur (*Petasites japonicus* Max.) extract improves lipid profiles and antioxidant activities in monosodium L-glutamate-challenged mice. *J Med Food* 2010;13:1216-1223.
- 48 Seiva FR, Chuffa LG, Braga CP, Amorim JP, Fernandes AA: Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol* 2012;50:3556-3561.
- 49 Wierzbicki AS, Hardman T, Prince WT: Future challenges for microsomal transport protein inhibitors. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:277-286.
- 50 Rizzo M, Wierzbicki AS: New lipid modulating drugs: the role of microsomal transport protein inhibitors. *Curr Pharm Des* 2011;17:943-949.

4.3 CAPÍTULO II - Extrato rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* melhora o metabolismo lipídico hepático de camundongos obesos MSG: Ação conjunta sobre a resistência insulínica e o estresse do retículo endoplasmático

Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf improves hepatic lipid metabolism in MSG-obese mice: Joint action on insulin resistance and endoplasmic reticulum stress

Autores e filiações

Lucas M. França¹; Pâmela C. dos Santos¹; Karla Frida T. Flister¹; Caroline C. Vale¹; Jonas R. Sanches¹; Renata Ohana A. Benevides¹; Nathalee Liberal X. Ribeiro¹; Francisco Rafael M. Laurindo²; Antonio Marcus de A. Paes^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

²Laboratório de Biologia Vascular, Instituto do Coração, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

***Autor correspondente:**

Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Avenida dos Portugueses, 1966. Campus Dom Delgado, CEP: 65.080-805. São Luís (MA), Brasil.

E-mail: marcuspaes@ufma.br

Revista

Food Research International

Fator de impacto (2016): 3,086

Qualis Medicina I: A2

Resumo

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) está presente em mais de 80% dos pacientes obesos e é preditor direto de doenças cardiovasculares. A resistência insulínica e o estresse do retículo endoplasmático (RE) no fígado são responsáveis pela manutenção da DHGNA, fazendo com que a lipogênese *de novo* hepática se torne um ciclo vicioso. Resultados recentes do nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* (EHSc) reverte a DHGNA de ratos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG). Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do EHSc sobre vias do metabolismo lipídico e do estresse do RE no fígado de camundongos obesos-MSG. Camundongos obesos-MSG foram tratados por 4 semanas com o EHSc (0,5 g/kg; v.o.; Obeso+EHSc), enquanto outros obesos-MSG (Obeso) e controles magros (Magro) receberam salina (0,1 ml/10g). Peso corporal, consumo e eficiência alimentares e índice de Lee (IL) foram avaliados durante o tratamento. Ao fim do tratamento, testes de tolerância a glicose (TOTG) e insulina (TTI) foram realizados. Sangue, tecidos adiposos brancos (TAB) e fígado foram coletados durante a eutanásia dos animais. Os níveis séricos de glicose (GL), triacilgliceróis (TAG), colesterol total (CT), ácidos graxos livres (AGL) e insulina foram determinados e usados para o cálculo dos índices HOMA e TyG. O TAB foi pesado e sua atividade lipolítica avaliada. Amostras de fígado foram utilizadas para determinações do conteúdo lipídico e expressão gênica de marcadores associados à síntese (SREBP-1c, PPARs, FAS, SCD1 e DGAT2) e exportação de TAG (ApoB, PDI e MTTP), bem como ao estresse do RE (GR78, ATF6, IRE1 α , PERK, NRF2 e CHOP). EHSc reduziu o peso corporal (12 %), IL (6 %) e TAB (20 %) quando comparado aos camundongos obesos não tratados. Os níveis de GL, TAG, insulina e AGL foram diminuídos em 38, 37, 29 e 30 %, respectivamente. EHSc melhorou a sensibilidade insulínica pela redução de ambos os índices HOMA-IR (66 %) e TyG (9 %), ao mesmo tempo que aumentou o *kITT* (87 %). O EHSc aumentou a atividade lipolítica do TAB tanto na condição basal (76%) quanto estimulada por isoproterenol (46 %). A gordura total e os TAG hepáticos estavam reduzidos em 29 e 22%, respectivamente. EHSc diminuiu a expressão de PPAR- γ (35 %), SREBP-1c (52 %), PPAR- α (56 %), FAS (63 %), DGAT2 (50 %), ApoB (50 %), MTTP (45 %), PERK (66 %) e NRF2 (50 %), quando comparado ao grupo Obeso. Pelo outro lado, as expressões gênicas da ATF6, IRE1 α , PDI e CHOP não foram alteradas. Portanto, nossos dados sugerem que a EHSc diminui a DHGNA em camundongos obesos-MSG pela melhora da sensibilidade insulínica e diminuição da expressão gênica de marcadores da lipogênese, fato que pode estar relacionado à *downregulation* da via da PERK, importante indutor lipogênico do estresse do RE hepático.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*, doença hepática gordurosa não-alcoólica, lipogênese e estresse do retículo endoplasmático.

4.3.1 Introdução

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a principal doença hepática crônica no mundo (Lonardo, Sookoian, Pirola, & Targher, 2016) e ocorre quando a capacidade hepática de exportação e/ou oxidação dos lipídeos é menor do que sua síntese (Yoon & Cha, 2014). A DHGNA é fator de risco independente para doenças cardiovasculares e sua prevalência em indivíduos obesos é superior a 80% (Younossi et al., 2016). Essa estreita relação se dá pela participação direta do tecido adiposo branco (TAB) hipertrofiado presente na obesidade, favorecendo a síntese direta de lipídeos nos hepatócitos através da maior liberação, pelos adipócitos disfuncionais, de ácidos graxos livres (AGL) na circulação (Reccia et al., 2017). Além disso, a hiperinsulinemia e/ou resistência insulínica (RI) hepática presente nesses indivíduos contribui para lipogênese *de novo* através da ativação do *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c), um dos principais fatores de transcrição de enzimas envolvidas na síntese de triacilgliceróis (TAG) no fígado. Com isso, haverá potencialização do processo de desenvolvimento e manutenção da DHGNA, e, conseqüentemente, da hipertrigliceridemia resultante (Leavens & Birnbaum, 2011).

Embora tenham ocorrido avanços nas descrições desses mecanismos indutores da DHGNA, os processos responsáveis pela amplificação e manutenção dessa doença ainda se encontram pouco elucidados. Nesse contexto, tem-se destacado o papel do estresse do retículo endoplasmático (RE) hepático (Zhang, Xu, Yu, Chen, & Li, 2014). O estresse do RE, também conhecido como *unfolded protein response* (UPR), ocorre quando há uma sobrecarga da capacidade de enovelamento proteico no RE, gerando um excesso de proteínas malformadas, que ativam as seguintes proteínas transmembrana do RE: PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*). Uma vez ativos, esses sensores induzem vias moleculares que têm como objetivo inicial o controle da homeostase do RE (Ron & Walter, 2007). Não obstante, com a cronificação desse estresse no fígado há o estímulo de vias inflamatórias, apoptóticas e lipogênicas (Gentile, Frye, & Pagliassotti, 2011). Com isso, o estresse do RE é considerado um dos principais mecanismos responsável pela manutenção e progressão da DHGNA em indivíduos obesos (Baiceanu, Mesdom, Lagouge, & Foufelle, 2016) e, conseqüentemente, tem se tornado alvo terapêutico para o tratamento dessa desordem do metabolismo lipídico hepático (F. L. Wu et al., 2016).

Syzygium cumini (L.) Skeels (sinonímia: *Syzygium jambolanum* D.C., *Eugenia jambolana* Lam.) é uma árvore originária da Ásia tropical e cultivada em vários países sendo

conhecida popularmente como jambolão, *jambolan*, *java plum* ou *black plum* (Ayyanar & Subash-Babu, 2012). Essa espécie se destaca pelo amplo uso na prática popular para o tratamento de uma variedade de enfermidades, dentre as quais podemos destacar aquelas relacionadas à obesidade como perda de peso (Cercato, White, Nampo, Santos, & Camargo, 2015; Dickel, Rates, & Ritter, 2007), dislipidemia (Braboza Da Silva, Del Fino, Esquibel, Santos, & de Almeida, 2012), inflamação (Kunwar, Uprety, Burlakoti, Chowdhary, & Bussmann, 2009) e diabetes mellitus do tipo II (DM2) (Trojan-Rodrigues, Alves, Soares, & Ritter, 2012), sendo reconhecida pelo Ministério da Saúde do Brasil como uma espécie relevante no contexto etnofarmacológico do país, uma vez que é uma das 71 plantas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009).

Nosso grupo tem destacado as potencialidades terapêuticas de várias partes de *S. cumini* no combate de distúrbios cardiometabólicos (Chagas, Franca, Malik, & Paes, 2015). Ao analisarmos os efeitos do extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* (EHSc) observamos que o mesmo melhora o perfil metabólico de ratos com obesidade induzida pelo L-glutamato monossódio (MSG) com reversão da esteatose hepática nesses animais obesos (Sanches et al., 2016). Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais o EHSc atua. Portanto, dadas as consistentes evidências de que o estresse do RE é responsável pela manutenção e progressão da DHGNA (Baiceanu et al., 2016) e que o EHSc reduz a DHGNA de animais obesos-MSG (Sanches et al., 2016), o objetivo desse estudo foi investigar os mecanismos moleculares de ação do EHSc sobre vias do metabolismo lipídico e do estresse do RE no fígado esteatótico de camundongos obesos-MSG.

4.3.2 Material e Métodos

4.3.2.1 Material botânico e obtenção do extrato hidroalcoólico rico em polifenóis

Folhas de *Syzygium cumini* foram coletadas no Campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) (2°33'11.7''S 44°18'22.7''O), na cidade de São Luís, estado do Maranhão, Brasil. A espécie vegetal foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Eduardo B. Almeida Jr e uma exsicata se encontra no Herbário do Maranhão (MAR) (n° 4574). Após a coleta, as folhas foram secas (38°C) e pulverizadas. O pó obtido foi macerado (temperatura ambiente) em solução hidroalcoólica (etanol 70%), na proporção de 1:6 (p/v), durante 3 dias

com agitação constante e renovação do solvente a cada 24 h. O material filtrado, centrifugado (3500 rpm, 10 min) e concentrado (45°C) obtendo-se o extrato hidroalcoólico de *S. cumini* (Sanches et al., 2016).

Esse extrato foi então liofilizado para se apresentar em pó, do qual obteve-se, através do método azul de Prússia (Pueyo & Calvo, 2009), um conteúdo de polifenóis total de $22,9 \pm 1,12$ equivalentes de ácido gálico/100 g de extrato, sendo denominado extrato hidroalcoólico rico em polifenóis (EHSc) de acordo com dados anteriores (Sanches et al., 2016). O restante do pó do EHSc foi ressuspenso em dH_2O no momento do uso para realização do tratamento dos animais como descrito abaixo.

4.3.2.2 Indução da obesidade pelo L-glutamato monossódico (MSG) e tratamento com EHSc

Filhotes machos de *Mus musculus* (Swiss) foram injetados por via subcutânea, na região dorso-cervical, com solução de L-glutamato monossódico (MSG) (Sigma-Aldrich, Brasil) na dose de 4,0 g/kg/dia durante 5 dias alternados a partir do 2º dia de vida, para indução da obesidade. Os camundongos controle receberam uma injeção de solução salina equiosmolar (0,1ml/10g de peso) (Olney, 1969). Desde o nascimento todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ C$) e luminosidade (12h claro/ 12h escuro), com água filtrada e ração (Nuvilab CR-1, Brasil) *ad libitum*. A partir da 7ª semana de vida o peso corporal e o consumo de ração foram avaliados 2 vezes por semana. Antes do tratamento a obesidade foi avaliada pelo cálculo do índice de Lee [IL = peso corporal (g)^{1/3}/comprimento naso-anal (cm) x 1000] (Bernardis & Patterson, 1968).

Uma vez constatado a obesidade dos camundongos MSG em relação aos seus controles magros na 13ª semana de vida, os animais foram randomizados e dividido em 3 grupos que foram administrados (gavagem) com EHSc ou dH_2O por 4 semanas, como segue:

Magro: camundongos magros receberam dH_2O 0,1ml/kg/dia ($n=7$);

Obeso: camundongos MSG receberam dH_2O 0,1ml/kg/dia ($n=7$);

Obeso+EHSc: camundongos MSG receberam EHSc 0,5 g/kg/dia ($n=7$);

O peso corporal e o consumo de ração foram mensurados 2 vezes por semana desde a 7ª semana de vida até o fim do tratamento. Ao final, o IL foi realizado novamente para avaliar o efeito do tratamento sobre a obesidade. Nesse mesmo dia, os animais foram deixados em jejum noturno (8-10 h) para que fossem anestesiados (10 mg/kg xilazina + 75 mg/kg cetamina,

via intraperitoneal) para a coleta de sangue por punção cardíaca e eutanásia por decaptação. O fígado e os tecidos adiposos brancos retroperitoneal e periepídídimal foram coletados e pesados para avaliação morfométrica (g tecido/ 10g peso corporal) e outras análises. Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA sob o registro nº 23115.002972/2017-01 (ANEXO F).

4.3.2.3 Atividade lipolítica *ex vivo* do TAB

Cerca de 100 mg de tecido adiposo retroperitoneal dos camundongos de todos os grupos foram cortados em pequenos fragmentos e incubados em tampão de Krebs (NaCl 120 mM; NaHCO₃ 15 mM; KCl 4,83 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1.21 mM; CaCl₂ 2.4 mM, BSA 1 %, glicose 0,1 %, aerado por 30 min e pH ajustado para 7,4) por 1 h (37 °C) na presença ou ausência de 20 µM de isoproterenol (Sigma-Aldrich, EUA). Ao final da incubação, o sobrenadante de cada amostra foi separado em novos tubos e colocado no gelo para cessar a reação. Em seguida, a concentração de glicerol liberada em cada sobrenadante foi determinada por ensaio enzimático colorimétrico (505 nm) utilizando kit de triglicerídeos (TAG) (Labtest, Brasil) (Vaughan, 1962).

4.3.2.4 Análises da homeostase glico-insulínica e do perfil bioquímico sérico

A tolerância à glicose e a insulina foram avaliadas pelos testes oral de tolerância a glicose (TOTG) e de tolerância à insulina (TTI) (Suez et al., 2014). Para TOTG, 04 dias antes do fim do tratamento, a glicemia em jejum (8-10 h) foi mensurada por glicosímetro (Accucheck Active®, Roche Diagnostic, Alemanha) através do sangue da ponta da cauda nos tempos 0 (basal) e 15, 30, 60 e 120 minutos após administração de *bolus* de glicose (2 g/kg). O TTI foi realizado pela manhã (7:00 h), 02 dias antes do fim do experimento, com os animais alimentados, nos quais a glicemia foi mensurada como no TOTG nos tempos 0 (basal) e 10, 20, 30 e 40 minutos após a administração intraperitoneal de 1,0 UI/kg de insulina (Humulin® 70/30, Lilly, Brasil) pré-aquecida à 37°C. A taxa de desaparecimento da glicose (K_{TTI}) foi derivado do TTI e calculado como $0,693/t_{1/2}$, onde $t_{1/2}$ é a metade do tempo para atingir o máximo de decaimento da glicemia.

Ao final do tratamento, o sangue coletado passou pelos processos de coagulação (20 min) e centrifugação (3500 rpm, 10 min) para obtenção do soro. Este foi utilizado para determinar as concentrações de glicose, colesterol total (CT), TAG, AGL e insulina através de métodos espectrofotométricos (Labtest, Brasil) ou por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com as recomendações dos fabricantes dos kits comerciais.

A RI foi inferida pelos cálculos do índices TyG ($TyG = \ln[\text{triglicerídeos em jejum (mg/dL)} \times \text{glicose em jejum (mg/dL)} / 2]$) (Simental-Mendia, Rodriguez-Moran, & Guerrero-Romero, 2008) e *homeostasis model assessment 1* da RI (HOMA1-RI), onde $HOMA1-RI = [\text{insulina em jejum } (\mu\text{U/ml}) / \text{glicose em jejum (mM)}] / 22,5$ (Matthews et al., 1985).

4.3.2.5 Perfil lipídico hepático

Cerca de 500 mg de tecido hepático de cada animal foi homogeneizado em 5 ml de solução de clorofórmio/metanol (2:1) e mantidos *overnight* a 4 °C para extração lipídica. No resultante do filtrado dessa extração foi adicionado NaCl 0,9% (1: 5 filtrado), agitado e deixado em repouso por 2 h. Em seguida, a solução foi centrifugada (1000 rpm, 5 min) para separação da fase aquosa da clorofórmica. Uma alíquota de 1 mL da fase clorofórmica foi coletada e seca à 40 °C sob fluxo de ar. A gordura seca foi pesada e ressuspensa em 1 ml de Triton-X100/Metanol (2:1) para análises espectrofotométricas dos níveis de TAG e CT de acordo com a instrução dos fabricantes de kits comerciais (Labtest, Brasil), e os resultados expressos em mg/g de tecido (Freedman, Lee, Park, & Jameson, 2005).

