

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANDRESSA FEIJÓ DA SILVA SANTOS

Efeito da suplementação de resveratrol na microbiota intestinal, no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica

**Ribeirão Preto
2019**

ANDRESSA FEIJÓ DA SILVA SANTOS

Efeito da suplementação de resveratrol na microbiota intestinal, no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Prof^ª. Dra. Vivian Marques Miguel Suen

Co-orientador: Prof^ª. Dra. Maria Cristina Foss Freitas

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Andressa F.S

Efeito da suplementação de resveratrol na microbiota intestinal, no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Ribeirão Preto, 2019.

106 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Marques Miguel Suen, Vivian. Co-orientadora: Foss-Freitas, Maria Cristina

1. Obesidade. 2. Resistência Insulínica. 3. Resveratrol. 4. Microbiota Intestinal. 5. Metabolismo de glicose e lipídios. 6. Camundongos C57BL/6

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Andressa Feijó da Silva Santos

Título do trabalho: Efeito da suplementação de resveratrol na microbiota intestinal, no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Prof^a. Dra. Vivian Marques Miguel Suen

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*“Dedico aos meus pais, filho,
irmãos e companheiro,
Cláudia, António, João Vítor
e Roger; com amor,
admiração, respeito e
gratidão pela compreensão,
carinho, amizade e
incansável apoio ao longo
dessa caminhada. A todos os
amigos que fizeram parte
dessa jornada Sem vocês eu
nada seria”.*

Agradecimientos

Agradeço a Deus, por colocar em meu destino o privilégio de ser pós-graduanda.

À minha família: aos meus pais, que por seu amor incondicional, não mediram esforços para que eu tivesse a oportunidade de avançar tão longe em meus estudos e por me educarem com valores corretos. Agradeço ainda aos meus pais por me permitirem desfrutar da companhia dos meus queridos irmãos, Andrei e Ariadne, por todo o incentivo, amizade, companheirismo e por ter tornado meus anos como doutoranda muito mais prazerosos. Ao meu filho João Vitor por sempre estar ao meu lado durante mais essa jornada e compreensão durante meus momentos de ausência, te amo filho.

Ao meu namorado Roger, por ser um grande incentivador e companheiro de todas as horas. Obrigada por me fazer feliz, pela compreensão e apoio incondicional.

A estimada Profa. Dra Vivian, por sua orientação iniciada enquanto eu era graduanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Obrigada por todos os ensinamentos, não apenas acadêmicos, mas dignos da pessoa íntegra que é. Agradeço pelo apoio em todos os momentos em que precisei, pelo carinho, amizade, confiança e por me mostrar e acreditar que não existe apenas um caminho, como ela mesma diz: "Somos seus filhos acadêmicos". Gratidão

À mais que querida Profa Dra. Maria Cristina Foss-Freita, agradeço pelo carinho, amizade de anos de convivência, paciência, dedicação e por acreditar em nossas ideias.

À querida Profa Dra. Daniela Carlos Sartori e seus alunos de pós-graduação, agradeço pelo carinho, a disponibilização do laboratório para que as análises fossem feitas, paciência, dedicação e por somar no meu aprendizado.

À Profa Dra. Leandra Zambelli Ramalho, pela disponibilidade e colaboração para o desenvolvimento da tese e análises.

Aos meus queridos companheiros e amigos do Laboratório de Nutrição, Neurociência e Metabolismo e demais laboratórios do Anexo A da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A convivência e companheirismo de vocês fez com que meus anos de pós-graduação se tornassem muito mais leves e divertidos.

E aos técnicos do Biotério da Clínica Médica, pelo tempo sedido ao longo de todo os experimentos assim como todo o conhecimento adquirido. Sem contar os momentos de risada intermináveis ao lado de cada um deles.

Às minhas queridas amigas da época da faculdade, muitas, que como eu, optaram pela carreira acadêmica e por isso, me deram o prazer de desfrutar de mais alguns anos de sua companhia.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, que tanto contribuiu para a minha formação profissional e pessoal.

Ao Biotério central, pelo fornecimento dos animais de experimentação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 162390/2015-7) e pelo apoio financeiro através da taxa de bancada, num momento em que a ciência passa por tanta dificuldade.

Agradeço ainda, mas não menos importante, ao Núcleo de Umbanda Sagrada Flecha Dourada, por todo apoio espiritual durante minha caminhada.

*Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão.....
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas,
que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim
e que valeu a pena”*

(Mário Quintana)

Resumo

SANTOS, A. F. S. Efeito da suplementação de resveratrol na microbiota intestinal, no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. 2019. 106f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2019.