4.3.2.6 Expressão gênica por Real-Time PCR (*qPCR*)

Cerca de 100 mg das amostras de fígado previamente conservadas (-20 °C) com RNALater® (Ambion, EUA) foram pulverizados em baixa temperatura com nitrogênio líquido e acondicionado em microtubos. Em seguida, foi realizada a extração do RNA total adicionando 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, EUA) e homogeneizando com vórtex para dissolução do tecido. Em cada amostra houve adição de 200 µl de clorofórmio, com posterior homogeneização e incubação por 3 minutos a temperatura ambiente para posterior centrifugação (12.000 g, 15 min, 4 °C). Ao sobrenadante foi adicionado 500 µl de isopropanol, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Essa mistura foi centrifugada (12.000 g, 10 min, 4 °C) e o

sobrenadante desprezado. O *pellet* formado foi dissolvido com 1 ml de etanol 70 % (diluído em água DEPC, dietilpirocarbonato) e realizada nova centrifugação (7.500 g, 5 min, 4°C). O álcool residual foi retirado e o novo *pellet* ressuspendido em até 50 µl de água DEPC. A pureza e a concentração do RNA total extraído foram determinadas por espectrofotometria através da razão A260/A280 (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific, EUA), seguido de eletroforese com gel de agarose (0,8%).

Amostras de RNA (3 µg) foram convertidas em cDNA no termociclador Mastercycler® (Eppendorf, EUA) utilizando a SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Alemanha). Os primers (Tabela 1) foram desenhados com o software Primer Express software Primer Express™ (Applied Biosystems, EUA) e manufacturados pela Invitrogen Brasil. A amplificação e detecção dos RNAm foram realizadas utilizando o Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG no StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). Neste sistema, as reações foram incubadas a 50 °C por 2 min para passarem pela fase de espera (95 °C, 15 s), denaturação (40 ciclos de 95 °C de 15 s) e anelamento e extensão (60 °C, 1 min). Para a curva de *melting*, as reações aconteceram a 95 (15 s), 60 (60 min) e 95 °C (15 s), sucessivamente. A expressão gênica de cada amostra foi normalizada pelos níveis de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e os resultados obtidos pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabela 1. Sequência dos primers.

Gene*	Forward primer	Reverse primer	Amplicon	GenBank
SREBP-1c	5'-GGCTGTTGTCTACCATAAGC-3'	5'-ATGTCCTCCTGTGTACTTGC-3'	61	NM_011480.4
PPAR-γ	5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3'	5'-CGCAGGTTTTTGAGGAAGTC-3'	67	NM_001127330.2
PPAR-α	5'-ATGCCAGTACTGCCGTTTTC-3'	5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'	40	NM_001113418.1
FAS	5'-TGGAAAGATAACTGGGTGAC-3'	5'-AGAACCCAGAATGGATACCT-3'	60	NM_007988.3
SCD-1	5'-AAAAGTGGACATGCTGACC-3'	5'-TACCTCCTCTGGAACATCAC-3'	57	NM_009127.4
DGAT-2	5'-ACGCAGTCACCCTGAAGAACC-3'	5'-GGAACCCCTCCTCAAAGATCACC-3'	85	NM_026384.3
ApoB	5'-CTCAGTTCCCTCCTTGACCTCC-3'	5'-CCCGTGATTCAACCTGGACC-3'	67	NM_009693.2
MTTP	5'-CACTCAGGCAATTCGAGACA-3'	5'-TCTGGCTGAGGTGGGAATAC-3'	114	NM_001163457.2
PDI A1	5'-AGCTGCCGCAAACTGAA-3'	5'-TGGCATCCACCTTTGCTAGT-3'	59	NM_011032.2
GRP78	5'-ACACTTGGTATTGAAACTGTGG-3'	5'-GATCTGAGACTTCTTGGTGG-3'	71	NM_001163434.1
ATF6	5'-CTCTCAGGTTGAACCATGAA-3'	5'-GTCCTTTCCACTTCATGTCT-3'	58	NM_001081304.1
IRE1α	5'-AAGGTATGTTTGACAACCGA-3'	5'-AAGCTAAACACTCAGGGAG-3'	61	NM_023913.2
PERK	5'-CGAGAATGATGGGAAAAAGC-3'	5'-GGCTAGATGAAACCAAGGAA-3'	65	NM_010121.2
CHOP	5'-TCACACGCACATCCCAA-3'	5'-GGCCATAGAACTCTGACTGGAA-3'	56	NM_001290183.1
NRF2	5'-CGTGAGTCTGGTCATCAA-3'	5'-AGCCTCTAAGCGGCTTGAAT-3'	64	NM_010902.3
GAPDH	5'-ACACTTGGTATTGAAACTGTGG-3'	5'-GATCTGAGACTTCTTGGTGG-3'	60	NM_001289726.1

*Abreviações: SREBP-1c: *Sterol response element-binding protein-1c*; PPAR- γ : *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* ; PPAR- α : *peroxisome proliferator-activated receptor- α* ; FAS: *fatty acid synthase*; SCD-1: *stearoyl-CoA desaturase-1*; DGAT-2: *diacylglycerol acetyltransferase-2*; ApoB: *apolipoprotein B*; MTTP: *microsomal triglyceride transfer protein*; PDI A1: *protein disulfide isomerase A1*; GRP78: *glucose-regulated protein 78*; ATF6: *activating transcription factor 6*; IRE1 α : *inositol-requiring enzyme 1 α* ; PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*; CHOP: *C/EBP homologous protein*; GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

4.3.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (EPM). Após a confirmação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, os grupos experimentais foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) *one-way* com o *Newman-Keuls* como pós-teste. As diferenças estatísticas foram estabelecidas para um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$) e analisadas pelo *software* Prism 7.0 (GraphPad, USA).

4.3.3 Resultados

4.3.3.1 EHSc reduz o acúmulo e melhora a atividade do TAB de camundongo obesos

Durante o acompanhamento ponderal (Fig. 1A), observa-se, desde a 7ª semana de vida, que os animais magros apresentam um maior peso em relação aos obesos ($p<0,01$). Todavia, o EHSc reduziu (13 %, $p<0,05$) o peso corporal dos animais obesos a partir da 2ª semana de tratamento, quando comparado com os obesos não tratados. Essa diminuição foi intensificada no grupo Obeso+EHSc na 3ª (16 %, $p<0,05$) e 4ª (17 %, $p<0,05$) semanas (Fig. 1A). No final, o EHSc reduziu o IL dos camundongos obesos em 6 % ($p<0,01$) (Fig. 1B). Como era de se esperar da obesidade induzida pelo MSG, houve aumento expressivo ($p<0,0001$) do TAB retroperitoneal (Fig. 1C) e periepididimal (Fig. 1D) nos grupos obesos. Entretanto, corroborando os dados do peso corporal e IL, o tratamento com EHSc diminuiu o acúmulo desses depósitos adiposos em 14 % ($p<0,05$) e 16 % ($p<0,05$), respectivamente.

Para verificar se os efeitos do EHSc sobre a morfometria dos camundongos obesos constatado acima poderiam ter relação com o aumento da saciedade, o consumo alimentar foi avaliado e não se observou diferenças entre os grupos durante todo o acompanhamento (dados não mostrados). No entanto, quando se testou a atividade lipolítica *ex vivo* do TAB periepididimal, constata-se uma marcante redução da lipólise no grupo Obeso tanto na condição basal (52 %, $p<0,01$) como na estimulada por isoproterenol (62 %, $p<0,0001$), em relação ao grupo Magro (Fig. 1E). Porém, quando se compara o efeito do EHSc sobre essa atividade lipolítica do TAB nos camundongos obesos, constata-se aumento nas condições basal (76 %, $p<0,05$) e estimulada (46 %, $p<0,05$) do grupo Obeso+EHSc em relação ao Obeso (Fig. 1D). A dosagem dos AGL séricos constatou um aumento de 103 % ($p<0,05$) no grupo Obeso sobre o Magro, e uma redução de 30 % nos animais tratados (Fig. 1F).

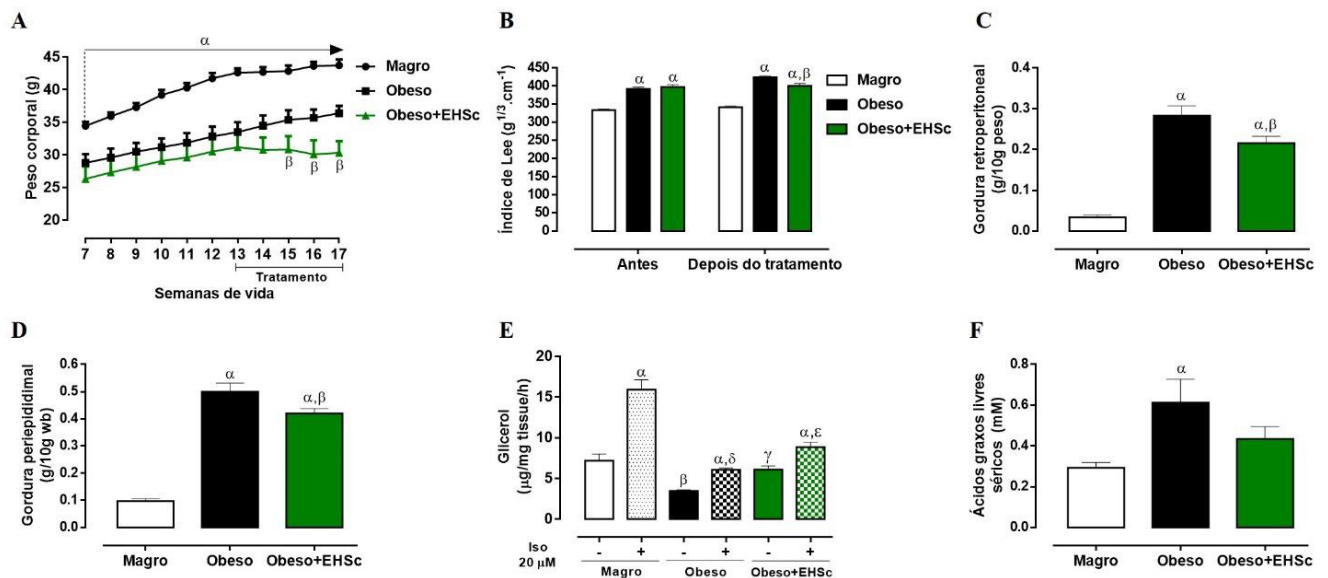
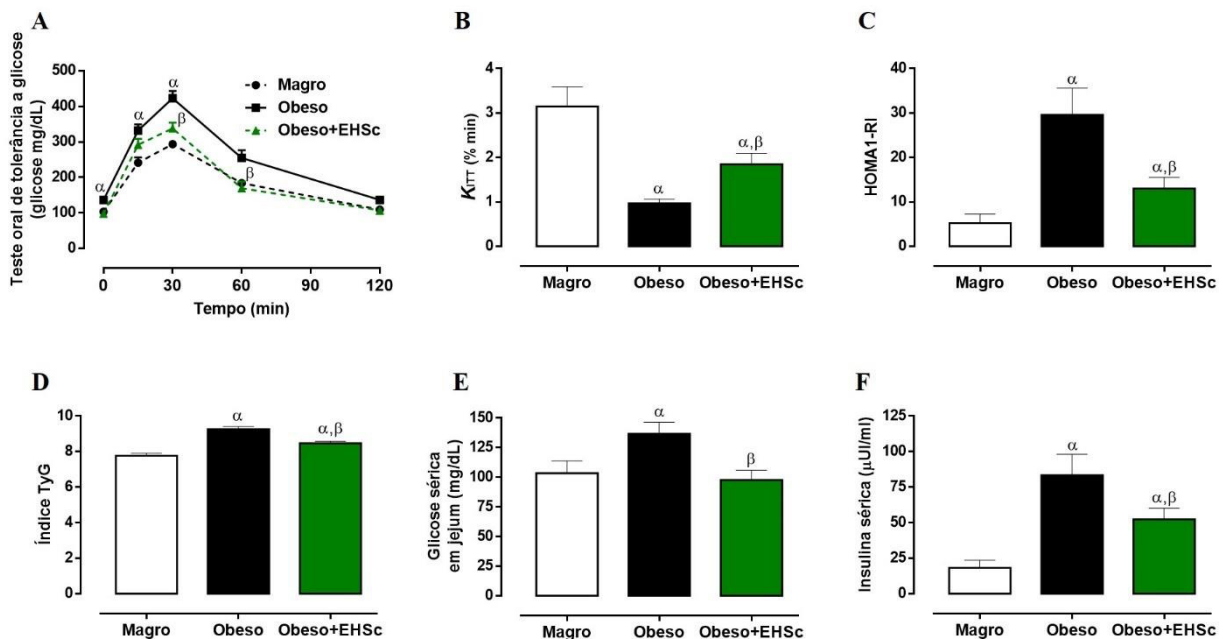


Fig. 1. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) reduz o acúmulo do tecido adiposo branco (TAB) de camundongos obesos-MSG. A. Evolução ponderal. B. Índice de Lee antes e após o tratamento. C. TAB retroperitoneal. D. TAB periepididimal. E. Atividade lipolítica do TAB periepididimal na condição basal (-) e estimulada por isoproterenol (Iso) (+). F. Ácidos graxos livres séricos. **Magro: grupo controle. **Obeso**: grupo obeso. **Obeso+EHSc**: obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 7 por grupo). Letras indicam diferença contra ^aMagro e ^bObeso em A, B, C, D, e F. Em F as letras representam diferenças contra ^abasal (-), ^bMagro (-), ^dMagro (+), ^cObeso (-) e ^eObeso (+). ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).**

4.3.3.2 EHSc melhora a homeostase glico-insulínica de camundongos obesos

O tratamento com EHSc por 4 semanas melhorou a tolerância à glicose dos animais obesos com reduções da glicemia no TOTG de 21 % (p<0,01) e 44 % (p<0,01) nos tempos 30 e 60 min, respectivamente, em relação ao grupo Obeso (Fig. 2A). Uma melhora da sensibilidade à insulina também foi constatada após o tratamento, visto que o grupo Obeso+EHSc apresentou aumento de 90 % (p<0,05) do K_{TTI} quando comparado ao grupo Obeso (Fig. 2B). Esses dados são corroborados pelas diminuições dos índices de RI promovidas pelo tratamento com EHSc, com reduções de 66 % (p<0,01) no HOMA1-RI (Fig. 2C) e 9 % (p<0,01) no TyG (Fig 2D). A melhora desses parâmetros decorrente do tratamento com EHSc deve ter contribuído para a redução de 29 % (p<0,05) dos níveis de glicemia no grupo Obeso+EHSc, quando comparado ao Obeso (Fig. 2E). Além disso, houve diminuição de 47 % (p<0,05) dos níveis séricos de insulina no grupo Obeso+EHSc, em relação a expressiva hiperinsulinemia do grupo Obeso (Fig. 2F).



4.3.3.3 EHSc melhora os perfis lipídicos hepáticos e séricos

O conteúdo lipídico total no fígado dos animais obesos tratados com EHSc estava reduzido em 29 % ($p < 0,05$) em relação ao Obeso (Fig. 3A). Essa redução da gordura total não foi acompanhada por alterações dos níveis de colesterol hepático entre os três grupos (Fig. 3B). Entretanto, o acúmulo dos TAG hepáticos no grupo Obeso+EHSc foi 24 % ($p < 0,05$) menor do que no grupo Obeso (Fig. 3C). Esses efeitos do EHSc no fígado dos animais obesos vão ao encontro com o observado no soro, uma vez que só houve redução (39 %, $p < 0,01$) dos TAG séricos no grupo Obeso+EHSc em relação ao Obeso (Fig. 3D).

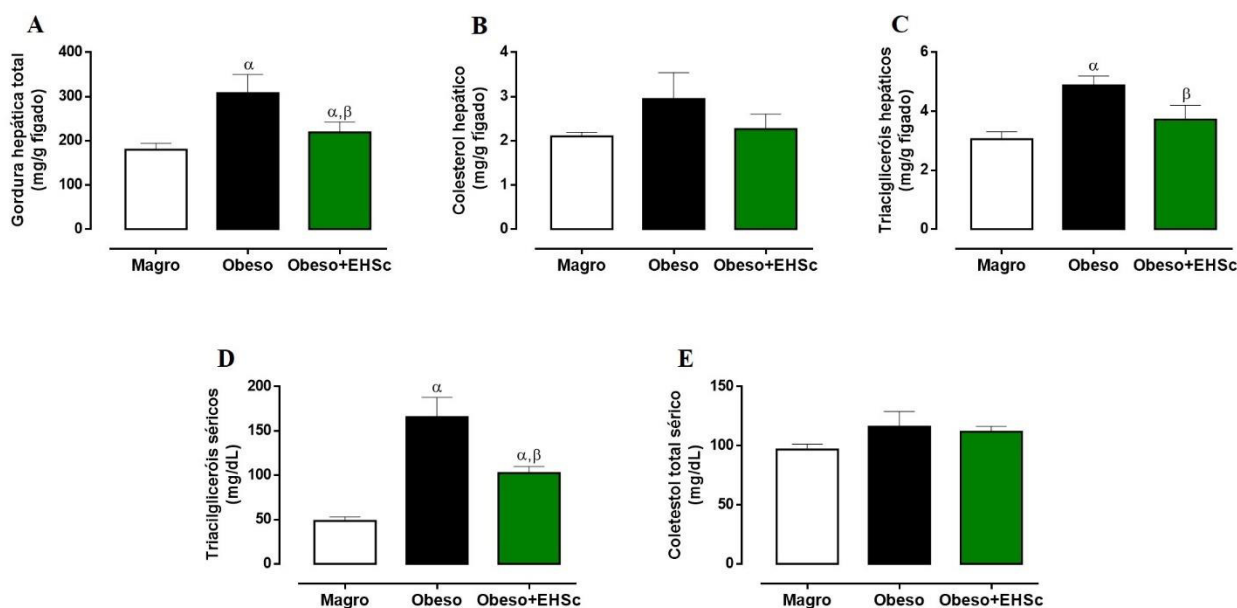


Fig. 3. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) melhora os perfis lipídicos hepático e sérico de camundongos obesos-MSG. A. Gordura total hepática **B.** Colesterol hepático. **C.** Triacilgliceróis hepáticos. **D.** Triacilgliceróis séricos. **E.** Colesterol sérico. **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 7 por grupo). Letras indicam diferença contra ^αMagro e ^βObeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).

4.3.3.4 Efeito do EHSc sobre marcadores da homeostase dos TAG no fígado

A obesidade MSG induziu elevações das expressões gênicas de três fatores de transcrição envolvidos com a homeostase dos TAG hepático, com aumentos expressivos do PPAR- γ (p<0,01; Fig. 4A), PPAR- α (p<0,01; Fig. 4B), SREBP-1c (p<0,05; Fig. 4C), e quando comparado ao grupo Magro. Entretanto, o tratamento por 4 semanas com EHSc reduziu a expressão desses marcadores no fígado dos animais obesos em 60 (p<0,05) (Fig. 4A), 56 (p<0,05) (Fig. 4B) e 45 % (p<0,05) (Fig. 4C), respectivamente. Quando avaliado as enzimas envolvidas na síntese dos TAG, houve elevações expressivas da FAS (p<0,05; Fig. 4D), SCD1 (p<0,01; Fig. 4E) e DGAT2 (p<0,05; Fig. 4F) no grupo Obeso sobre o Magro. O tratamento com EHSc foi capaz de restabelecer a expressão normal da FAS (Fig. 4D) e DGAT2 (Fig. 4E), com reduções, em relação ao grupo Obesos, de 73 % (p<0,05) e 49 % (p<0,05), respectivamente.

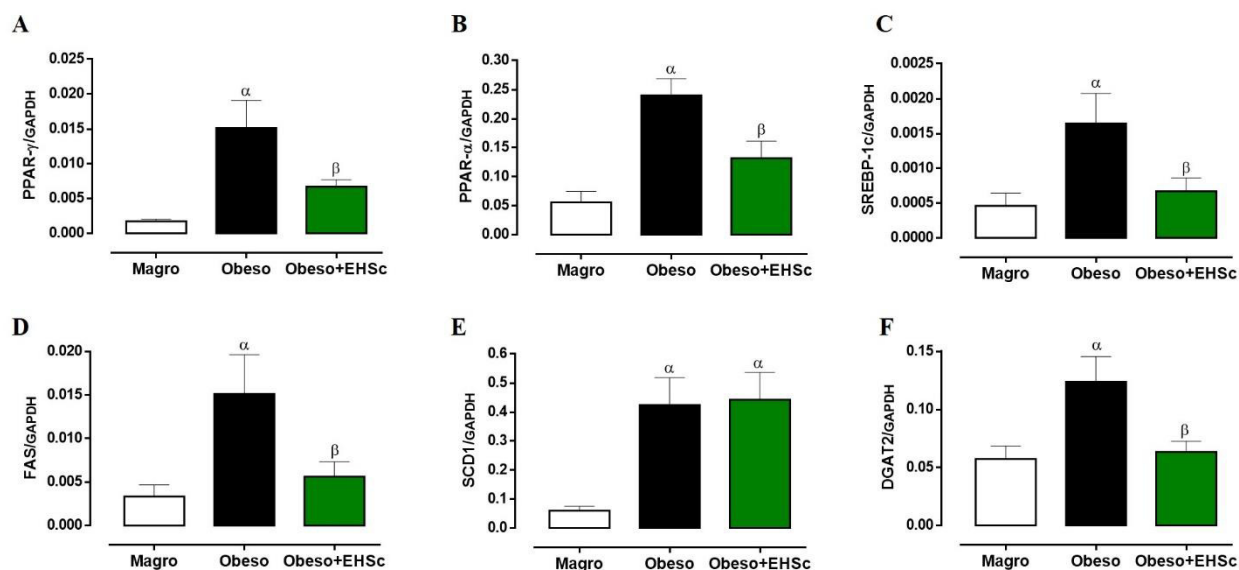


Fig. 4. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) diminui a expressão gênica (qPCR) de marcadores do metabolismo de triacilgliceróis no fígado de camundongos obesos-MSG. **A.** *Peroxisome proliferator-activated receptor-α* (PPAR-α). **B.** *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR-γ). **C.** *Sterol response element-binding protein-1c* (SREBP-1c). **D.** *Fatty acid synthase* (FAS). **E.** *Stearoyl-CoA desaturase-1* (SCD1). **F.** *Diacylglycerol acetyltransferase-2* (DGAT2). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como a média ± EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra ^αMagro e ^βObeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).

4.3.3.5 Efeito do EHSc sobre marcadores da exportação hepática dos TAG

A expressão gênica de proteínas envolvidas na formação e exportação hepática de partícula rica em TAG *very low-density lipoprotein* (VLDL) foram avaliadas na Fig. 5. Quando comparado aos animais magros, os fígados dos animais obesos apresentaram elevações das expressões de 186 % (p<0,05) da ApoB (Fig. 5A) e 118 % (p<0,05) da MTTP (Fig.5C). O tratamento com EHSc conseguiu normalizar os níveis gênicos desses marcadores, com reduções de 50 % (p<0,05) da ApoB (Fig. 5A) e 46 % (p<0,05) da MTTP (Fig. 5C) sobre o grupo Obeso. Não foram verificadas alterações na expressão gênica da PDI entre os três grupos avaliados (Fig. 5B).

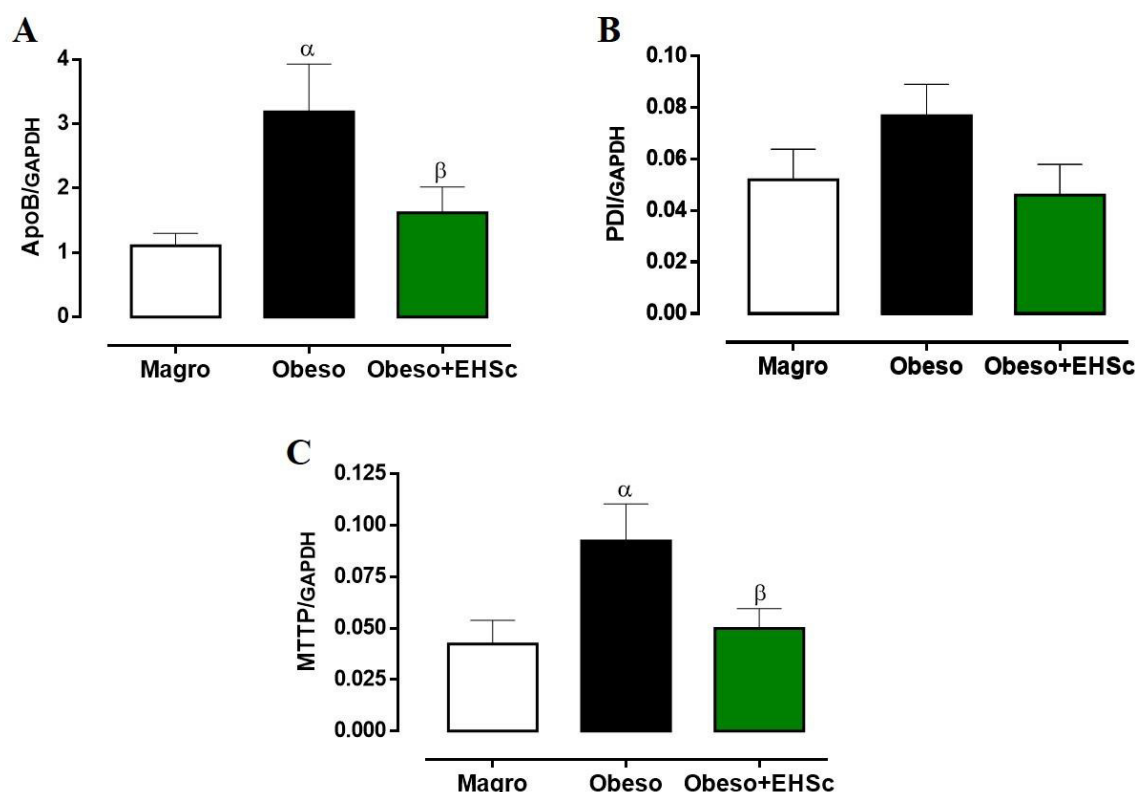


Fig. 5. Tratamento com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHS) reduz a expressão gênica (qPCR) de marcadores da exportação de triacilgliceróis no fígado de camundongos obesos-MSG. **A.** Apolipoprotein B (ApoB). **B.** Microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). **C.** Protein disulfide isomerase (PDI). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHS:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHS. Resultados expressos como a média $\pm$ EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra ^αMagro e ^βObeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).

4.3.3.6 Efeito do EHS sobre vias do estresse do RE hepático

Avaliando o efeito do tratamento por 4 semanas com EHS sobre marcadores chaves do estresse do RE hepático, verifica-se, primeiramente, reduções das expressões gênicas da GRP78 de 49 % (p<0,01) e 53 % (p<0,01) nos grupos Obeso e Obeso+EHS, respectivamente, quando comparado com o grupo Magro (Fig. 6A). Na análise dos níveis RNAm dos três sensores do estresse do RE, não houve diferenças entre os grupos para o ATF6 (Fig. 6B) e IRE1 α (Fig. 6C). Entretanto, há uma proeminente elevação (144 %, p<0,01) da expressão da PERK nos animais obesos sem tratamento, quando comparado ao grupo Magro (Fig. 6D). Fato que foi revertido pelo EHS, uma vez que a expressão da PERK no grupo Obeso+EHS foi diminuída em 77 % (p<0,05) em relação ao grupo Obeso (Fig. 6D). Os níveis de RNAm de NRF2 foram maiores no grupo Obeso (p<0,01) sobre o Magro, e o EHS diminuiu a expressão desse fator de transcrição em 50 % (p<0,05) nos animais tratados em relação ao grupo Obeso (Fig. 6E).

Não foram observadas diferenças na expressão gênica da CHOP entre os grupos experimentais (Fig. 6F).

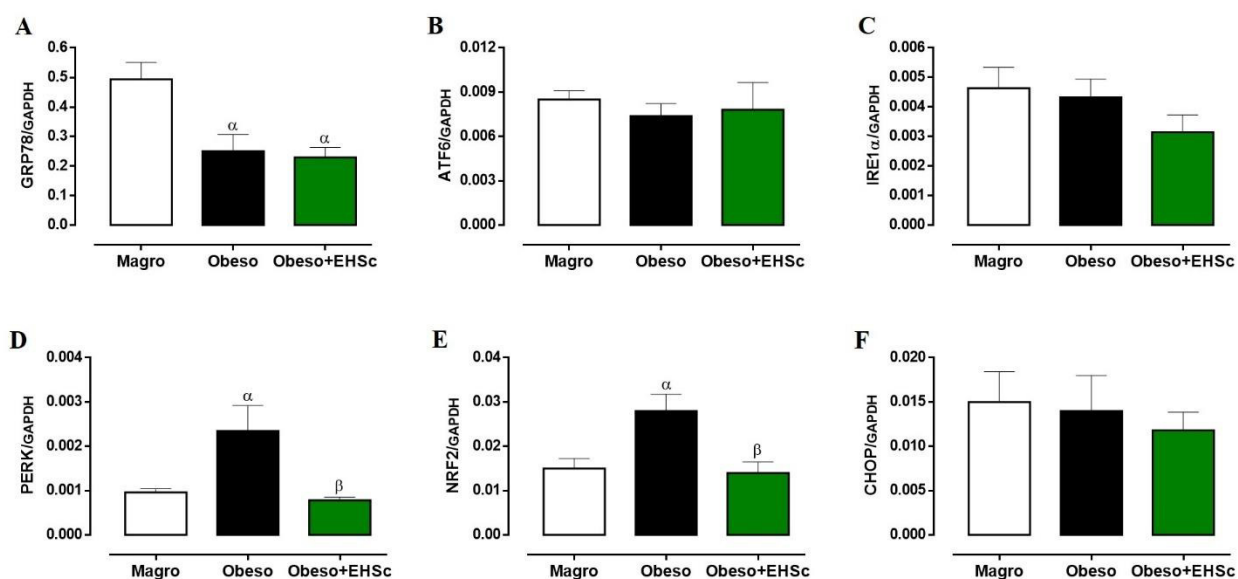


Fig. 6. Tratamento com extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc) sobre a expressão gênica (qPCR) de marcadores do estresse do retículo endoplasmático hepático de camundongos obesos-MSG. **A.** *Glucose-regulated protein 78* (GRP98). **B.** *Activating transcription factor 6* (ATF6). **C.** *Inositol-requiring enzyme 1α* (IRE1α). **D.** *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK). **E.** *C/EBP homologous protein* (CHOP). **F.** *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2). **Magro:** grupo controle. **Obeso:** grupo obeso. **Obeso+EHSc:** obesos tratados por 4 semanas com 0,5 g/kg de EHSc. Resultados expressos como a média ± EPM da razão da expressão do gene de interesse pelo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (n= 6 por grupo). Letras indicam diferença contra ^αMagro e ^βObeso. ANOVA; Newman-Keuls (p<0,05).

4.3.4 Discussão

Em estudo de Sanches et al. (2016) demonstramos que o EHSc diminui o acúmulo de triglicerídeos hepáticos e a hipertrigliceridemia típica em ratos obesos induzidos pelo MSG. No presente trabalho, a administração oral do mesmo extrato, por 4 semanas, em camundongos obesos-MSG confirmou esses achados anteriores sobre o metabolismo lipídico hepático. Além disso, investigando por quais mecanismos esse extrato poderia estar atuando, observou-se que tais efeitos devem estar relacionados a uma inibição de fatores de transcrição (SREBP-1c e PPAR-γ) e enzimas (FAS e DGAT2) lipogênicas. Esses efeitos podem ser explicados tanto pela melhora da sensibilidade periférica à ação da insulina promovida pelo EHSc, como pela sua capacidade de regulação da homeostase do RE hepática, principalmente, através da *downregulation* da PERK, que é um dos principais indutores lipogênicos relacionado ao estresse do RE.

Como constatado na Fig. 1A, os camundongos obesos-MSG apresentaram, durante toda a avaliação, um menor peso corporal em relação aos magros. Essa peculiaridade desse modelo de obesidade ocorre porque esses animais são mais curtos (dados não mostrados) do que seus controles. Característica determinada pela presença de uma disfunção da secreção pulsátil do hormônio do crescimento (HG), que é decorrente da diminuição da produção do hormônio liberador de HG pelo núcleo arqueado, que foi lesionado ainda no período neonatal pelas administrações parenterais de MSG (Millard, Martin, Audet, Sagar, & Martin, 1982). Todavia, outra evidente característica desses animais é o aumento expressivo da adiposidade (Fig. 1B, C, e D), que é resultante da hiperatividade vagal e hipoatividade simpática presente nesse modelo de obesidade, os quais contribuem para a maior secreção de insulina e menor catabolismo no TAB (Andreazzi et al., 2011; Scomparin et al., 2009).

Neste trabalho, a administração do EHSc por 4 semanas em camundongos obesos-MSG diminuiu o peso corporal (Fig. 1A) e IL (Fig. 1B) desses animais. Efeitos explicados pelos menores acúmulos dos TAB retroperitoneal (Fig. 1C) e periepídídimo (Fig. 1D) observado ao fim do tratamento. Esses dados ratificam a eficácia desse extrato na melhora desse tipo de obesidade, uma vez que já foram observadas ações semelhantes com o mesmo EHSc e mesma dose em ratos obesos-MSG (Sanches et al., 2016). Além disso, esses resultados podem dar subsídios para justificar o uso dessa espécie para a perda de peso em determinadas populações (Cercato et al., 2015; Dickel et al., 2007), embora essas ações demonstradas pelo extrato devam ser avaliadas em outros modelos de obesidade como os dietéticos.