A resistência insulínica define-se como uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena, sendo uma comorbidade da epidemia da obesidade. Sabe-se que uma elevada concentração de ácidos graxos circulantes, principalmente derivados das reservas de triglicérides do corpo, contribui para o aparecimento de resistência à insulina. Experiências em modelos animais mostram que infusões de emulsões lipídicas, mesmo de curta duração, podem resultar em resistência à insulina. Por outro lado a microbiota intestinal desempenha um papel importante na nutrição e saúde humana, através do fornecimento de nutrientes, impedindo a colonização de patógenos, mantendo a imunidade da mucosa normal. Backhed e colaboradores mostraram que a microbiota também é importante para o depósito de triglicérides no tecido adiposo. Objetivos: Investigar os efeitos da suplementação dos resveratrol na modulação da microbiota intestinal, no perfil lipídico e de glicose em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta hiperlipídica, a qual induziu a um quadro de resistência insulínica nesses animais. Material e métodos: Estudo experimental com uma amostra total de 92 camundongos machos C57BL/6 divididos em três estudos. No primeiro experimento 20 camundongos, com 5 animais por grupo, foram submetidos a dieta padrão (CTR), dieta hiperlipídica 45% (HL45), dieta hiperlipídica 60% (HL60) e dieta hiperlipídica e glicídica (HLHG) durante 8 semanas. No segundo experimento foram utilizados 32 animais, 8 animais por grupo, que receberam dieta hiperlipídica e 3 diferentes doses de resveratrol (RVS): dieta padrão (CTR), Resveratrol 5 mg/kg (RSV 5), Resveratrol 25 mg/kg (RSV 25) e Resveratrol 50 mg/kg (RSV 50). Durante essa fase os animais ficaram em indução de resistência a insulina por 4 semanas e 8 semanas em tratamento. Na terceira fase de experimento utilizou-se 40 animais os quais foram divididos em 4 grupos com 10 animais cada, seis grupos de dez animais cada, sendo o grupo controle (CTR), resistente a insulina (RI), padrão tratado (CTR+RSV) e resistente a insulina tratado (RI+RSV). No dia das eutanásias serão coletadas amostras sanguíneas para as dosagens lipídicas, glicemia e insulina, bem como espécimes totais do fígado, pâncreas, tecido adiposo marrom, epididimal e retroperitoneal para a mensuração dos seus pesos absolutos e histologia. E coleta de fezes para dosagens da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Obesidade, Resistência a insulina, Dieta hiperlipídica, Microbiota intestinal e Resveratrol

Abstract

SANTOS, A. F. S. Effect of resveratrol supplementation on gut microbiota, glucose and lipid metabolism of C57BL / 6 mice fed a high-fat diet. **2019. 106f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2019.**

Insulin resistance is defined as an insufficient biological response to endogenous or exogenous insulin, being a comorbidity of the obesity epidemic. A high concentration of circulating fatty acids, mainly derived from the body's triglyceride reserves, is known to contribute to the emergence of insulin resistance. Experiments in animal models show that infusions of even short-lived lipid emulsions can result in insulin resistance. On the other hand the intestinal microbiota plays an important role in human nutrition and health by providing nutrients, preventing pathogen colonization, while maintaining normal mucosal immunity. Backhed and colleagues showed that microbiota is also important for the deposition of triglycerides in adipose tissue. Objectives: To investigate the effects of resveratrol supplementation on intestinal microbiota modulation, lipid and glucose profile in C57BL / 6 mice submitted to a high-fat diet, which induced an insulin resistance in these animals. Material and methods: Experimental study with a total sample of 92 male C57BL / 6 mice divided into three studies. In the first experiment 20 mice, with 5 animals per group, were submitted to standard diet (CTR), 45% hyperlipid diet (HL45), 60% hyperlipid diet (HL60) and hyperlipidic and glycidic diet (HLHG) for 8 weeks. In the second experiment, 32 animals were used, 8 animals per group, receiving a high-fat diet and 3 different doses of resveratrol (SVR): standard diet (CTR), Resveratrol 5 mg / kg (RSV 5), Resveratrol 25 mg / kg (RSV). 25) and Resveratrol 50 mg / kg (RSV 50). During this phase the animals were on insulin resistance induction for 4 weeks and 8 weeks on treatment. In the third phase of the experiment, 40 animals were used and divided into 4 groups with 10 animals each, six groups of ten animals each, being the control group (CTR), insulin resistant (RI), standard treated (CTR + RSV).) and treated insulin resistant (RI + RSV). On the day of euthanasia, blood samples will be collected for lipid, glucose and insulin measurements, as well as total specimens from the liver, pancreas, brown, epididymal and retroperitoneal adipose tissue for the measurement of their absolute weights and histology. And collection of feces for dosages of intestinal microbiota.

Key-words: Obesity, Insulin Resistance, Hyperlipid Diet, Intestinal Microbiota and Resveratrol

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Considerações gerais sobre a obesidade	22
2.2 Considerações gerais sobre a resistência a insulina	23
2.3 Dieta hiperlipídica	25
2.4 Resveratrol	26
2.4.1 Resveratrol e resistência a insulina	29
2.5 Microbiota intestinal	30
2.5.1 Ações da microbiota intestinal	31
2.5.2 Alimentação e Microbiota intestinal	32
2.5.3 Disbiose intestinal	33
3. Hipótese	36
4. Objetivos	38
4.1 Objetivo geral	38
4.2 Objetivos específicos	38
5. Estudo 1: Padronização do modelo de dieta hiperlipídica induzindo a Resistência a Insulina	41
5.1 Material e Métodos	41
5.2 Análise estatística	46
5.3 Resultados	47
5.4 Discussão	58
6. Estudo 2: Padronização do modelo dose-resposta do suplemento Resveratrol	63
6.1 Material e Métodos	63
6.2 Análise estatística	67
6.3 Resultados	68
6.4 Discussão	83
7. Discussão geral	90
8. Conclusões	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	104
A. Artigo submetido para aprovação na revista "Diabetes & Metabolism"	105
B. Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP	106

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A obesidade atualmente é considerada uma epidemia mundial devido a relação direta entre excesso de tecido adiposo, inflamação sistêmica e desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (HAN *et al*, 2009). O excesso de peso é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de resistência a insulina sendo esta a principal característica do diabetes tipo 2 (DEFRONZO E TRIPATHY,2011).