Como o EHSc promoveu redução da adiposidade sem interferir na ingesta energética (dados não mostrados), realizou-se a avaliação da atividade lipolítica do TAB (Fig. 1E). A menor atividade lipolítica observada nos camundongos obesos-MSG é característica desse modelo de obesidade (Dolnikoff, Martin-Hidalgo, Machado, Lima, & Herrera, 2001) e favorece o grande acúmulo de TAB nesses animais (Fig. 1C e D). Entretanto, reproduzindo nossos dados anteriores com ratos obesos-MSG (Sanches et al., 2016), o EHSc aumentou a taxa de lipólise dos camundongos obesos tanto em condições basais, quanto sob estímulo adrenérgico com isoproterenol (Fig. 1E). Esses efeitos devem contribuir para o menor acúmulo de gordura observado nesses animais tratados (Fig. 1C e D), provavelmente, através do aumento do metabolismo energético basal pelo aumento da atividade simpática (Thorp & Schlaich, 2015).

Esse estímulo do simpático pode ser devido à presença da miricetina e seus derivados, metabólitos mais presentes no EHSc (Sanches et al., 2016), uma vez que esses compostos

inibem a atividade da catecol-O-metiltransferase (COMT), enzima responsável pela degradação da norepinefrina, o que prolongará a atividade adrenérgica dessa catecolamina e, conseqüentemente, induzindo maior atividade lipolítica (Zhu & Jia, 2014). A miricetina tem apresentado importantes efeitos antiobesidade, visto que sua administração (300 mg/kg/dia, via oral) por 8 semanas diminuiu o peso e os depósitos adiposos de ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura (DRG) (Chang, Tzeng, Liou, Chang, & Liu, 2012). Efeito que pode ser decorrente da capacidade desse polifenol de estimular a lipólise em adipócitos, principalmente através da *downregulation* da perilipina A e ativação da via da MAPK nessas células (Wang, Wang, Yang, You, & Zhang, 2015). Além disso, o EHSc contém galotaninos, tais como pentagaloil-glicose (Sanches et al., 2016), cuja administração por 21 dias (10, 25 e 50 mg/kg/dia) diminuiu o ganho de peso de camundongos com obesidade induzida por DRG (Mohan, Viswanatha, Savinay, Rajendra, & Halemani, 2013).

A hipertrofia do TAB tanto no modelo em estudo (Gaspar et al., 2016) como na obesidade humana (Cinti et al., 2005) é determinado pelo mau funcionamento e disfunção desse tecido que começa a liberar vários compostos bioativos, dentre os quais destaca-se os AGL (Lafontan, 2014). Quando esses lipídeos séricos foram avaliados, constatou-se elevações nos animais obesos (Fig. 1F), como observado em outros modelos de obesidade (Pinto et al., 2016) e humanos obesos (Boden, 2011). Embora o tratamento com as sementes de *S. cumini* tenham promovido reduções dos níveis dos AGL em coelhos (Kedar & Chakrabarti, 1983) e ratos (Ravi, Rajasekaran, & Subramanian, 2005) diabéticos induzidos estreptozotocina (STZ), este trabalho não observou diferença estatística com o extrato das folhas em camundongos obesos MSG (Fig. 1F). Diferente do que observamos em ratos obesos-MSG com a mesma dose, mas após 8 semanas de tratamento (dados em publicação), demonstrando um provável efeito tempo-dependente do EHSc sobre esse lipídio sérico.

Além de um TAB disfuncional, o aumento dos AGL séricos também é indicativo de uma alteração da sensibilidade à insulina nesse tecido, visto que esse hormônio controla a liberação e captação desses lipídeos pelo TAB (Templeman, Skovso, Page, Lim, & Johnson, 2017). O tratamento com o EHSc foi capaz de melhorar as tolerâncias à glicose (Fig. 2A) e insulina (Fig. 2B), e os índices HOMA1-RI (Fig. 2C) e TyG (Fig. 2D) dos animais obesos. Essa melhora da sensibilidade insulínica pelo EHSc foi acompanhada de uma redução da glicemia em jejum (Fig. 2E), o que deve ter diminuído sobrecarga pancreática fazendo com que haja uma menor produção de insulina pelas células- β e, conseqüentemente, reduzindo a insulinemia,

como observado na Fig. 2F. O efeito antidiabético de *S. cumini* é bem propalado na literatura e mais concentrado aos efeitos dos frutos e sementes em modelos de diabetes isolado (Ayyanar & Subash-Babu, 2012), por isso a importância deste estudo com as folhas em modelos de RI associada à obesidade. O efeito hipoglicemiante do extrato etanólico bruto das folhas foi observado em ratos diabéticos induzidos por aloxana (Schoenfelder et al., 2010) e STZ (Baldissera et al., 2016). As elevadas concentrações de miricetina neste e em outros extratos das folhas (Baldissera et al., 2016) podem contribuir para essas ações sobre o metabolismo glicídico, visto que esse composto reduziu a glicemia e aumentou a sensibilidade insulínica em animais obesos induzidos por dieta rica em sacarose e gordura (H. N. Choi, Kang, Lee, & Kim, 2014), além de ter melhorado o TOTG e ITT de camundongos obesos *db/db* (Hu et al., 2017).

Essas alterações glico-lipídicas observadas anteriormente afetam diretamente o metabolismo hepático, uma vez que tanto o aumento dos AGL (Fig. 1F) como as hiperglicemia (Fig. 2E) e insulinemia (Fig. 2F) dos animais obesos favorecem a síntese direta e *de novo* de lipídios no fígado (Reccia et al., 2017). Avaliando o perfil lipídico hepático dos grupos experimentais, constatou-se que tanto o acúmulo de gordura total (Fig. 3A) como dos TAG (Fig. 3C) hepáticos foram reduzidos após o tratamento com EHSc, embora não tenha havido alterações no colesterol (Fig. 3B) como demonstrado em outros estudos com animais obesos-MSG (Bonfleur et al., 2015; Franca et al., 2014). A diminuição da concentração de TAG no fígado tem sido observada com o tratamento com extratos de sementes de *S. cumini* tanto em animais com esteatose hepática induzida por álcool (Hossain et al., 2011) como em diabéticos induzidos por STZ (Ravi et al., 2005), sendo o único estudo que observou reduções de acúmulo de TAG hepático utilizando as folhas de *S. cumini* foi o nosso em ratos obesos (Sanches et al., 2016). Mais uma vez, a miricetina e seus derivados podem ter um papel importante nesse contexto, melhorando tanto a sensibilidade insulínica (H. N. Choi et al., 2014) como a oxidação lipídica no fígado (Chang et al., 2012). Mais recentemente esse polifenol demonstrou capacidade de redução da esteatose hepática em camundongos obesos *db/db* através da ativação e maior liberação de adiponectina pelo tecido adiposo marrom (Hu et al., 2017), parâmetros que não foram avaliados neste trabalho, representando limitações do mesmo.

A hipertrigliceridemia de jejum associada à obesidade é decorrente, principalmente, do maior acúmulo de TAG hepáticos e a consequente exportação dos mesmos nas partículas de VLDL (Reccia et al., 2017). Corroborando com outros estudos (Franca et al., 2014; Fujimoto et al., 2012), os camundongos obesos-MSG utilizados neste trabalho estavam

hipertrigliceridêmicos, e o tratamento com o EHSc foi capaz de reduzir esse parâmetro sérico (Fig. 3D). Essa capacidade de redução dos TAG séricos já foi observado com extratos das sementes tanto em ratos diabéticos STZ após 14 dias de tratamento com o extrato etanólico (200 mg/kg/dia) (Sharafeldin & Rizvi, 2015), como em humanos com DM2 após 60 dias de suplementação com o pó (10 g/dia) (Sidana et al., 2016). Além disso, o extrato alcoólico das folhas também apresentou efeitos hipolipemiantes tanto em ratos diabéticos induzidos por DRG e STZ (Baldissera et al., 2016), como em obesos-MSG (Sanches et al., 2016).

Para investigar mais a fundo por quais mecanismos moleculares o EHSc poderia estar atuando no fígado, nos propusemos avaliar os principais marcadores moleculares de síntese e exportação de TAG hepático. Para isso, inicialmente foi determinado a expressão gênica de fatores de transcrição envolvidos com o metabolismo lipídico como o PPAR- α , PPAR- γ e SREBP-1c (Fig. 4). Os PPARs são importantes sensores da homeostase lipídica, sendo o PPAR- α o mais abundante no fígado com importante função de induzir a β -oxidação lipídica, e o PPAR- γ um estimulador da expressão de genes lipogênicos e de formação dos *lipid droplets* (Gross, Pawlak, Lefebvre, & Staels, 2017). O SREBP-1c é considerado o principal fator de transcrição lipogênico hepático, com papel chave na expressão das enzimas de síntese *de novo* de TAG (Ferre & Foufelle, 2010).

Como observado em estudos com humanos (Pettinelli & Videla, 2011) e em roedores (Abd El-Haleim, Bahgat, & Saleh, 2016; Jia, Wu, Kim, Kim, & Lee, 2016) com DHGNA, o fígado dos camundongos obesos-MSG apresentaram aumento das expressões do PPAR- γ (Fig. 4A), (Fig. 4B) e SREBP-1c (Fig. 4C). O aumento da expressão de PPAR- α representa uma resposta inicial e adaptativa do hepatócito contra o maior acúmulo de gordura, uma vez que esse fator aumenta em primeiro momento e diminui com a progressão da DHGNA (Francque et al., 2015). De toda forma, o tratamento com EHSc foi capaz de reduzir a expressão genica desses três fatores de transcrição, demonstrando a capacidade do EHSc em diminuir vias *upstream* de síntese de TAG, fato ainda não observado com as folhas dessa espécie vegetal.

Esses efeitos podem ser, em parte, pela ação da miricetina, visto que sua administração oral (300 mg/kg/dia) por 8 semanas reduziu a expressão proteica da SREBP-1c no fígado de ratos obesos induzidos por DRG (Chang et al., 2012). Além disso, a suplementação (0,12 %) desse composto na dieta por 12 semanas reduziu as expressões gênicas e proteicas do PPAR- γ em camundongos com DHGNA induzida por DRG (Xia et al., 2016). Também é importante destacar que a ação conjunta dos compostos fenólicos, bastante presente no EHSc (seção

4.3.2.1), pode contribuir diretamente para diminuição da esteatose hepática tanto por redução da expressão do fator transcrição como o SREBP-1c, como pela melhora da sinalização insulínica no hepatócito (Salomone, Godos, & Zelber-Sagi, 2016).

Com isso, foi-se avaliar o efeito do extrato sobre as vias de síntese *de novo* (FAS e SCD1) e final (DGAT2) de TAG hepático (Postic & Girard, 2008). Corroborando os dados dos fatores de transcrição acima, os fígados dos animais do grupo Obeso+EHSc apresentavam diminuições das expressões gênica das enzimas de síntese de ácidos graxos (FAS) (Fig. 4D) e de produção final de TAG (DGAT2) (Fig. 4F). Especificamente sobre a FAS, a epigallocatequina galato, também presente no EHSc (Sanches et al., 2016), suplementada (1,0 %) na dieta por 4 dias, diminuiu a expressão gênica dessa enzima em camundongos alimentados com DRG (Friedrich, Petzke, Raederstorff, Wolfram, & Klaus, 2012). A *downregulation* dessas vias pode explicar o menor acúmulo de TAG nos animais tratados com EHSc (Fig. 3C) neste estudo e no anterior com ratos obesos (Sanches et al., 2016). Além disso, o extrato também foi capaz de reduzir a expressão gênica de proteínas envolvidas na montagem e exportação de VLDL (Sundaram & Yao, 2010) como a ApoB (Fig. 5A) e MTP (Fig. 5C), o que justifica a diminuição da trigliceridemia observada nos camundongos obesos tratados (Fig. 3D). Em um estudo recente do nosso grupo (dados em publicação), sustentamos a hipótese de que o a menor expressão da MTP pode ser devida a uma ação do EHSc sobre o estresse do RE no fígado.

Na última década, o estresse do RE hepático tem sido proposto como um dos principais responsáveis pelo surgimento e manutenção da DHGNA e dislipidemias associadas à síndrome metabólica (Cnop, Foufelle, & Velloso, 2012). O gatilho inicial desse estresse ocorre pelo desligamento da chaperona GRP78 das proteínas sensoras do RE (PERK, IRE1 α e ATF6) e consequente ativação da UPR (Cnop et al., 2012). A expressão gênica da GRP78 se apresentou diminuída nos animais obesos e o tratamento não foi capaz de reverter essa alteração (Fig. 6A). A redução do RNAm da GRP78 favorece indução da UPR uma vez que resulta em uma menor tradução da mesma, fato também observado em fígados humanos com DHGNA (Lake et al., 2014) e de gansos alimentados com dieta rica em sacarose (Geng et al., 2016). Em relação aos sensores da UPR hepática, este é primeiro estudo que avalia esses marcadores da UPR em animais obesos-MSG, onde não se observaram alterações nas expressões da ATF6 (Fig. 6B) e IRE1 α (Fig. 6C), embora a indução do estresse do RE tenha sido demonstrada pelo aumento da PERK, que foi reduzido a níveis semelhantes no grupo Magro após o tratamento com o EHSc (Fig. 6D).

A PERK é um importante regulador da lipogênese associada ao estresse do RE (Salvado, Palomer, Barroso, & Vazquez-Carrera, 2015). Bobrovnikova-Marjon et al. (2008) demonstraram que a deleção da PERK reduz a expressão de enzimas relacionadas à síntese *de novo* como a FAS em fibroblastos de camundongos. Em hepatócitos, a ativação da PERK contribui para o acúmulo de lipídeos via SREBP-1c (Lauressergues et al., 2012). Além disso, a inibição de intermediários dessa via como a desfosforilação da eIf2 α (Oyadomari, Harding, Zhang, Oyadomari, & Ron, 2008) e a deleção do Atf4 (Li et al., 2011; Xiao et al., 2013) no fígado de camundongos os protege contra a DHGNA induzido por dieta, uma vez que diminui as expressões de fatores de transcrição (PPAR- γ , PPAR- α e SREBP-1c) e enzimas lipogênicas (FAS e *acetyl-CoA-carboxylase*). Para avaliar se essa maior expressão da PERK está relacionada com ativação de vias adaptativas ou apoptóticas nos animais obesos, quantificou-se o RNAm da NRF2 (Fig. 6E) e CHOP (Fig. 7F), onde se observou a indução da via adaptativa (Cnop et al., 2012) uma vez que apenas o NRF2 estava aumentado no fígado do grupo Obeso, sendo que o extrato foi capaz de reduzir a sobrecarga dessa via, com a diminuição da expressão desse fator de transcrição a níveis semelhantes ao grupo Magro (Fig. 6E).

Dentre as classes de compostos bastante presente no EHSc, que podem atenuar essa ativação da UPR, destacam-se os polifenóis. A preincubação do extrato rico em polifenóis da uva *Vitis rotundifolia* inibiu a via da PERK em células endoteliais de retina humana estimuladas com taspigargina (Ha et al., 2014). A ingestão, por 20 semanas, de extratos ricos em polifenóis de *Punica granatum* e *Camellia sinensis* diminuíram a ativação da UPR no músculo esquelético de camundongos obesos por dieta rica em gordura (Rodriguez et al., 2015). Outro composto também presente no EHSc e que reduz o estresse do RE em células endoteliais humanas é o flavonoide epigallocatequina galato (J. Wu et al., 2014). Além deste, outros flavonoides já promoveram reduções da ativação da via PERK em condições de estresse, como o campferol em células cardíacas expostas a isquemia (Kim et al., 2008) e a apigenina em células neuronais induzidas por taspigargina e brefeldina A (A. Y. Choi et al., 2010).

O excesso de lipídeos no hepatócito induz maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) via sobrecarga da β -oxidação lipídica mitocondrial. Isso estimula a ativação da UPR, o que induz mais produção de ROS tornando o ciclo vicioso (Bozaykut, Sahin, Karademir, & Ozer, 2016). É sabido que o extrato de *S. cumini* apresenta uma elevada capacidade antioxidante (Sanches et al., 2016). Com isso, seus efeitos sobre o estresse do RE no fígado dos camundongos obesos (Fig. 6D) podem também ser explicados pelo

reestabelecimento do desbalanço redox, já caracterizado nesse modelo de obesidade (Park et al., 2010; Seiva, Chuffa, Braga, Amorim, & Fernandes, 2012). Sendo assim, não obstante os efeitos aqui descritos, são necessários estudos que avaliem a melhora do estado redox hepático dos roedores obesos tratados com o EHSc.

Em conjunto, nossos dados demonstram que o tratamento de camundongos obesos-MSG com o extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* reduz o acúmulo dos TAG hepáticos associado a diminuições das expressões de fatores de transcrição e enzimas lipogênicas. Esse efeito pode ser explicado, em parte, pela melhora da sensibilidade insulínica resultante de um menor acúmulo de tecido adiposo, mas também por atenuar o estresse do RE hepático através da *downregulation* da via da PERK, um importante indutor da síntese de TAG. Com isso, demonstra-se possíveis mecanismos de ação para o efeito de reversão da esteatose hepática promovido pelas folhas dessa espécie vegetal tão utilizada no contexto etnofarmacológico mundial, além de apontar a via da PERK como possível alvo terapêutico para distúrbios do metabolismo lipídico hepático associados à síndrome metabólica.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse neste trabalho.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte dado à este trabalho através dos financiamentos aprovados pelos processos Universal-00792/14, PAEDT-02182/15 e Universal-00643/15. Também agradecemos à FAPEMA pela bolsa de estágio nacional (ESTAGIO-05416/15) concedida ao Lucas França. Em especial, ao grupo do LeFisio por todo apoio e suporte técnico disponibilizado.

Referências

- Abd El-Haleim, E. A., Bahgat, A. K., & Saleh, S. (2016). Effects of combined PPAR-gamma and PPAR-alpha agonist therapy on fructose induced NASH in rats: Modulation of gene expression. *Eur J Pharmacol*, 773, 59-70. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.011
- Andreazzi, A. E., Grassioli, S., Marangon, P. B., Martins, A. G., de Oliveira, J. C., Torrezan, R., de Freitas Mathias, P. C. (2011). Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. *Experimental diabetes research*, 2011.

- Ayyanar, M., & Subash-Babu, P. (2012). *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(3), 240-246. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60050-1
- Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M., & Fougelle, F. (2016). Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nature Reviews Endocrinology*.
- Baldissera, G., Sperotto, N. D., Rosa, H. T., Henn, J. G., Peres, V. F., Moura, D. J., . . . Saffi, J. (2016). Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. *J Ethnopharmacol*, 194, 1012-1021. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.056
- Bernardis, L. L., & Patterson, B. D. (1968). Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*, 40(4), 527-528.
- Bobrovnikova-Marjon, E., Hatzivassiliou, G., Grigoriadou, C., Romero, M., Cavener, D. R., Thompson, C. B., & Diehl, J. A. (2008). PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16314-16319.
- Boden, G. (2011). Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 18(2), 139-143. doi: 10.1097/MED.0b013e3283444b09
- Bonfleur, M. L., Borck, P. C., Ribeiro, R. A., Caetano, L. C., Soares, G. M., Carneiro, E. M., & Balbo, S. L. (2015). Improvement in the expression of hepatic genes involved in fatty acid metabolism in obese rats supplemented with taurine. *Life Sci*, 135, 15-21. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.019
- Bozaykut, P., Sahin, A., Karademir, B., & Ozer, N. K. (2016). Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mech Ageing Dev*, 157, 17-29. doi: 10.1016/j.mad.2016.07.001
- Braboza Da Silva, N., Del Fino, A., Esquibel, M., Santos, J., & de Almeida, M. (2012). Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II–Bahia, Brasil. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 11(5), 435-453.
- BRASIL, R. (2009). Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. *portal. saúde. gov. br/portal/arquivos/pdf/RENISUS. pdf*. Accessed in: 07/24/2016.
- Cercato, L. M., White, P. A., Nampo, F. K., Santos, M. R., & Camargo, E. A. (2015). A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *J Ethnopharmacol*, 176, 286-296. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.038
- Chagas, V. T., Franca, L. M., Malik, S., & Paes, A. M. (2015). *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Front Pharmacol*, 6, 259. doi: 10.3389/fphar.2015.00259
- Chang, C. J., Tzeng, T. F., Liou, S. S., Chang, Y. S., & Liu, I. M. (2012). Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 787152. doi: 10.1155/2012/787152
- Choi, A. Y., Choi, J. H., Lee, J. Y., Yoon, K. S., Choe, W., Ha, J., . . . Kang, I. (2010). Apigenin protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int*, 57(2), 143-152. doi: 10.1016/j.neuint.2010.05.006
- Choi, H. N., Kang, M. J., Lee, S. J., & Kim, J. I. (2014). Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Nutr Res Pract*, 8(5), 544-549. doi: 10.4162/nrp.2014.8.5.544

- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., . . . Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46(11), 2347-2355. doi: 10.1194/jlr.M500294-JLR200
- Cnop, M., Foufelle, F., & Velloso, L. A. (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*, 18(1), 59-68. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010
- Dickel, M. L., Rates, S. M., & Ritter, M. R. (2007). Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J Ethnopharmacol*, 109(1), 60-71. doi: 10.1016/j.jep.2006.07.003
- Dolnikoff, M., Martin-Hidalgo, A., Machado, U., Lima, F., & Herrera, E. (2001). Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *International journal of obesity*, 25(3), 426-433.
- Ferre, P., & Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*, 12 Suppl 2, 83-92. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x
- Franca, L. M., Freitas, L. N., Chagas, V. T., Coelho, C. F., Barroso, W. A., Costa, G. C., . . . Paes, A. M. (2014). Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(2), 725-730. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.042
- Francque, S., Verrijken, A., Caron, S., Prawitt, J., Paumelle, R., Derudas, B., . . . Staels, B. (2015). PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 63(1), 164-173. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.019
- Freedman, B. D., Lee, E. J., Park, Y., & Jameson, J. L. (2005). A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor- γ knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J Biol Chem*, 280(17), 17118-17125. doi: 10.1074/jbc.M407539200
- Friedrich, M., Petzke, K. J., Raederstorff, D., Wolfram, S., & Klaus, S. (2012). Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dietary lipids in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*, 36(5), 735-743. doi: 10.1038/ijo.2011.136
- Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Fujimoto, T., Selmi, C., Gershwin, M. E., & Shimada, Y. (2012). Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis*, 44(9), 767-774. doi: 10.1016/j.dld.2012.02.002
- Gaspar, R. S., Benevides, R. O., Fontelles, J. L., Vale, C. C., Franca, L. M., Barros Pde, T., & Paes, A. M. (2016). Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol*, 229(2), 61-72. doi: 10.1530/joe-15-0453
- Geng, T., Zhao, X., Xia, L., Liu, L., Li, F., Yang, B., . . . Gong, D. (2016). Supplementing dietary sugar promotes endoplasmic reticulum stress-independent insulin resistance and fatty liver in goose. *Biochemical and biophysical research communications*.
- Gentile, C. L., Frye, M., & Pagliassotti, M. J. (2011). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal*, 15(2), 505-521. doi: 10.1089/ars.2010.3790

- Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2017). PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*, 13(1), 36-49. doi: 10.1038/nrendo.2016.135
- Ha, J. H., Shil, P. K., Zhu, P., Gu, L., Li, Q., & Chung, S. (2014). Ocular inflammation and endoplasmic reticulum stress are attenuated by supplementation with grape polyphenols in human retinal pigmented epithelium cells and in C57BL/6 mice. *J Nutr*, 144(6), 799-806. doi: 10.3945/jn.113.186957
- Hossain, S., Chowdhury, I. H., Basunia, M. A., Nahar, T., Rahaman, A., Choudhury, B. K., . . . Uddin, B. (2011). Syzygium cumini seed extract protects the liver against lipid peroxidation with concurrent amelioration of hepatic enzymes and lipid profile of alcoholic rats. *J Complement Integr Med*, 8. doi: 10.2202/1553-3840.1445
- Hu, T., Yuan, X., Wei, G., Luo, H., Lee, H. J., & Jin, W. (2017). Myricetin-induced brown adipose tissue activation prevents obesity and insulin resistance in db/db mice. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-017-1433-z
- Jia, Y., Wu, C., Kim, J., Kim, B., & Lee, S. J. (2016). Astaxanthin reduces hepatic lipid accumulations in high-fat-fed C57BL/6J mice via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and inhibition of PPAR gamma and Akt. *J Nutr Biochem*, 28, 9-18. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.015
- Kedar, P., & Chakrabarti, C. H. (1983). Effects of jambolan seed treatment on blood sugar, lipids and urea in streptozotocin induced diabetes in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol*, 27(2), 135-140.
- Kim, D. S., Ha, K. C., Kwon, D. Y., Kim, M. S., Kim, H. R., Chae, S. W., & Chae, H. J. (2008). Kaempferol protects ischemia/reperfusion-induced cardiac damage through the regulation of endoplasmic reticulum stress. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 30(2), 257-270. doi: 10.1080/08923970701812530
- Kunwar, R. M., Uprety, Y., Burlakoti, C., Chowdhary, C., & Bussmann, R. W. (2009). Indigenous use and ethnopharmacology of medicinal plants in far-west Nepal. *Ethnobot Res Appl* 7, 005-028.
- Lafontan, M. (2014). Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*, 40(1), 16-28. doi: 10.1016/j.diabet.2013.08.002
- Lake, A. D., Novak, P., Hardwick, R. N., Flores-Keown, B., Zhao, F., Klimecki, W. T., & Cherrington, N. J. (2014). The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *toxicological sciences*, 137(1), 26-35.
- Lauressergues, E., Bert, E., Duriez, P., Hum, D., Majd, Z., Staels, B., & Cussac, D. (2012). Does endoplasmic reticulum stress participate in APD-induced hepatic metabolic dysregulation? *Neuropharmacology*, 62(2), 784-796. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.048
- Leavens, K. F., & Birnbaum, M. J. (2011). Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46(3), 200-215. doi: 10.3109/10409238.2011.562481
- Li, H., Meng, Q., Xiao, F., Chen, S., Du, Y., Yu, J., . . . Guo, F. (2011). ATF4 deficiency protects mice from high-carbohydrate-diet-induced liver steatosis. *Biochem J*, 438(2), 283-289. doi: 10.1042/BJ20110263
- Lonardo, A., Sookoian, S., Pirola, C. J., & Targher, G. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism*, 65(8), 1136-1150. doi: 10.1016/j.metabol.2015.09.017

- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Millard, W. J., Martin, J. B., Jr., Audet, J., Sagar, S. M., & Martin, J. B. (1982). Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-treated rats is the result of a deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology*, 110(2), 540-550. doi: 10.1210/endo-110-2-540
- Mohan, C., Viswanatha, G., Savinay, G., Rajendra, C., & Halemani, P. D. (2013). 1, 2, 3, 4, 6 Penta-O-galloyl- β -D-glucose, a bioactivity guided isolated compound from *Mangifera indica* inhibits 11 β -HSD-1 and ameliorates high fat diet-induced diabetes in C57BL/6 mice. *Phytomedicine*, 20(5), 417-426.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719-721.
- Oyadomari, S., Harding, H. P., Zhang, Y., Oyadomari, M., & Ron, D. (2008). Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell metabolism*, 7(6), 520-532.
- Park, C. H., Kim, M. Y., Sok, D. E., Kim, J. H., Lee, J. H., & Kim, M. R. (2010). Butterbur (*Petasites japonicus* Max.) extract improves lipid profiles and antioxidant activities in monosodium L-glutamate-challenged mice. *J Med Food*, 13(5), 1216-1223. doi: 10.1089/jmf.2009.1380
- Pettinelli, P., & Videla, L. A. (2011). Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(5), 1424-1430. doi: 10.1210/jc.2010-2129
- Pinto, B. A., Melo, T. M., Flister, K. F., Franca, L. M., Kajihara, D., Tanaka, L. Y., . . . Paes, A. M. (2016). Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. *Metab Brain Dis*, 31(4), 917-927. doi: 10.1007/s11011-016-9830-1
- Postic, C., & Girard, J. (2008). The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*, 34(6 Pt 2), 643-648. doi: 10.1016/S1262-3636(08)74599-3
- Pueyo, I. U., & Calvo, M. I. (2009). Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. *Fitoterapia*, 80(8), 465-467. doi: 10.1016/j.fitote.2009.06.008
- Ravi, K., Rajasekaran, S., & Subramanian, S. (2005). Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43(9), 1433-1439.
- Reccia, I., Kumar, J., Akladios, C., Viridis, F., Pai, M., Habib, N., & Spalding, D. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism*, 72, 94-108. doi: 10.1016/j.metabol.2017.04.011
- Rodriguez, J., Gilson, H., Jamart, C., Naslain, D., Pierre, N., Deldicque, L., & Francaux, M. (2015). Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *Eur J Nutr*, 54(3), 377-389. doi: 10.1007/s00394-014-0717-9
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 519-529.
- Salomone, F., Godos, J., & Zelber-Sagi, S. (2016). Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int*, 36(1), 5-20. doi: 10.1111/liv.12975

- Salvado, L., Palomer, X., Barroso, E., & Vazquez-Carrera, M. (2015). Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 26(8), 438-448. doi: 10.1016/j.tem.2015.05.007
- Sanches, J. R., Franca, L. M., Chagas, V. T., Gaspar, R. S., Dos Santos, K. A., Goncalves, L. M., Paes, A. M. (2016). Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Front Pharmacol*, 7, 48. doi: 10.3389/fphar.2016.00048
- Schoenfelder, T., Warmlin, C. Z., Manfredini, M. S., Pavei, L. L., Réus, J. V., Tristão, T. C., . . . Costa-Campos, L. (2010). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 222-227.
- Scomparin, D. X., Gomes, R. M., Grassioli, S., Rinaldi, W., Martins, A. G., de Oliveira, J. C., . . . de Freitas Mathias, P. C. (2009). Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine*, 36(3), 510-517. doi: 10.1007/s12020-009-9263-2
- Seiva, F. R., Chuffa, L. G., Braga, C. P., Amorim, J. P., & Fernandes, A. A. (2012). Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol*, 50(10), 3556-3561. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.009
- Sharafeldin, K., & Rizvi, M. R. (2015). Effect of traditional plant medicines (*Cinnamomum zeylanicum* and *Syzygium cumini*) on oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 126-134.
- Sidana, S., Singh, V. B., Meena, B. L., Beniwal, S., Chandra, S., Singh, K., . . . Kumar, D. (2016). Effect of *Syzygium cumini* (jamun) seed powder on dyslipidemia: a double blind randomized control trial. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(7), 2603-2610.
- Simental-Mendia, L. E., Rodriguez-Moran, M., & Guerrero-Romero, F. (2008). The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord*, 6(4), 299-304. doi: 10.1089/met.2008.0034
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, C. A., Maza, O., . . . Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), 181-186. doi: 10.1038/nature13793
- Sundaram, M., & Yao, Z. (2010). Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab (Lond)*, 7, 35. doi: 10.1186/1743-7075-7-35
- Templeman, N. M., Skovso, S., Page, M. M., Lim, G. E., & Johnson, J. D. (2017). A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *J Endocrinol*, 232(3), R173-r183. doi: 10.1530/joe-16-0449
- Thorp, A. A., & Schlaich, M. P. (2015). Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *J Diabetes Res*, 2015, 341583. doi: 10.1155/2015/341583
- Trojan-Rodrigues, M., Alves, T. L., Soares, G. L., & Ritter, M. R. (2012). Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J Ethnopharmacol*, 139(1), 155-163. doi: 10.1016/j.jep.2011.10.034

- Vaughan, M. (1962). The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J Biol Chem*, 237, 3354-3358.
- Wang, Q., Wang, S. T., Yang, X., You, P. P., & Zhang, W. (2015). Myricetin suppresses differentiation of 3 T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes. *Nutr Res*, 35(4), 317-327. doi: 10.1016/j.nutres.2014.12.009
- Wu, F. L., Liu, W. Y., Van Poucke, S., Braddock, M., Jin, W. M., Xiao, J., . . . Zheng, M. H. (2016). Targeting endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(9), 1041-1052. doi: 10.1080/17474124.2016.1179575
- Wu, J., Xu, X., Li, Y., Kou, J., Huang, F., Liu, B., & Liu, K. (2014). Quercetin, luteolin and epigallocatechin gallate alleviate TXNIP and NLRP3-mediated inflammation and apoptosis with regulation of AMPK in endothelial cells. *European journal of pharmacology*, 745, 59-68.
- Xia, S. F., Le, G. W., Wang, P., Qiu, Y. Y., Jiang, Y. Y., & Tang, X. (2016). Regressive Effect of Myricetin on Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 8(12). doi: 10.3390/nu8120799
- Xiao, G., Zhang, T., Yu, S., Lee, S., Calabuig-Navarro, V., Yamauchi, J., . . . Dong, H. H. (2013). ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25350-25361.
- Yoon, H., & Cha, B. S. (2014). Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 6(11), 800-811.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84. doi: 10.1002/hep.28431
- Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X., & Li, Y.-M. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20(7), 1768-1776.
- Zhu, X., & Jia, Y. H. (2014). Inhibition of catechol-o-methyltransferase (COMT) by myricetin, dihydromyricetin, and myricitrin. *Pharmazie*, 69(3), 183-186.

5 Considerações finais

O foco principal desta tese foi avaliar os efeitos biológicos e moleculares do tratamento com o EHSc sobre o metabolismo lipídico hepático de animais obesos-MSG, uma vez que a DHGNA é uma das principais consequências do acúmulo de tecido adiposo branco (TAB) e contribui de forma decisiva para o desenvolvimento das doenças responsáveis pela morbimortalidade associada a obesidade, como o diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e aterosclerose.

Com os dados obtidos no primeiro capítulo, verificamos que o tratamento de ratos obesos-MSG com o EHSc por 8 semanas nas doses 0,5 e 1,0 g/kg foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura e reverter a DHGNA, que foi acompanhado de em efeito anti-hipertrigliceridêmico tanto pelo menor conteúdo de triacilgliceróis (TAG) como pela menor exportação das *very-low density lipoprotein* (VLDL). Efeito que pode ser explicado pela *downregulation*, promovida pelo EHSc, da via XBP-1s/PDI/MTP, a qual é responsável pela montagem e exportação dos TAG hepáticos. Como esses resultados do EHSc sobre vias do metabolismo lipídico e estresse do retículo endoplasmático (RE) hepático, realizou-se o segundo estudo desta tese, no qual essas vias foram avaliadas de forma mais ampla após o tratamento com a menor dose do EHSc em camundongos obesos-MSG.