A resistência insulínica define-se como uma situação com uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena. A nível celular, a resistência à insulina define a incapacidade da via de sinalização da insulina desempenhar as suas funções que estão envolvidas em múltiplos aspectos metabólicos e mitogênicos da sua função celular (GINSBERG, 2000; SAINI, 2010). Diversas evidências têm demonstrado que defeitos no transporte de glicose são responsáveis pela resistência à insulina observada em diabetes *mellitus* tipo 2. A resistência insulínica deve-se a defeitos na regulação do transportador de glicose 4 (GLUT4), incluindo alterações na expressão e translocação de GLUT4; alteração nos padrões temporais e espaciais das moléculas sinalizadoras e/ou defeitos na via de sinalização da insulina (YAWORSKY *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2007), como ausência ou diminuição da expressão do receptor da insulina nos tecidos periféricos (FOTI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007; KONG *et al*, 2009), entre outros.

Sendo que uma elevada concentração de ácidos graxos circulantes, principalmente derivados das reservas de triglicérides do corpo, contribui para o aparecimento de resistência à insulina (ECKEL, 1989; JENSEN *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2001; KONG *et al.*, 2009). Experiências em modelos animais mostram que infusões de emulsões lipídicas, mesmo de curta duração, podem resultar em resistência à insulina (DRESNER *et al.*, 1999; KONG *et al.*, 2009).

O aumento intracelular de metabolitos derivados de ácidos graxos, como o diacilglicerol, acil CoAs ou ceramidas ativa uma cascata de serinas/treoninas levando a fosforilação de locais serina/treonina do IRS. Estas formas fosforiladas nos resíduos de serina impedem a interação do IRS com a PI3-cinase diminuindo a ativação do transporte de glicose e outros eventos desencadeados pela interação do IRS com a PI3-cinase, como a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 (SHULMAN, 2000; SAINI, 2010). Além disso, os ácidos graxos competem com a glicose para a oxidação de substratos no músculo esquelético (SHULMAN, 2000).

O aumento de ácidos graxos livres no plasma diminui a captação de glicose estimulada pela insulina, enquanto a diminuição do conteúdo de lipídios no plasma melhora a atividade da insulina em células do músculo esquelético, adipócitos e fígado (MOLLER, 2001; SAINI, 2010) demonstrando a relação entre os ácidos graxos e a resistência insulínica.

Por outro lado a microbiota intestinal desempenha um papel importante na nutrição e saúde humana, por meio do fornecimento de nutrientes, impedindo a colonização de patógenos, mantendo a imunidade da mucosa normal e regulando o metabolismo e o estoque de gordura. Segundo Backhed e Alonso e Guarner, ratos livres de germes intestinais não se tornam obesos quando alimentados com uma dieta hiperlipídica (BACKHED et al., 2007; ALONSO E GUARNER,2013). Backhed e colaboradores mostraram que a microbiota também é importante para o depósito de triglicérides no tecido adiposo (BACKHED et al.,2004). Assim, novas metas para uma modulação melhor e mais eficaz de microbiota intestinal estão sendo desenvolvidas.

O resveratrol é um composto polifenólico existente nas uvas e no vinho tinto, exercendo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, cardioprotetora e no envelhecimento. Recentemente, foi reportado o efeito anti-obesogênico dessa substancia, devido esta ativar a termogênese no tecido adiposo marrom e atenuar a expressão dos principais fatores de transcrição, incluindo a ácido graxo sintase (FAS), proteína ativadora 2 (aP2) e lipase lipoprotéica (LPL). No entanto, a proporção de resveratrol na dieta humana é muito baixa (STERVBO et al,2007). Na população espanhola, a dose estimada de ingestão diária de resveratrol é de 0,9 mg por dia (ZAMORA-ROS et al.,2008). Além disso, o resveratrol tem baixa biodisponibilidade após a administração oral, mas de alta acumulação no tecido intestinal (KALDAS et al.,2003; VITRAC et al.,2003).

Assim, pode ser muito difícil de atingir concentrações eficazes na regulação do metabolismo dos tecidos in vivo, por exemplo, no tecido adiposo visceral. A biodisponibilidade e a absorção dos polifenóis pode ser influenciada pela sua estrutura química, matriz de comida, e a circulação entero-hepática; sendo assim uma elevada porcentagem de resveratrol não é absorvida no intestino delgado, chegando intacta no cólon, onde pode interagir com a microbiota (MANACH et al.,2004). Portanto, parece ser mais razoável concluir que os efeitos do resveratrol tem ação direta sobre microbiota intestinal.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a obesidade

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT) resultante do excesso da deposição de lipídios nos adipócitos (PONTES et al, 2009). O excesso de ingestão energética e o estilo de vida sedentária levaram ao aumento da incidência da obesidade, sendo o maior fator de risco o desenvolvimento da resistência à insulina (GHAZARIAN et al, 2015).

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000), como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal [índice de massa corporal (IMC) > 30 kg/m²]. As consequências da obesidade para a saúde vão desde o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como diabetes tipo 2 (DM2), doença isquêmica do coração, osteoporose e alguns tipos de câncer, que por sua vez, reduzem a qualidade de vida e podem levar à diminuição da expectativa de vida (WHO, 2000; HARDMAN et al., 2000; TRIGUEROS et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde projetou para o ano de 2030 que 370 milhões de pessoas poderiam estar com DM2, em consequência da obesidade, mas esta estimativa não se manteve conservada, pois em 2011, o número de adultos diabéticos já passava dos 347 milhões (DENIS; OBIN, 2013).