Nesse segundo capítulo, os animais obesos tratados com EHSc apresentaram associado a redução do acúmulo do TAB, uma melhor atividade do mesmo e aumento da sensibilidade insulínica periférica. Assim como anteriormente, o tratamento reduziu o acúmulo de TAG hepático, que agora é explicado pelas reduções das expressões gênicas no fígado de fatores de transcrição lipogênicos (PPAR- γ e SREBP-1c) e, conseqüentemente, enzimas envolvidas na síntese *de novo* (FAS) e direta (DGAT2) de TAG. Efeitos que podem ter como origem a *downregulation* hepática da PERK observada após o tratamento, uma vez que é um dos principais sensores do estresse do RE envolvido com a lipogênese.

Além desses efeitos do EHSc sobre animais obesos, surgiu a oportunidade de realizar um estágio de doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América para avaliar o efeito desse extrato em um modelo de ratos não-obesos espontaneamente DM2, o Goto-Kakizaki (GK), para verificar as ações do EHSc sobre a DHGNA sem a interferência da obesidade. Este estudo teve a supervisão da profa. Dra. Maria Alicia Carrillo-Sepulveda e foi realizado no campus de Old Westbury (NY) do College of Osteopathic Medicine do New York Institute of Technology

(NYITCOM). O estágio foi apoiado através de bolsa de estudo do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Nesse estudo, destacamos que o tratamento (0,5 g/kg/dia, via oral) dos animais GK por 8 semanas reduziu não só o acúmulo de gordura no fígado, mas também a inflamação hepática desses animais. Essa melhora da esteato-hepatite pôde ser explicada pela redução das expressões proteicas da MyD88 e NFκB no fígado dos GK tratados com o EHSc. Além disso, esse tratamento melhorou a disfunção vascular presente nesses animais diabéticos com diminuição da pressão arterial, maior relaxamento das aortas isoladas e redução da espessura da íntima-média dessa artéria. Efeitos que foram corroborados pelas elevações das expressões proteicas da *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) e da *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) nesse vaso após o tratamento. Esses e outros dados estão em processo de organização e escrita para posterior publicação sob a supervisão da Dra. Sepulveda.

Portanto, com os dados obtidos nesta tese (**Figura 1**), primeiramente, fica evidente a efetividade do tratamento com o EHSc na redução e melhora da atividade do TAB de animais obesos-MSG, devendo-se avaliar no futuro essa ação de forma mais pormenorizada. No entanto, o foco principal desse trabalho foi sobre o efeito do EHSc sobre o metabolismo lipídico hepático daqueles animais. Com essa abordagem, foi constatado que o tratamento, por no mínimo 4 semanas, com esse extrato é capaz de reverter a hipertrigliceridemia e a DHGNA presente nesse modelo de obesidade através de inibições de vias de exportação e síntese de TAG no fígado, respectivamente. Efeitos que podem ser decorrentes de uma *downregulation* do estresse do RE promovida pelo EHSc nesse órgão. Ademias, dados preliminares em ratos diabéticos ratificam esses efeitos hepáticos promovidos pelo extrato, além de demonstrar uma ação protetora sobre a disfunção vascular desses animais. Desse modo, este trabalho se destaca por confirmar os efeitos do EHSc sobre desordens do metabolismo lipídico hepático e, principalmente, elucidar por quais mecanismos ele possa estar atuando, contribuindo, assim, para a maior validação da eficácia dessa espécie vegetal tão utilizada no mundo para o tratamento de distúrbios do metabolismo energético.

Referências

- ADLER, M.; SCHAFFNER, F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. **The American journal of medicine**, v. 67, n. 5, p. 811-816, 1979. ISSN 0002-9343.
- ANANDHARAJAN, R.; JAIGANESH, S.; SHANKERNARAYANAN, N.; VISWAKARMA, R.; BALAKRISHNAN, A. In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPAR γ in L6 myotubes. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 434-441, 2006. ISSN 0944-7113.
- AQIL, F.; GUPTA, A.; MUNAGALA, R.; JEYABALAN, J.; KAUSAR, H.; SHARMA, R. J.; SINGH, I. P.; GUPTA, R. C. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L.(Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 3, p. 428-438, 2012. ISSN 0163-5581.
- ARGO, C. K.; PATRIE, J. T.; LACKNER, C.; HENRY, T. D.; DE LANGE, E. E.; WELTMAN, A. L.; SHAH, N. L.; AL-OSAIMI, A. M.; PRAMOONJAGO, P.; JAYAKUMAR, S.; BINDER, L. P.; SIMMONS-EGOLF, W. D.; BURKS, S. G.; BAO, Y.; TAYLOR, A. G.; RODRIGUEZ, J.; CALDWELL, S. H. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **J Hepatol**, v. 62, n. 1, p. 190-7, Jan 2015. ISSN 0168-8278.
- ARMSTRONG, M. J.; GAUNT, P.; AITHAL, G. P.; BARTON, D.; HULL, D.; PARKER, R.; HAZLEHURST, J. M.; GUO, K.; ABOUDA, G.; ALDERSLEY, M. A.; STOCKEN, D.; GOUGH, S. C.; TOMLINSON, J. W.; BROWN, R. M.; HUBSCHER, S. G.; NEWSOME, P. N. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. **Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 679-90, Feb 13 2016. ISSN 0140-6736.
- ARRUDA, A. P.; HOTAMISLIGIL, G. S. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. **Cell metabolism**, v. 22, n. 3, p. 381-397, 2015. ISSN 1550-4131.
- ARUN, R.; PRAKASH, M. V. D.; ABRAHAM, S. K.; PREMKUMAR, K. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 329-333, 2011. ISSN 0378-8741.
- ASHRAF, N.; SHEIKH, T. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Free radical research**, v. 49, n. 12, p. 1405-1418, 2015. ISSN 1071-5762.
- ASHWELL, M.; GUNN, P.; GIBSON, S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews**, v. 13, n. 3, p. 275-286, 2012. ISSN 1467-789X.
- ASHWELL, M.; HSIEH, S. D. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international

public health message on obesity. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 56, n. 5, p. 303-307, 2005. ISSN 0963-7486.

ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S395-S399, 2009. ISSN 0022-2275.

BAICEANU, A.; MESDOM, P.; LAGOUGE, M.; FOUFELLE, F. Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. **Nature Reviews Endocrinology**, 2016. ISSN 1759-5029.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam.(black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011. ISSN 0963-9969.

BAQAI, N.; WILDING, J. P. Pathophysiology and aetiology of obesity. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 73-76, 2015. ISSN 1357-3039.

BARDY, G.; VIRSOLVY, A.; QUIGNARD, J.; RAVIER, M.; BERTRAND, G.; DALLE, S.; CROS, G.; MAGOUS, R.; RICHARD, S.; OIRY, C. Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 5, p. 1102-1113, 2013. ISSN 1476-5381.

BECHMANN, L. P.; HANNIVOORT, R. A.; GERKEN, G.; HOTAMISLIGIL, G. S.; TRAUNER, M.; CANBAY, A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, 2012. ISSN 0168-8278.

BEN-SHLOMO, S.; ZVIBEL, I.; SHNELL, M.; SHLOMAI, A.; CHEPURKO, E.; HALPERN, Z.; BARZILAI, N.; OREN, R.; FISHMAN, S. Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1214-23, Jun 2011. ISSN 0168-8278.

BHANDARY, M.; CHANDRASHEKAR, K.; KAVERIAPPA, K. Medical ethnobotany of the siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n. 3, p. 149-158, 1995. ISSN 0378-8741.

BJÖRKHEM, I.; LUND, E.; RUDLING, M. Coordinate Regulation of Cholesterol 7 α -Hydroxylase and HMG-CoA. **Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine**, v. 28, p. 23, 2013. ISSN 1461559014.

BOBROVNIKOVA-MARJON, E.; HATZIVASSILIOU, G.; GRIGORIADOU, C.; ROMERO, M.; CAVENER, D. R.; THOMPSON, C. B.; DIEHL, J. A. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 42, p. 16314-16319, 2008. ISSN 0027-8424.

BODEN, G.; SONG, W.; DUAN, X.; CHEUNG, P.; KRESGE, K.; BARRERO, C.; MERALI, S. Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. **Obesity**, v. 19, n. 7, p. 1366-1373, 2011. ISSN 1930-739X.

BOK, S.-H.; PARK, S.-Y.; PARK, Y. B.; LEE, M.-K.; JEON, S.-M.; JEONG, T.-S.; CHOI, M.-S. Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats. **International journal for vitamin and nutrition research**, v. 72, n. 3, p. 161-169, 2002. ISSN 0300-9831.

BRABOZA DA SILVA, N.; DEL FINO, A.; ESQUIBEL, M.; SANTOS, J.; DE ALMEIDA, M. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II–Bahia, Brasil. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**, v. 11, n. 5, p. 435-453, 2012. ISSN 0717-7917.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016** Brasil: Ministério da Saúde, 2017. ISBN 978-85-334-2479-1. Disponível em: <
http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf >.

BRASIL, R. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **portal. saúde. gov. br/portal/arquivos/pdf/RENISUS. pdf**. Accessed in: 07/24/2016, 2009.

BRAY, G. A. Obesity: the disease. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 14, p. 4001-4007, 2006. ISSN 0022-2623.

BROWN, M. K.; NAIDOO, N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. **Topic Editors Vladimir I. Titorenko and Troy AA Harkness**, p. 71, 2007.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 1, p. S47-S64, 2015. ISSN 0168-8278.

CERCATO, L. M.; WHITE, P. A.; NAMPO, F. K.; SANTOS, M. R.; CAMARGO, E. A. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **Journal of ethnopharmacology**, v. 176, p. 286-296, 2015. ISSN 0378-8741.

CHAGAS, V. T.; FRANÇA, L. M.; MALIK, S.; DE ANDRADE PAES, A. M. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.

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 Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1592-609, Jun 2012. ISSN 0016-5085.

CHANG, C. J.; TZENG, T.-F.; LIOU, S.-S.; CHANG, Y.-S.; LIU, I.-M. Myricetin increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α protein expression and decreases plasma lipids and adiposity in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. ISSN 1741-427X.

CHOI, S. H.; GINSBERG, H. N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 353-363, 2011. ISSN 1043-2760.

CNOP, M.; FOUFELLE, F.; VELLOSO, L. A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 1, p. 59-68, 2012. ISSN 1471-4914.

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. ISSN 0036-8075.

CULLINAN, S. B.; DIEHL, J. A. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20108-20117, 2004. ISSN 0021-9258.

CURTIS, A. J.; BULLEN, M.; PICCENNA, L.; MCNEIL, J. J. Vitamin E supplementation and mortality in healthy people: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 28, n. 6, p. 563-73, Dec 2014. ISSN 0920-3206.

DANAEI, G.; DING, E. L.; MOZAFFARIAN, D.; TAYLOR, B.; REHM, J.; MURRAY, C. J.; EZZATI, M. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. **PLoS Med**, v. 6, n. 4, p. e1000058, 2009. ISSN 1549-1676.

DASARATHY, S.; DASARATHY, J.; KHIYAMI, A.; YERIAN, L.; HAWKINS, C.; SARGENT, R.; MCCULLOUGH, A. J. Double-blind randomized placebo-controlled clinical trial of omega 3 fatty acids for the treatment of diabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 49, n. 2, p. 137-44, Feb 2015. ISSN 0192-0790.

DESAI, M.; JELLYMAN, J.; ROSS, M. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International journal of obesity**, v. 39, n. 4, p. 633-641, 2015. ISSN 0307-0565.

DI CESARE, M.; BENTHAM, J.; STEVENS, G. A.; BJERTNESS, E.; BJERTNESS, M. B.; EKELUND, U.; GRAFF-IVERSEN, S.; KOLLE, E.; KROKSTAD, S.; STEENE-JOHANNESSEN, J. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, Apr 2 2016. ISSN 0140-6736.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007. ISSN 0378-8741.

DIETRICH, P.; HELLERBRAND, C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 637-653, 2014. ISSN 1521-6918.

DING, X.; SAXENA, N. K.; LIN, S.; GUPTA, N. A.; ANANIA, F. A. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. **Hepatology**, v. 43, n. 1, p. 173-81, Jan 2006. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139.

DONNELLY, N.; GORMAN, A. M.; GUPTA, S.; SAMALI, A. The eIF2 α kinases: their structures and functions. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 19, p. 3493-3511, 2013. ISSN 1420-682X.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current drug targets**, v. 12, n. 1, p. 122-132, 2011. ISSN 1389-4501.

ELLRICHMANN, M.; VOLLMER, K.; SCHRADER, H.; BANASCH, M.; SCHMIDT, W. E.; MEIER, J. J. Sustained virological response during exenatide treatment in a patient with hepatitis C and nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 104, n. 12, p. 3112-4, Dec 2009. ISSN 0002-9270.

ESHWARAPPA, R. S. B.; IYER, R. S.; SUBBARAMAIAH, S. R.; RICHARD, S. A.; DHANANJAYA, B. L. Antioxidant activity of Syzygium cumini leaf gall extracts. **BioImpacts: BI**, v. 4, n. 2, p. 101, 2014.

ESMAEILI, M. A.; ZOHARI, F.; SADEGHI, H. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from Teucrium polium on β -cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. **Planta medica**, v. 75, n. 13, p. 1418-1420, 2009. ISSN 0032-0943.

EVANS, M. J.; MAHANEY, P. E.; BORGES-MARCUCCI, L.; LAI, K.; WANG, S.; KRUEGER, J. A.; GARDELL, S. J.; HUARD, C.; MARTINEZ, R.; VLASUK, G. P.; HARNISH, D. C. A synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist promotes cholesterol lowering in models of dyslipidemia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 296, n. 3, p. G543-52, Mar 2009. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857.

FAWCETT, K. A.; BARROSO, I. The genetics of obesity: FTO leads the way. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 6, p. 266-274, 2010. ISSN 0168-9525.

FERRE, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. s2, p. 83-92, 2010. ISSN 1463-1326.

FRANÇA, L. M.; FREITAS, L. N. C.; CHAGAS, V. T.; COELHO, C. F. F.; BARROSO, W. A.; COSTA, G. C.; SILVA, L. A.; DEBBAS, V.; LAURINDO, F. R. M.; DE ANDRADE PAES, A. M. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 443, n. 2, p. 725-730, 2014. ISSN 0006-291X.

FU, S.; YANG, L.; LI, P.; HOFMANN, O.; DICKER, L.; HIDE, W.; LIN, X.; WATKINS, S. M.; IVANOV, A. R.; HOTAMISLIGIL, G. S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium

homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 528-531, 2011. ISSN 0028-0836.

GREGOR, M. F.; YANG, L.; FABBRINI, E.; MOHAMMED, B. S.; EAGON, J. C.; HOTAMISLIGIL, G. S.; KLEIN, S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 693-700, 2009. ISSN 0012-1797.

GRIMSGAARD, S.; BONAA, K. H.; HANSEN, J. B.; NORDOY, A. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 3, p. 649-59, Sep 1997. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165.

GUPTA, N. A.; MELLS, J.; DUNHAM, R. M.; GRAKOU, A.; HANDY, J.; SAXENA, N. K.; ANANIA, F. A. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1584-92, May 2010. ISSN 0270-9139.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. Metabolic syndrome. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 80-87, 2015. ISSN 1357-3039.

HARDING, H. P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SCHAPIRA, M.; RON, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular cell**, v. 6, n. 5, p. 1099-1108, 2000. ISSN 1097-2765.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; SCHEUNER, D.; CHEN, J.-J.; KAUFMAN, R. J.; RON, D. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α) dephosphorylation in mammalian development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1832-1837, 2009. ISSN 0027-8424.

HEGARTY, B. D.; BOBARD, A.; HAINAULT, I.; FERRÉ, P.; BOSSARD, P.; FOUFELLE, F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, p. 791-796, 2005. ISSN 0027-8424.

HELMSTÄDTER, A. *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes—125 years of research. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 2, p. 91-101, 2008. ISSN 0031-7144.

HENRIKSEN, E. J.; DIAMOND-STANIC, M. K.; MARCHIONNE, E. M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 993-999, 2011. ISSN 0891-5849.

HERRANZ-LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; PÉREZ-SANCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; MENÉNDEZ, J. A.; ALONSO-VILLASVERDE, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; JOVEN, J.; MICOL, V. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3, p. 253-261, 2012. ISSN 0944-7113.

HERREMA, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; LEE, J.; HERNANDEZ, M. A. S.; SHULMAN, G. I.; OZCAN, U. XBP1s Is an Anti-lipogenic Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 33, p. 17394-17404, 2016. ISSN 0021-9258.

HETZ, C.; CHEVET, E.; OAKES, S. A. Proteostasis control by the unfolded protein response. **Nature cell biology**, v. 17, n. 7, p. 829-838, 2015. ISSN 1465-7392.

HOLLIS, J. H. Beverages, Satiation, Satiety, and Energy Balance. In: (Ed.). **Beverage Impacts on Health and Nutrition**: Springer, 2016. p.181-192.

HYSLOP, P.; YORK, D.; CORINA, D. Changes in the composition and fluidity of membranes in obese (ob/ob) mice: a study of hepatic microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase activity. **International journal of obesity**, v. 6, n. 3, p. 279-289, 1981.

IMRIE, H.; ABBAS, A.; KEARNEY, M. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 320-326, 2010. ISSN 1388-1981.

JO, H.; CHOE, S. S.; SHIN, K. C.; JANG, H.; LEE, J. H.; SEONG, J. K.; BACK, S. H.; KIM, J. B. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1366-1377, 2013. ISSN 1527-3350.

KAMMOUN, H. L.; CHABANON, H.; HAINAULT, I.; LUQUET, S.; MAGNAN, C.; KOIKE, T.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress–induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 5, p. 1201-1215, 2009. ISSN 0021-9738.

KANNAN, M. M.; QUINE, S. D. Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats. **Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 52-61, 2013. ISSN 0026-0495.

KIM, H.-J.; KIM, J. H.; NOH, S.; HUR, H. J.; SUNG, M. J.; HWANG, J.-T.; PARK, J. H.; YANG, H. J.; KIM, M.-S.; KWON, D. Y. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 2, p. 722-731, 2010. ISSN 1535-3893.

KUNWAR, R. M.; UPRETY, Y.; BURLAKOTI, C.; CHOWDHARY, C.; BUSSMANN, R. W. Indigenous use and ethnopharmacology of medicinal plants in far-west Nepal. 2009. ISSN 1547-3465.

LAFONTAN, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. **Diabetes & metabolism**, v. 40, n. 1, p. 16-28, 2014. ISSN 1262-3636.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3281-3282, 2010. ISSN 0027-8424.

LAVINE, J. E.; SCHWIMMER, J. B.; VAN NATTA, M. L.; MOLLESTON, J. P.; MURRAY, K. F.; ROSENTHAL, P.; ABRAMS, S. H.; SCHEIMANN, A. O.; SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; TONASCIA, J.; UNALP, A.; CLARK, J. M.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H.; ROBUCK, P. R. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. **Jama**, v. 305, n. 16, p. 1659-68, Apr 27 2011. ISSN 0098-7484.

LEE, A.-H.; SCAPA, E. F.; COHEN, D. E.; GLIMCHER, L. H. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1492-1496, 2008. ISSN 0036-8075.

LEE, J.-S.; MENDEZ, R.; HENG, H. H.; YANG, Z.; ZHANG, K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. **Am J Transl Res**, v. 4, n. 1, p. 102-113, 2012.

LEE, J.; HONG, S. W.; CHAE, S. W.; KIM, D. H.; CHOI, J. H.; BAE, J. C.; PARK, S. E.; RHEE, E. J.; PARK, C. Y.; OH, K. W.; PARK, S. W.; KIM, S. W.; LEE, W. Y. Exendin-4 improves steatohepatitis by increasing Sirt1 expression in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31394, 2012. ISSN 1932-6203.

LEE, J. N.; YE, J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 45257-45265, 2004. ISSN 0021-9258.

LERNER, A. G.; UPTON, J.-P.; PRAVEEN, P.; GHOSH, R.; NAKAGAWA, Y.; IGBARIA, A.; SHEN, S.; NGUYEN, V.; BACKES, B. J.; HEIMAN, M. IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. **Cell metabolism**, v. 16, n. 2, p. 250-264, 2012. ISSN 1550-4131.

LI, T.; CHIANG, J. Y. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 4, p. 948-83, Oct 2014. ISSN 0031-6997.

LIM, T. Syzygium cumini. In: (Ed.). **Edible Medicinal And Non Medicinal Plants**: Springer, 2012. p.745-759.

LIPPMAN, S. M.; KLEIN, E. A.; GOODMAN, P. J.; LUCIA, M. S.; THOMPSON, I. M.; FORD, L. G.; PARNES, H. L.; MINASIAN, L. M.; GAZIANO, J. M.; HARTLINE, J. A.; PARSONS, J. K.; BEARDEN, J. D., 3RD; CRAWFORD, E. D.; GOODMAN, G. E.; CLAUDIO, J.; WINQUIST, E.; COOK, E. D.; KARP, D. D.; WALTHER, P.; LIEBER, M. M.; KRISTAL, A. R.; DARKE, A. K.; ARNOLD, K. B.; GANZ, P. A.; SANTELLA, R. M.; ALBANES, D.; TAYLOR, P. R.; PROBSTFIELD, J. L.; JAGPAL, T. J.; CROWLEY, J. J.; MEYSKENS, F. L., JR.; BAKER, L. H.; COLTMAN, C. A., JR. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **Jama**, v. 301, n. 1, p. 39-51, Jan 7 2009. ISSN 0098-7484.

LIU, I.-M.; TZENG, T.-F.; LIOU, S.-S.; LAN, T.-W. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. **Life sciences**, v. 81, n. 21, p. 1479-1488, 2007. ISSN 0024-3205.

LONARDO, A.; NASCIMBENI, F.; MANTOVANI, A.; TARGHER, G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? **J Hepatol**, v. 68, n. 2, p. 335-352, Feb 2018. ISSN 0168-8278.

MAHADY, S. E.; WEBSTER, A. C.; WALKER, S.; SANYAL, A.; GEORGE, J. The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - a systematic review and meta analysis. **J Hepatol**, v. 55, n. 6, p. 1383-90, Dec 2011. ISSN 0168-8278.

MALHI, H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. **Journal of hepatology**, v. 54, n. 4, p. 795-809, 2011. ISSN 0168-8278.

MAUREL, M.; CHEVET, E.; TAVERNIER, J.; GERLO, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. **Trends in biochemical sciences**, v. 39, n. 5, p. 245-254, 2014. ISSN 0968-0004.

MELLS, J. E.; FU, P. P.; SHARMA, S.; OLSON, D.; CHENG, L.; HANDY, J. A.; SAXENA, N. K.; SORESCU, D.; ANANIA, F. A. Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 2, p. G225-35, Jan 15 2012. ISSN 0193-1857.

MILLER, E. R., 3RD; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D.; RIEMERSMA, R. A.; APPEL, L. J.; GUALLAR, E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 1, p. 37-46, Jan 4 2005. ISSN 0003-4819.

MONTESI, L.; EL GHOSH, M.; BRODOSI, L.; CALUGI, S.; MARCHESINI, G.; DALLE GRAVE, R. Long-term weight loss maintenance for obesity: a multidisciplinary approach. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 9, p. 37-46, 2016. ISSN 1178-7007 (Print) 1178-7007.

MOORE, J. B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 02, p. 211-220, 2010. ISSN 1475-2719.

MUDALIAR, S.; HENRY, R. R.; SANYAL, A. J.; MORROW, L.; MARSCHALL, H. U.; KIPNES, M.; ADORINI, L.; SCIACCA, C. I.; CLOPTON, P.; CASTELLOE, E.; DILLON, P.; PRUZANSKI, M.; SHAPIRO, D. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 145, n. 3, p. 574-82.e1, Sep 2013. ISSN 0016-5085.

MUKHERJEE, K.; BISWAS, R.; CHAUDHARY, S. K.; MUKHERJEE, P. K. Botanicals as Medicinal Food and Their Effects against Obesity. 2015.

NAGHAVI, M.; WANG, H.; LOZANO, R.; DAVIS, A.; LIANG, X.; ZHOU, M. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific

all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117-71, 2015.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BRUNT, E. M.; WEHMEIER, K. R.; OLIVER, D.; BACON, B. R. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 1008-17, Oct 2003. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; LOOMBA, R.; SANYAL, A. J.; LAVINE, J. E.; VAN NATTA, M. L.; ABDELMALEK, M. F.; CHALASANI, N.; DASARATHY, S.; DIEHL, A. M.; HAMEED, B.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; TERRAULT, N.; CLARK, J. M.; TONASCIA, J.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; DOO, E. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 956-65, Mar 14 2015. ISSN 0140-6736.

NING, J.; HONG, T.; WARD, A.; PI, J.; LIU, Z.; LIU, H.-Y.; CAO, W. Constitutive role for IRE1 α -XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2247-2255, 2011. ISSN 0013-7227.

NISHITOH, H.; MATSUZAWA, A.; TOBIUME, K.; SAEGUSA, K.; TAKEDA, K.; INOUE, K.; HORI, S.; KAKIZUKA, A.; ICHIJO, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. **Genes & development**, v. 16, n. 11, p. 1345-1355, 2002. ISSN 0890-9369.

ORGANIZATION, W. H. **Obesity and overweight**. 2011 2011.

OYADOMARI, S.; HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; OYADOMARI, M.; RON, D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatoesteatosis in mice. **Cell metabolism**, v. 7, n. 6, p. 520-532, 2008. ISSN 1550-4131.

ÖZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A.-H.; IWAKOSHI, N. N.; ÖZDELEN, E.; TUNCMAN, G.; GÖRGÜN, C.; GLIMCHER, L. H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-461, 2004. ISSN 0036-8075.

PARKER, H. M.; JOHNSON, N. A.; BURDON, C. A.; COHN, J. S.; O'CONNOR, H. T.; GEORGE, J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 944-51, Apr 2012. ISSN 0168-8278.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012. ISSN 1759-5029.

PERRY, R. J.; PENG, L.; BARRY, N. A.; CLINE, G. W.; ZHANG, D.; CARDONE, R. L.; PETERSEN, K. F.; KIBBEY, R. G.; GOODMAN, A. L.; SHULMAN, G. I. Acetate mediates

a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 213-217, 2016. ISSN 0028-0836.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 1, p. 3-21, 2012. ISSN 0029-6643.

POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 6, p. 643-648, 2008. ISSN 1262-3636.

PRINCE, P.; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 20, n. 2, p. 96-102, 2006. ISSN 1099-0461.

PROMLEK, T.; ISHIWATA-KIMATA, Y.; SHIDO, M.; SAKURAMOTO, M.; KOHNO, K.; KIMATA, Y. Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 18, p. 3520-3532, 2011. ISSN 1059-1524.

PUNITHAVATHI, V.; STANELY MAINZEN PRINCE, P.; KUMAR, M.; SELVAKUMARI, C. Protective effects of gallic acid on hepatic lipid peroxide metabolism, glycoprotein components and lipids in streptozotocin-induced type II diabetic wistar rats. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 25, n. 2, p. 68-76, 2011. ISSN 1099-0461.

PURI, P.; MIRSHAHI, F.; CHEUNG, O.; NATARAJAN, R.; MAHER, J. W.; KELLUM, J. M.; SANYAL, A. J. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 568-576, 2008. ISSN 0016-5085.

RAMBJOR, G. S.; WALLEN, A. I.; WINDSOR, S. L.; HARRIS, W. S. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. **Lipids**, v. 31 Suppl, p. S45-9, Mar 1996. ISSN 0024-4201 (Print) 0024-4201.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of Eugenia jambolana seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 9, p. 1433-1439, 2005. ISSN 0278-6915.

REKHA, N.; BALAJI, R.; DEECARAMAN, M. Effect of aqueous extract of Syzygium cumini pulp on antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats. **Iranian journal of pharmacology & therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 137-145, 2008. ISSN 1735-2657.

RINELLA, M. E.; SANYAL, A. J. Management of NAFLD: a stage-based approach. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 4, p. 196-205, Apr 2016. ISSN 1759-5045.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 519-529, 2007. ISSN 1471-0072.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003. ISSN 0021-9258.

SANCHES, J. R.; FRANÇA, L. M.; CHAGAS, V. T.; GASPAR, R. S.; DOS SANTOS, K. A.; GONÇALVES, L. M.; SLOBODA, D. M.; HOLLOWAY, A. C.; DUTRA, R. P.; CARNEIRO, E. M. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, 2016.

SANYAL, A. J.; ABDELMALEK, M. F.; SUZUKI, A.; CUMMINGS, O. W.; CHOJKIER, M. No significant effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. **Gastroenterology**, v. 147, n. 2, p. 377-84.e1, Aug 2014. ISSN 0016-5085.

SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; DIEHL, A. M.; BASS, N. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; LAVINE, J. E.; TONASCIA, J.; UNALP, A.; VAN NATTA, M.; CLARK, J.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H.; ROBUCK, P. R. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 18, p. 1675-85, May 6 2010. ISSN 0028-4793.

SCHOENFELDER, T.; WARMLIN, C. Z.; MANFREDINI, M. S.; PAVEI, L. L.; RÉUS, J. V.; TRISTÃO, T. C.; FERNANDES, M. S.; COSTA-CAMPOS, L. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 222-227, 2010. ISSN 0102-695X.

SCHURKS, M.; GLYNN, R. J.; RIST, P. M.; TZOURIO, C.; KURTH, T. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials. **Bmj**, v. 341, p. c5702, Nov 4 2010. ISSN 0959-535x.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008. ISSN 0278-6915.

SHARMA, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chem**, v. 110, n. 3, p. 697-705, 2008. ISSN 0308-8146.

SHELNESS, G. S.; INGRAM, M. F.; HUANG, X. F.; DELOZIER, J. A. Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and the initiation of lipoprotein assembly. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 2, p. 456S-462S, 1999. ISSN 0022-3166.

SHULMAN, G. I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 12, p. 1131-1141, 2014. ISSN 0028-4793.

SIDANA, S.; SINGH, V. B.; MEENA, B. L.; BENIWAL, S.; CHANDRA, S.; SINGH, K.; SINGLA, R.; KUMAR, D. Effect of *Syzygium cumini* (jamun) seed powder on dyslipidemia:

a double blind randomized control trial. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 7, p. 2603-2610, 2016.

SOARES, J. C. M.; COSTA, S. T. D.; CECIM, M. Glucose and cholesterol plasma levels in rats with alloxan-induced Diabetes Mellitus treated with infusion of Bauhinia candicans or Syzygium Jambolanum. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 113-118, 2000. ISSN 0103-8478.

SOLEYMANI, T.; DANIEL, S.; GARVEY, W. T. Weight maintenance: challenges, tools and strategies for primary care physicians. **Obes Rev**, v. 17, n. 1, p. 81-93, Jan 2016. ISSN 1467-7881.

SPAHIS, S.; BORYS, J.-M.; LEVY, E. Metabolic syndrome as a multifaceted risk factor for oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2016. ISSN 1523-0864.

SRIBURI, R.; JACKOWSKI, S.; MORI, K.; BREWER, J. W. XBP1 a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. **The Journal of cell biology**, v. 167, n. 1, p. 35-41, 2004. ISSN 0021-9525.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of Syzygium cumini: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013. ISSN 1097-0010.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011. ISSN 1612-1880.

STENHOLM, S.; HARRIS, T. B.; RANTANEN, T.; VISSER, M.; KRITCHEVSKY, S. B.; FERRUCCI, L. Sarcopenic obesity-definition, etiology and consequences. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 11, n. 6, p. 693, 2008.

STRONG, A.; DING, Q.; EDMONDSON, A. C.; MILLAR, J. S.; SACHS, K. V.; LI, X.; KUMARAVEL, A.; WANG, M. Y.; AI, D.; GUO, L. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 8, p. 2807-2816, 2012. ISSN 0021-9738.

SU, X.; ABUMRAD, N. A. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 72-77, 2009. ISSN 1043-2760.

TASKINEN, M.-R.; BORÉN, J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 2, p. 483-495, 2015. ISSN 0021-9150.

THOMAS, C.; PELLICCIARI, R.; PRUZANSKI, M.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 8, p. 678-93, Aug 2008. ISSN 1474-1776.

TIRASOPHON, W.; LEE, K.; CALLAGHAN, B.; WELIHINDA, A.; KAUFMAN, R. J. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the

unfolded protein response. **Genes & Development**, v. 14, n. 21, p. 2725-2736, 2000. ISSN 0890-9369.

TREVASKIS, J. L.; GRIFFIN, P. S.; WITTMER, C.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BRUNT, E. M.; DOLMAN, C. S.; ERICKSON, M. R.; NAPORA, J.; PARKES, D. G.; ROTH, J. D. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 8, p. G762-72, Apr 15 2012. ISSN 0193-1857.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, R.; PATEL, R. K.; PANCHOLI, S. S. Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. **Drug and chemical toxicology**, v. 36, n. 1, p. 35-41, 2013. ISSN 0148-0545.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.; SOARES, G.; RITTER, M. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012. ISSN 0378-8741.

TUSHUIZEN, M. E.; BUNCK, M. C.; POUWELS, P. J.; VAN WAESBERGHE, J. H.; DIAMANT, M.; HEINE, R. J. Incretin mimetics as a novel therapeutic option for hepatic steatosis. **Liver Int**, v. 26, n. 8, p. 1015-7, Oct 2006. ISSN 1478-3223 (Print) 1478-3223.

UPTON, J.-P.; WANG, L.; HAN, D.; WANG, E. S.; HUSKEY, N. E.; LIM, L.; TRUITT, M.; MCMANUS, M. T.; RUGGERO, D.; GOGA, A. IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 818-822, 2012. ISSN 0036-8075.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H. P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 664-666, 2000. ISSN 0036-8075.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008. ISSN 1471-0072.