A última pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com dados recentes avaliados pelas Pesquisas de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF) mostram o consumo alimentar no Brasil constituído de alimentos com alto teor calórico e baixo teor de nutrientes, resultando numa dieta deficiente em importantes nutrientes, aumentando o risco para obesidade e doenças crônicas não transmissíveis. Os dados mostram também a prevalência do excesso de peso de 50,1% no sexo masculino e 48% no sexo feminino e, a prevalência da obesidade de 12,4% e 16,9%, respectivamente. Podemos afirmar que tendências de transição nutricional ocorridas neste século em vários países remetem a um novo modelo alimentar baseado numa dieta rica em gorduras saturadas, açúcares e alimentos refinados, e com baixo teor de carboidratos complexos e fibras, também conhecida como dieta ocidental (FILHO et al, 2003).

A causa principal da obesidade é o desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético. A ingestão alimentar, o gasto energético e a adiposidade corporal são reguladas homeostaticamente e o mau funcionamento deste conjunto de fatores pode levar à obesidade (CHEVALIER *et al.*, 2015). O balanço energético positivo, ocasionado pelo valor calórico ingerido superior ao gasto, é importante fator contribuinte para o desenvolvimento da obesidade, ocasionando aumento nos estoques de energia, na forma de tecido adiposo (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR, 2003).

2.2 Considerações gerais sobre a resistência a insulina

A insulina é uma molécula pleiotrópica que regula a captação de aminoácidos, a síntese de proteínas, a proteólise, a lipólise no tecido adiposo, a atividade de lipoproteínas lipase, a secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a captação de glicose no tecido adiposo e músculo esquelético, a síntese de glicogênio no fígado e músculo esquelético e a produção endógena de glicose. Indivíduos insulino resistentes apresentam um metabolismo de glicose alterado, com níveis de glicose em jejum elevados e/ou hiperglicemia, redução na ação da insulina após a administração da glicose e/ou diminuição na supressão da produção de glicose endógena (CORNIER *et al.*, 2008).

Além dos fatores genéticos, também os fatores ambientais parecem estar envolvidos na ocorrência da resistência à insulina. A combinação da obesidade, inatividade física e consumo de dietas aterogênicas aumenta a prevalência de casos de insulino resistente (CORNIER *et al.*, 2008).

Sob o ponto de vista metabólico, a resistência a insulina evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas. O músculo e o tecido adiposo são os principais órgãos responsáveis pela utilização periférica da glicose em condições pós-prandiais; assim a diminuição da produção dos transportadores de glicose GLUT4, responsáveis pela captação de glicose e defeitos de atividade da glicogênio sintase muscular, contribuem para a hiperglicemia pós-prandial. O fígado é o principal responsável pela produção de glicose em condições de jejum; assim a insuficiente inibição da glicogenólise e gliconeogênese hepática, aparentemente em relação com alterações da glicoquinase hepática, contribuem para a hiperglicemia de jejum. O aumento relativo dos níveis da glicemia e dos ácidos gordos circulantes que ocorrem nessas circunstâncias podem contribuir para a resistência a insulina e para a lesão progressiva da célula β e lipotoxicidade (SAINI, 2010).

Para manter a homeostase da glicemia é necessário o desenvolvimento de um hiperinsulinismo mantido, o que requer a capacidade adaptativa e de reserva da célula β ; quando esta falha, em geral ao fim de algumas décadas, surge então a hiperglicemia e a diabetes (CORNIER *et al.*, 2008). A resposta secretora da insulina diminui, o que conduz a uma diminuição da concentração de insulina no plasma resultando no aumento da produção hepática de glicose e hiperglicemia em paralelo (LILLIOJA *et al.*, 1993).

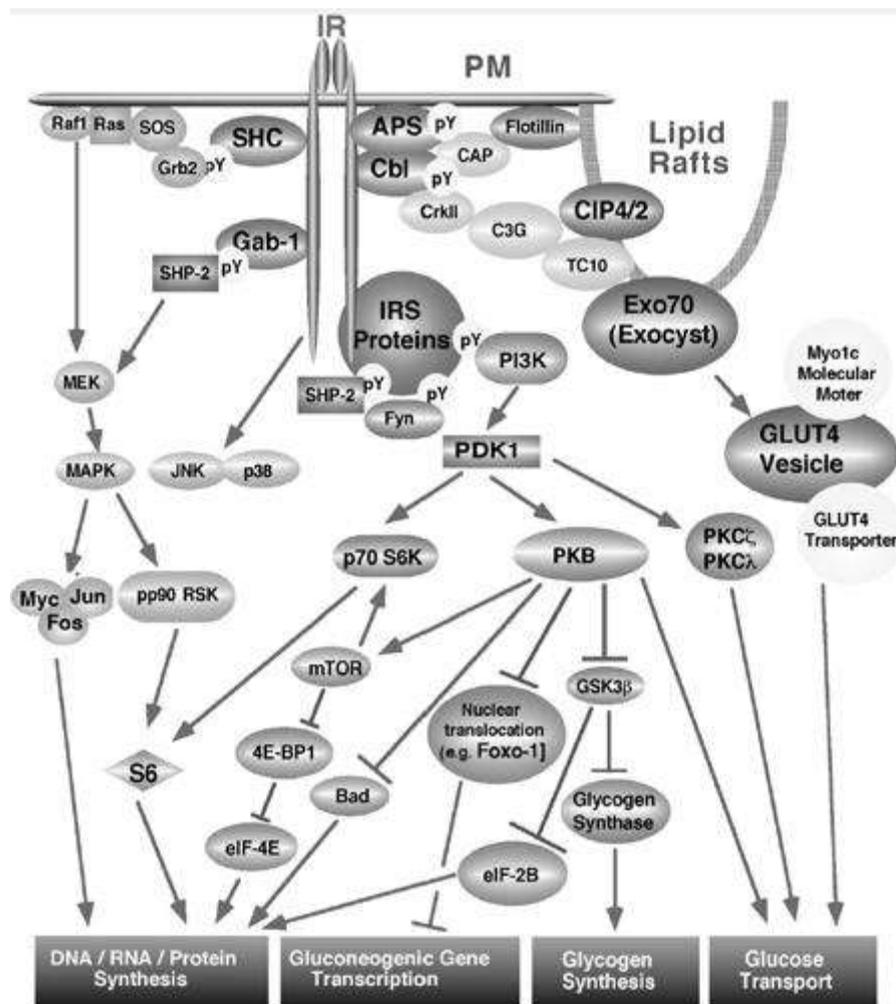


Figura 1. Via de sinalização da insulina e respectivas funções. (Retirado de msdlatina.com)

A resistência a insulina define-se como uma situação com uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena. A nível celular, a resistência à insulina define a incapacidade da via de sinalização da insulina desempenhar as suas funções que estão envolvidas em múltiplos aspetos metabólicos e mitogénicos da sua função celular (GINSBERG, 2000; SAINI, 2010). Diversas evidências têm demonstrado que defeitos no

transporte de glicose são responsáveis pela resistência à insulina observada em diabetes *mellitus* tipo 2. A resistência a insulina deve-se a defeitos na regulação do transportador de glicose 4, incluindo alterações na expressão e translocação de GLUT4; alteração nos padrões temporais e espaciais das moléculas sinalizadoras e/ou defeitos na via de sinalização da insulina (figura 1) (YAWORSKY *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2007), como ausência ou diminuição da expressão do receptor da insulina nos tecidos periféricos (FOTI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2009), entre outros.

2.3 Dieta hiperlipídica

Dietas hipercalóricas têm sido utilizadas com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade e síndrome plurimetabólica. Ratos submetidos à dieta hiperlipídica palatável mostram, a partir de três semanas, um aumento na quantidade dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET) e epididimal (EPI) (DUARTE,2001), com tendências a distúrbios no perfil lipídico (ESTADELLA *et al.*,2004) e alterações nas etapas iniciais da sinalização de insulina (PRADO *et al.*,2005). O Diabetes tipo 2, associado à obesidade e à síndrome plurimetabólica, caracteriza-se por resistência periférica dos tecidos à ação da insulina, hiperglicemia e incapacidade relativa de secreção de insulina pelas células beta do pâncreas (CHRISTI *al.*,1996).

Um sinalizador clínico importante para a presença de resistência à insulina e hiperinsulinemia, mesmo na ausência de obesidade, é o padrão central de distribuição da gordura corpórea (adiposidade central ou visceral). Outros indicadores clínicos de resistência à insulina e hiperinsulinemia são; hipertrigliceridemia e concentrações reduzidas de HDL colesterol, intolerância à glicose, hipertensão e aterosclerose (FUJIMOTO,2000).

A ingestão aumentada de lipídeos pode levar ao aparecimento de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (HARDMAN,1999)

O aumento do fluxo de ácidos graxos livres compromete a ação da insulina hepática em vários modelos estudados (BERGMAN *et al.*, 2007). Isto inclui o aumento da liberação de glicose hepática, a síntese de citocinas pro-inflamatórias e alterações no metabolismo de lipoproteínas (CORNIER *et al.*, 2008).

A insulina em situações normais aumenta a expressão de genes que expressam enzimas chave na biossíntese de triglicerídeos (GONZALEZ-BARO *et al.*, 2007), mas também reduz a produção e secreção de triglicerídeos VLDL e apoproteína B, um efeito atribuído à redução da lipólise no tecido adiposo (LEWIS *et al.*, 1993).

No fígado de pacientes com resistência a insulina, o fluxo de ácidos graxos livres é elevado, a síntese e armazenamento de triglicerídeos está aumentada e o excesso de triglicerídeos é secretado como VLDL (LEWIS E STEINER, 1996). A dislipidemia associada à resistência à insulina é uma consequência direta do aumento da secreção de VLDL no fígado (GINSBERG et al., 2005; CORNIER et al., 2008).

2.4 Resveratrol

A palavra resveratrol é derivada do latim Res que vem Veratrum, e o sufixo grupos álcool (hidroxila) em sua estrutura (Harikumar & Aggarwal, 2008). O resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) é um composto polifenólico que foi isolado pela primeira vez em 1940, a partir da raiz do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum*) e, posteriormente, na década de 60, da raiz do *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada nas medicinas tradicionais chinesa e japonesa para o tratamento de infecções fúngicas, doenças inflamatórias, HAS, alergias e dislipidemias (Nonomura et al., 1963; Langcake et al., 1979; Shisodia & Aggarwal, 2006). O resveratrol existe nas formas isômeras cis e trans, sendo a forma trans considerada a mais estável (REGE *et al.*, 2014).

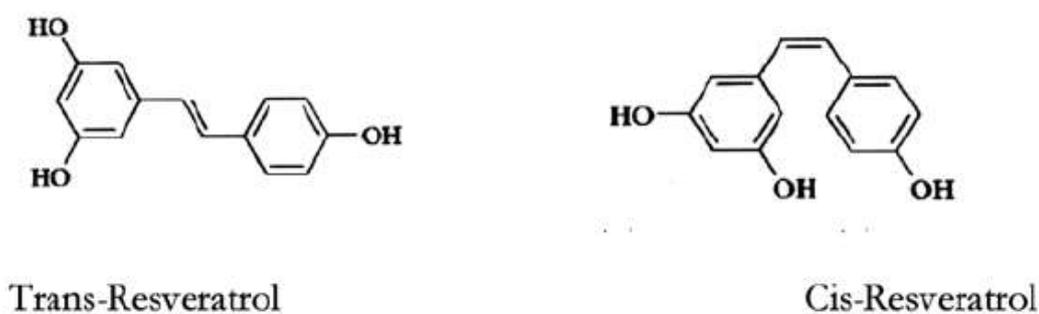


Figura 2. Estruturas químicas dos isômeros de resveratrol: *trans* e *cis*-resveratrol. Modificado de Rege et al., 2014.

O resveratrol pode ser encontrado em mais de 70 espécies de plantas, sendo produzido em grande quantidade em videiras *Vitis vinifera* e em outras plantas como uma resposta protetora a infecções por fungos ou ao estresse ambiental, como exposição à luz ultravioleta (Langcake & Pryce, 1976). Atualmente, sabe-se que o resveratrol é o principal polifenol não-flavonóide encontrado em uvas, amendoins, mirtilo e ameixas (Kovacic & Somanathan, 2010). Por ser encontrado no vinho tinto, acredita-se que o referido composto seja o principal

responsável pelo "paradoxo francês", fenômeno qual o consumo de frequente de vinho tinto na França está associado a uma reduzida mortalidade por doenças cardíacas, em comparação aos outros países europeus (Renaud & de Lorgeril, 1992). Estudos sugerem que as atividades cardioprotetoras do resveratrol estão relacionadas às suas propriedades antioxidantes e à capacidade de modular e aprimorar as defesas antioxidantes das células (Soleas et al., 1997; Frémont, 2000). Entretanto, somente as atividades modulatórias do estado oxidativo celular não esclarecem os efeitos farmacológicos desse composto, o qual demonstra, além das propriedades cardioprotetoras, atividades anti-inflamatórias, anti-tumorais, antienvelhecimento, anti-diabéticas e neuroprotetoras (Frémont, 2000; Baur & Sinclair, 2006; Novelle et al., 2015).

Apesar de sua versatilidade, até o momento o mecanismo de ação do resveratrol e, seu real efeito biológico ainda não foi elucidado, apenas propostas de mecanismos são feitas acerca do polifenol. Dentre elas, a via das sirtuínas mostra-se uma proposta relativamente válida até o momento. A ação antienvelhecimento do resveratrol vem sendo relacionada ao seu controle em SIRT-1, sabendo que esta possui efeitos diretos no metabolismo celular, indução de morte celular, processos de diferenciação e proliferação (MICHAN, S et al 2007). Um fator polêmico sobre as supostas vias e efeito do resveratrol envolve sua baixa biodisponibilidade. Esta tem sido alvo de grande discussão entre os grupos de pesquisa envolvidos. Um estudo publicado por WALLE, T. et al. 2004, demonstrou a baixa biodisponibilidade(BD) do resveratrol e seu rápido declínio na concentração plasmática.

Evidências experimentais demonstraram que a proteína denominada sirtuína 1 (SIRT1) é um dos principais alvos do resveratrol e, quando ativada, medeia muitas ações fisiológicas do resveratrol (Camins et al., 2010; Kulkarni & Cantó, 2015). SIRT1 foi primeiramente identificada como ortóloga humana do silent information regulator 2 (Sir2) de leveduras, pertencente a uma família de histona desacetilases (HDACs) que é dividida em 4 grupos (Frye, 2000). As HDACs classe III são denominadas sirtuínas, as quais apresentam sete isoformas já caracterizadas em mamíferos (SIRT1-7) com diferentes localizações e funções celulares (Denu, 2005; Dali-Youcef et al., 2007).

A isoforma SIRT1 exerce seus efeitos a partir de duas vias distintas: modificações das histonas, que podem resultar no silenciamento da cromatina e na repressão da transcrição gênica; e regulação de substratos celulares não-histonas, especialmente fatores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53, a família FOXO de fatores de transcrição FOXO 1, 3 e 4, e a família do NF- (Camins et al., 2010). A desacetilação desses fatores resultam, entre outras consequências, na inibição da expressão de fatores pró-apoptóticos e pró-inflamatórios; em

específico, alguns membros da família FOXO estão envolvidos na regulação do metabolismo celular, e a desacetilação do fator de transcrição FOXO1 via SIRT1 parece estar envolvida na diminuição da resistência à insulina e na homeostase da glicose (Camins et al., 2010; Hubbard & Sinclair, 2014; Kulkarni & Cantó, 2015).

Ademais, a ativação da SIRT1 parece estar envolvida direta ou indiretamente com a ativação de outras proteínas, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enzima importante na regulação do metabolismo e da sobrevivência celular (Price et al., 2012; 16 Kulkarni & Cantó, 2015). Desta forma, acredita-se que muitos dos efeitos benéficos do resveratrol estão relacionados à ativação da SIRT1 e à modulação da atividade de proteínas envolvidas na regulação de mecanismos celulares importantes para a promoção da homeostase da glicose e neuroproteção (Baur & Sinclair, 2006; Szkudelska & Szkudelski, 2010; Bastianetto et al., 2015).

Além da questão da biodisponibilidade, os estudos vêm demonstrando divergências em relação à eficácia do resveratrol, onde o principal fator limitante da resposta é a dose administrada. As populações utilizadas, humanos ou animais, demonstraram diferentes respostas frente ao tratamento com resveratrol. Um artigo de revisão publicado por VISIOLI 2014 descreve o resveratrol como um “fiasco”, após expor uma série de estudos onde o polifenol não apresenta efeito, principalmente em humanos. Em contrapartida, um estudo publicado por PARK et al. 2015 demonstra opinião diferente. Neste trabalho o autor destaca o grande número de estudos publicados nos últimos anos, os quais demonstram o resveratrol com grande potencial em relação a seus efeitos biológicos. O autor ainda, atenua as críticas em relação às diferentes respostas in vivo, e defende que não foi encontrada uma dose adequada e ideal para o composto.

Devido a esta controvérsia, algumas hipóteses vêm sendo apresentadas, dentre elas, a de que cerca de 42% do resveratrol ficaria acumulado no trato gastrointestinal, como descrito por QUEIPO-ORTUÑO et al. 2012 Esta retenção gástrica poderia estar agindo na modulação da população microbiana, servindo como substrato para as Bactérias intestinais. Alguns estudos sobre modulação microbiana e o resveratrol já foram publicados. Estes estudos demonstram a ação do polifenol sobre a microbiota e o ambiente intestinal. O estudo, publicado por QIAO et al. 2014 demonstrou o aumento de Bactérias comensalistas, probióticas, e a melhora de parâmetros como redução da inflamação do tecido adiposo, e diminuição do peso corporal de animais submetidos à dieta hipercalórica(HFD). O estudo demonstrou, ainda, a melhora da taxa de Bacterioides-Firmicutes, e a inibição do crescimento de *Enterococcus Faecalis*, bactéria encontrada em casos de disbiose.

Outro estudo que relaciona o resveratrol à microbiota, foi o realizado por LARROSA et al. 2009. Este trabalho demonstrou também um aumento de bactérias próbióticas, em modelos de colite, e a diminuição de bactérias relacionadas a disbiose causada pela doença. Uma hipótese indica que o resveratrol pode atuar como um agente modulador da microbiota é de que o composto é usado como substrato pelas bactérias, gerando metabólitos secundários. O dihidroresveratrol (3,4',5-trihydroxybibenzyl), metabólito do resveratrol gerado pelas bactérias, está presente em uma série de trabalhos, os quais pesquisam metabólitos hepáticos e microbianos. O estudo de BODE et al. 2013, analisou os metabólitos do resveratrol produzidos nas fezes, correlacionando com os níveis de bactéria. O dihidroresveratrol esteve presente em fezes de humanos saudáveis, após a ingestão de resveratrol. Outra abordagem para o metabólito, é o estudo de farmacocinética realizado por ROTCHES-RIBALTA et al. 2012, em humanos, demonstrando a produção do metabólito pelas bactérias intestinais, após a ingestão de vinho tinto e extrato de uva. O trabalho de WANG et al. 2006, apresenta o 18 metabolismo de um análogo do resveratrol, o piceid (Resveratrol-3- β -mono-D-glucoside). Este composto análogo detém a mesma característica, após ser metabolizado pelas Bactérias intestinais, formando o dihidro-piceid.

2.4.1 Resveratrol e Resistência a insulina

Estudos em roedores com DM experimental induzido por STZ e nicotinamida revelaram efeitos anti-hiperglicêmicos do resveratrol, evidenciados pela diminuição dos níveis de glicose sanguínea e de HbA1c (Palsamy & Subramanian, 2008, 2009). Seu efeito nos níveis glicêmicos pode estar relacionado à ação estimulante no transporte de glicose intracelular, visto que fibras musculares do sóleo, hepatócitos e adipócitos, isolados de ratos com DM experimental induzido por STZ, foram capazes de captar significativamente mais glicose quando tratados com resveratrol (Su et al., 2006).

Acredita-se que o estímulo na captação de glicose gerado pelo resveratrol esteja associado a uma maior ação dos transportadores de glicose na membrana plasmática, uma vez que estudos evidenciaram um aumento na expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) em ratos com DM induzido por STZ e tratados com resveratrol, comparados aos animais diabéticos não tratados (Chi et al., 2007; Penumathsa et al., 2008).

Além dos efeitos anti-hiperglicêmicos, a atuação benéfica do resveratrol pode estar relacionada aos seus efeitos anti-inflamatórios: em ratos com DM experimental, foi demonstrado que o tratamento via oral com resveratrol reduziu significativamente os níveis

plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias denominadas fator de necrose tumoral alfa (TNF-terleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) no encéfalo e em outros órgãos dos animais, em comparação aos ratos diabéticos não tratados (Palsamy & Subramanian, 2010, 2011; Prabhakar, 2013).

Ademais, o tratamento com resveratrol pode ser capaz de modular o estado oxidativo, pois promove a normalização dos índices de lipoperoxidação, bem como o restabelecimento dos níveis previamente reduzidos de atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no plasma e em diferentes órgãos - incluindo o encéfalo - de roedores com DM experimental (Palsamy & Subramanian, 2010; Park & Pezzuto, 2015).

2.5 Microbiota intestinal

Denominada anteriormente de flora, a microbiota do intestino é um conjunto de microrganismos que colonizam este órgão. As populações que constituem a microbiota são variáveis ao longo do trato digestório e localizam-se entre a mucosa e o lúmen intestinal (BEDANI; ROSSI, 2009).

A microbiota intestinal constitui um ecossistema onde microrganismos de diferentes espécies participam de ciclos vitais inter-relacionados ou independentes, em um ambiente de grande biodiversidade. Algumas espécies vivem dos produtos gerados pela atividade metabólica das primeiras, e por sua vez beneficiam a proliferação de outras com seus subprodutos (REIG; ANESTO, 2002).

Apesar do grande número de espécies, a prevalência dos gêneros é bastante restrita, sendo estes: bacteróides, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*. Existem sítios específicos para adesão das bactérias à mucosa do intestino e esta adesão é determinante para sua colonização (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). Essas espécies podem ser de dois tipos: as benéficas, como os lactobacilos e as bifidobactérias; e as prejudiciais, como as do gênero *Enterobacteriaceae* e *Clostridium ssp* (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Logo após o nascimento, inicia-se a colonização do trato gastrointestinal (TGI) do lactente. Os microrganismos colonizam rapidamente as superfícies e mucosas intestinais. Isso acontece até que a microbiota fique semelhante à de um adulto, todo esse processo ocorre num período de aproximadamente 6 a 12 meses. Durante o parto normal a microbiota intestinal materna é transmitida ao recém-nascido, esse processo não acontece nos partos cesáreos, explicando o fato do estabelecimento das bactérias anaeróbicas serem inicialmente reduzidos neste grupo. O recém-nascido possui um teor elevado de oxigênio no intestino,

favorecendo o crescimento de bactérias aeróbicas, tais como: Enterococos e Estafilococos. Durante o estabelecimento da microbiota, este grupo de bactérias tem a capacidade de reduzir a concentração de oxigênio devido ao elevado consumo, promovendo o crescimento adequado das populações de bactérias anaeróbicas obrigatórias, como os Bacteróides, Bifidobactérias e Clostridium (SANTOS, 2010).

Na microbiota dos lactentes existem mudanças significativas se comparadas com as de outros bebês que não consomem leite materno, pois se encontra nesse um conjunto de componentes que estimulam o efeito bifidogênico, que é o aumento da proliferação de bifidobactérias, uma das espécies mais importantes que habitam o intestino. Estes componentes são ricos em oligossacarídeos e lactose, justificando a diferença na microbiota entre crianças amamentadas com leite materno e as que são amamentadas com leite de vaca. Por esse motivo, pode-se afirmar que o desenvolvimento da microbiota depende dos nutrientes ofertados desde o nascimento (ARSLANOGLU; MORO; BOEHM, 2007; SOUZA et al., 2010; VANDENPLAS et al., 2011).

A microbiota tem influência sobre diversas funções que ocorrem no nosso organismo. Em seu estado normal evita que microrganismos altamente patogênicos proliferem. Por outro lado, se houver qualquer mudança no equilíbrio da microbiota, ela fica vulnerável e propícia a infecções (SANTOS, 2010).

De acordo com Carvalho (2004 apud ROCHA, 2011), existem alguns alimentos que são administrados prematuramente na dieta das crianças, e que futuramente podem provocar distúrbios em função do seu uso contínuo e prolongado. Grandes quantidades de dissacarídeos e monossacarídeos na alimentação podem promover diversas patologias.

2.5.1 Ações da microbiota intestinal

No intestino, define-se uma microbiota normal como aquela que evita o surgimento de patologias e desempenha as funções do TGI (SAAD, 2006). A principal função antibacteriana desempenhada pela microbiota é o seu efeito de barreira, promovido pelos sítios de ligação celulares da mucosa que promove aderência e estimulação do sistema imune. As bactérias que exercem essa proteção intestinal são conhecidas como bactérias autóctones, que impedem permanentemente o estabelecimento das bactérias patogênicas. Existem outros sistemas de proteção adicionais, como a disputa por nutrientes ofertados no meio e produção de componentes restritivos ao crescimento de bactérias patogênicas, como ácido e metabólitos

tóxicos e produção de substâncias com ação antimicrobiana in vivo (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006; ROCHA, 2011; SANTOS, 2010).

O sistema de defesa da mucosa intestinal conta com uma microbiota ativa, que tende a desenvolver-se e constituir importantes componentes do sistema imune, de forma a evitar o surgimento de muitas doenças, que talvez estejam envolvidas com desregulações ou interferências no desenvolvimento inicial da resposta imunológica (VANDENPLAS et al., 2011).

A estabilidade imunológica habitual depende de um mecanismo conhecido como imunidade inata, a qual irá desencadear uma resposta capaz de promover o equilíbrio entre os microrganismos da mucosa intestinal. Tudo começa por meio da ativação das células de defesa como macrófagos e células dendríticas. Após ativação, tais células de defesa são capazes de detectar a presença de moléculas estranhas, chamadas PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), que estão relacionadas a microrganismos invasores. Essas células além de manter o equilíbrio imunológico têm a capacidade de promover reações em cadeia, a partir da ativação de sensores ou receptores como TLR (toll-like receptor) e NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain) por moléculas bacterianas. Tal processo de ativação pelas bactérias estabelece o equilíbrio da mucosa intestinal (PINHO, 2008).

Tem