VAN WAGNER, L. B.; KOPPE, S. W.; BRUNT, E. M.; GOTTSTEIN, J.; GARDIKIOTES, K.; GREEN, R. M.; RINELLA, M. E. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 3, p. 277-86, Jul-Sep 2011. ISSN 1665-2681 (Print) 1665-2681.

VOLMER, R.; VAN DER PLOEG, K.; RON, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. 4628-4633, 2013. ISSN 0027-8424.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943-951, 2006. ISSN 0013-7227.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 326-335, 2016. ISSN 0028-0836.

WANG, S.; CHEN, Z.; LAM, V.; HAN, J.; HASSLER, J.; FINCK, B. N.; DAVIDSON, N. O.; KAUFMAN, R. J. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. **Cell metabolism**, v. 16, n. 4, p. 473-486, 2012. ISSN 1550-4131.

WANG, Y.; VISCARRA, J.; KIM, S.-J.; SUL, H. S. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 11, p. 678-689, 2015. ISSN 1471-0072.

WEIN, S.; BEHM, N.; PETERSEN, R. K.; KRISTIANSEN, K.; WOLFFRAM, S. Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- γ independent mechanism. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 16-22, 2010. ISSN 0928-0987.

WELLS, J. C. The evolution of human adiposity and obesity: where did it all go wrong? **Disease Models and Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 595-607, 2012. ISSN 1754-8403.

WHO, W. H. O. Obesity and overweight. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

XIAO, G.; ZHANG, T.; YU, S.; LEE, S.; CALABUIG-NAVARRO, V.; YAMAUCHI, J.; RINGQUIST, S.; DONG, H. H. ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 35, p. 25350-25361, 2013. ISSN 0021-9258.

XU, X.; SO, J.-S.; PARK, J.-G.; LEE, A.-H. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Seminars in liver disease*, 2013, Thieme Medical Publishers. p.301-311.

YE, J.; RAWSON, R. B.; KOMURO, R.; CHEN, X.; DAVÉ, U. P.; PRYWES, R.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. **Molecular cell**, v. 6, n. 6, p. 1355-1364, 2000. ISSN 1097-2765.

YE, Y.; LI, J.; YUAN, Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56803, 2013. ISSN 1932-6203.

YOSHIDA, H.; MATSUI, T.; YAMAMOTO, A.; OKADA, T.; MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 881-891, 2001. ISSN 0092-8674.

ZEIN, C. O.; YERIAN, L. M.; GOGATE, P.; LOPEZ, R.; KIRWAN, J. P.; FELDSTEIN, A. E.; MCCULLOUGH, A. J. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. **Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 1610-9, Nov 2011. ISSN 0270-9139.

ANEXO A



***Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases**

Vinicyus Teles Chagas^{1,2}, Lucas Martins França^{1,2}, Sonia Malik² and Antonio Marcus de Andrade Paes^{1,2*}

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ² Graduate Program in Health Sciences, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Akio Inui,
Kagoshima University, Japan

Reviewed by:

Subhalakshmi Ghosh,
Jadavpur University, India
Marie Amitani,
Kagoshima University, Japan
Masahiro Ohsawa,
Nagoya City University, Japan

*Correspondence:

Antonio Marcus de A. Paes
marcuspaes@ufma.br

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 10 August 2015

Accepted: 20 October 2015

Published: 03 November 2015

Citation:

Chagas VT, França LM, Malik S and Paes AMA (2015) *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Front. Pharmacol.* 6:259. doi: 10.3389/fphar.2015.00259

Syzygium cumini (Myrtaceae) is a worldwide medicinal plant traditionally used in herbal medicines due to its vaunted properties against cardiometabolic disorders, which include: antihyperglycemic, hypolipemiant, antiinflammatory, cardioprotective, and antioxidant activities. These properties have been attributed to the presence of bioactive compounds such as phenols, flavonoids, and tannins in different parts of the plant, albeit the knowledge on their mechanisms of action is scarce. This mini-review highlights the cardiometabolic properties of *S. cumini* by correlating its already identified phytochemicals with their described mechanisms of action. Data herein compiled show that some compounds target multiple metabolic pathways; thereby, becoming potential pharmacological tools. Moreover, the lack of clinical trials on *S. cumini* usage makes it a fruitful field of interest for both scientific community and pharmaceutical industry.

Keywords: black plum, jamun, myrtaceae, phenolic compounds, metabolic syndrome, ethnopharmacology, medicinal plants, complementary and alternative medicine

INTRODUCTION

Cardiometabolic syndrome is associated with multiple risk factors including insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, and obesity (Alberti et al., 2009). According to World Health Organization, every year about 2.8 million people die worldwide due to overweight or obesity (Lim et al., 2012). Prevalence of diabetes appears with projections to affect about 439 million adults by 2030, whereas cardiovascular diseases account for 30% of deaths annually, including both developed and developing countries (Shaw et al., 2010). Because of their chronic degenerative nature, cardiometabolic-related disorders have long-lasting treatments, costly for both the patient and the health services, in addition to potentially harmful side effects caused by polytherapeutic regimens (Yanovski and Yanovski, 2014). In this context, herbal medicines have become the major source of bioactive molecules and emerged as potential therapeutic tools to fulfill a multiple-target strategy, especially because of their inherent large-scale structural diversity as compared with synthetic compounds (Prabhakar and Doble, 2008; Vasudeva et al., 2012).

Myrtaceae family comprises about 121 genera with 3800–5800 species of shrubs and trees distributed mainly in tropical and subtropical areas of the world (Stefanello et al., 2011). The genus *Syzygium*, a leading member of this family, embrace 1100 species with deserving attention to *Syzygium cumini* (L.) Skeels (syn.: *Eugenia jambolana*, *Syzygium jambolanum*), which has been

ANEXO B



Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats

OPEN ACCESS

Edited by:

Adolfo Andrade-Cetto,
Universidad Nacional Autónoma
de México, Mexico

Reviewed by:

Marcia Hirani,
Universidad Nacional Autónoma
de México, Mexico
Xiao Yu Tian,
The Chinese University of Hong Kong,
China

Alex Rafacho,
Federal University of Santa Catarina,
Brazil

*Correspondence:

Antonio Marcus de A. Paes
marcuspaes@ufma.br

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 10 October 2015

Accepted: 22 February 2016

Published: 10 March 2016

Citation:

Sanches JR, França LM, Chagas VT,
Gaspar RS, dos Santos KA,
Gonçalves LM, Sloboda DM,
Holloway AC, Dutra RP, Carneiro EM,
Cappelli AP and Paes AM (2016)
Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves
Peripheral Insulin Sensitivity
and Pancreatic Islet Function
in Monosodium L-Glutamate-Induced
Obese Rats. *Front. Pharmacol.* 7:48.
doi: 10.3389/fphar.2016.00048

Jonas R. Sanches¹, Lucas M. França¹, Vinicyus T. Chagas¹, Renato S. Gaspar¹,
Kayque A. dos Santos¹, Luciana M. Gonçalves², Deborah M. Sloboda³,
Alison C. Holloway⁴, Richard P. Dutra⁵, Everardo M. Carneiro², Ana Paula G. Cappelli¹
and Antonio Marcus de A. Paes^{1*}

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ² Laboratory of Endocrine Pancreas and Metabolism, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, Brazil, ³ Departments of Biochemistry, Pediatrics and Obstetrics and Gynecology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, ⁴ Department of Obstetrics and Gynecology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, ⁵ Social, Health and Technological Sciences Center, Federal University of Maranhão, Imperatriz, Brazil

Syzygium cumini (L.) Skeels (Myrtaceae) has been traditionally used to treat a number of illnesses. Ethnopharmacological studies have particularly addressed antidiabetic and metabolic-related effects of extracts prepared from its different parts, especially seed, and pulp-fruit, however, there is a lack of studies on phytochemical profile and biological properties of its leaf. As there is considerable interest in bioactive compounds to treat metabolic syndrome and its clustered risk factors, we sought to characterize the metabolic effects of hydroethanolic extract of *S. cumini* leaf (HESc) on lean and monosodium L-glutamate (MSG)-induced obese rats. HPLC-MS/MS characterization of the HESc polyphenolic profile, at 254 nm, identified 15 compounds pertaining to hydrolysable tannin and flavanol subclasses. At 60 days of age, both groups were randomly assigned to receive HESc (500 mg/kg) or vehicle for 30 days. At the end of treatment, obese+HESc exhibited significantly lower body weight gain, body mass index, and white adipose tissue mass, compared to obese rats receiving vehicle. Obese rats treated with HESc showed a twofold increase in lipolytic activity in the periepididymal fat pad, as well as, brought triglyceride levels in serum, liver and skeletal muscle back to levels close those found in lean animals. Furthermore, HESc also improved hyperinsulinemia and insulin resistance in obese+HESc rats, which resulted in partial reversal of glucose intolerance, as compared to obese rats. HESc had no effect in lean rats. Assessment of *ex vivo* glucose-stimulated insulin secretion showed HESc potentiated pancreatic function in islets isolated from both lean and obese rats treated with HESc. In addition, HESc (10–1000 μ g/mL) increased glucose stimulated insulin

ANEXO C

AUTHOR COPY ONLY

Research

R. S. GASPAR and others

Reproductive alterations
in MSG obese rats

229:2

61–72

Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats

Renato Simões Gaspar¹, Renata Ohana Alves Benevides¹,
João Lucas de Lima Fontelles¹, Caroline Castro Vale¹, Lucas Martins França¹,
Paulo de Tarso Silva Barros^{1,2} and Antonio Marcus de Andrade Paes¹

¹Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

²Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Correspondence
should be addressed
to A M de A Paes
Email
marcuspaes@ufma.br

Abstract

Obesity and metabolic syndrome are the common causes of reproductive and fertility disorders in women. In particular, polycystic ovary syndrome, which is clinically characterized by hyperandrogenism, oligo/anovulation, and polycystic ovarian morphology, has been increasingly associated with metabolic disorders. However, given the broad interplay between metabolic and reproductive functions, this remains a field of intense research. In this study, we investigated the effect of monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity on reproductive biology of female rats. Newborn female rats were subcutaneously injected with MSG (4 g/kg/day) or equiosmolar saline (CTR) each 2 days up to postnatal day (pnd) 10. On pnd 60, estrous cycle was evaluated using vaginal smears twice a day for 15 days, which showed MSG rats to be oligocyclic. Thereafter, animals were killed on estrous phase for blood and tissue collection. MSG rats had increased body mass, accumulation of retroperitoneal and visceral fat pads, and visceral adipocyte hypertrophy compared with CTR rats. MSG rats were also dyslipidemic and hyperinsulinemic but were normoglycemic and normoandrogenic. Ovarian morphology analysis showed that MSG rats had a two-fold decrease in oocyte count but a six-fold increase on ovarian follicular cysts, along with a higher number of total primordial and atretic follicles. Moreover, MSG rats had a four-fold increase in anti-Müllerian hormone immunohistochemical staining on antral follicles. Taken together, data presented here characterize MSG obesity as a unique model to study the metabolic pathways underlying reproductive disorders in the absence of overactivated hypothalamic–pituitary–gonadal axis.

Key Words

- ▶ monosodium L-glutamate
- ▶ hypothalamic obesity
- ▶ metabolic syndrome
- ▶ reproductive disorders
- ▶ proliferation

Journal of Endocrinology
(2016) 229, 61–72

Introduction

Obesity and metabolic syndrome (MetS) have escalating prevalence worldwide and have reached an epidemic proportion, affecting the world population regardless of ethnicity or Human Development Index

(O'Neill & O'Driscoll 2015). The latest consensus defines MetS as the presence of three of the five metabolic dysfunctions: obesity/central obesity, insulin resistance, dyslipidemia mainly as hypertriglyceridemia, hypertension,

ANEXO D

Metab Brain Dis
DOI 10.1007/s11011-016-9830-1



ORIGINAL ARTICLE

Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats

Bruno Araújo Serra Pinto¹ · Thamys Marinho Melo¹ · Karla Frida Torres Flister¹ · Lucas Martins França¹ · Daniela Kajihara² · Leonardo Yuji Tanaka² · Francisco Rafael Martins Laurindo² · Antonio Marcus de Andrade Paes¹

Received: 3 November 2015 / Accepted: 28 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Early-life environmental insults have been shown to promote long-term development of chronic non-communicable diseases, including metabolic disturbances and mental illnesses. As such, premature consumption of high-sugar foods has been associated to early onset of detrimental outcomes, whereas underlying mechanisms are still poorly understood. In the present study, we sought to investigate whether early and sustained exposure to high-sucrose diet promotes metabolic disturbances that ultimately might anticipate neurological injuries. At postnatal day 21, weaned male rats started to be fed a standard chow (10 % sucrose, CTR) or a high-sucrose diet (25 % sucrose, HSD) for 9 weeks prior to euthanasia at postnatal day 90. HSD did not alter weight gain and feed efficiency between groups, but increased visceral, non-visceral and brown adipose tissue accumulation. HSD rats demonstrated elevated blood glucose levels in both fasting and fed states, which were associated to impaired glucose tolerance. Peripheral insulin sensitivity did not change, whereas hepatic insulin resistance was supported by increased serum triglyceride levels, as well as higher TyG index values. Assessment of hippocampal gene expression showed endoplasmic reticulum (ER) stress pathways were activated in HSD rats, as compared to CTR. HSD rats had overexpression of unfolded protein response sensors, PERK and ATF6; ER chaperone, PDIA2 and apoptosis-related genes, CHOP and Caspase 3; but decreased expression of chaperone GRP78.

Finally, HSD rats demonstrated impaired neuromuscular function and anxious behavior, but preserved cognitive parameters. In conclusion, our data indicate that early exposure to HSD promote metabolic disturbances, which disrupt hippocampus homeostasis and might precociously affect its neuro-behavioral functions.

Keywords High-sucrose diet · Metabolic syndrome · Hippocampus · Unfolded protein response · Neurological impairment · Developmental origins of health and disease

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is conceptually defined as the co-occurrence of at least three out of the following metabolic disturbances: central/visceral obesity, hypertriglyceridemia, hyperglycemia, insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertension (Alberti et al. 2009). While precise mechanisms underlying the development of its clustered comorbidities are not completely understood, MetS has rapidly reached epidemic proportions worldwide in a straight relationship with the access to sugar-rich foods and beverages, as well as less physical activity (Bray et al. 2004). Additionally, accumulating data have suggested that metabolic (re)programming processes subsequent to early-life insults, i.e. during pregnancy, infancy or childhood, may lead to long-term development of chronic non-communicable diseases, such as MetS, cancer, mental illness, among others (Chan et al. 2015; Gluckman et al. 2007; Inadera 2013). This hypothesis for the developmental origins of health and disease (DOHaD) was first proposed in the 1990's by Dr. David Barker, and attracted increasing attention of scientists, medical doctors, epidemiologists and policymakers around the world (Cooper 2013).

✉ Antonio Marcus de Andrade Paes
marcupaes@ufma.br

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

² Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

ANEXO E

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 16
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 16/13 Nº do Protocolo: 23115.01983/2013-41 Data de entrada no CEUA: 20/12/2013 Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto: Avaliação pré-clínica de espécies vegetais utilizadas no tratamento de patologias associadas à síndrome metabólica		
Identificação da equipe executora: Antonio Marcus de Andrade Paes, Lucas Martins França, Vinicyus Teles Chagas, Karla Frida Torres Flister, Caio Fernando F Coelho		
Instituição onde será realizado: UFMA		
Área temática: Não se aplica	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 20/01/2014
Cooperação estrangeira:		Data de devolução: 25/04/2014

II – Objetivo:

Investigar mecanismos moleculares envolvidos nas atividades biológicas de plantas medicinais da flora maranhense que sejam popularmente utilizadas para o tratamento de patologias associadas à síndrome metabólica.

III – Sumário do projeto:

O atual projeto trata-se de projeto de pesquisa coordenado pelo Prof Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (UFMA). O projeto será realizado no Laboratório Ensino e Pesquisa em Fisiologia (LeFisio) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e terá a colaboração de diversos pesquisadores. O objetivo maior do projeto é realizar a avaliação pré-clínica de espécies vegetais utilizadas no tratamento de patologias associadas à síndrome metabólica. O projeto é subdividido em três subprojetos intitulados "Investigação do mecanismo da ação hipolipemiante das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels em animais dislipidêmicos", "Investigação do mecanismo da ação hipoglicemiante das folhas de *Averhoa carambola* L. em animais hiperglicêmicos" e "Purificação, isolamento e identificação biomonitorada de

ANEXO F



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de Syzygium cumini sobre a esteatose hepática não-alcoolica de camundongos obesos: Papel do estresse do retículo endoplasmático**” registrada com o nº **23115.002972/2017-01**, sob a responsabilidade de **Lucas Martins França**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	()Ensino (x) Pesquisa ()Extensão
Vigência da autorização	02/06/2017 à 02/06/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/Swiss/
Nº de animais	10 animais
Peso/Idade	60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central UFMA

Prof.ª Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA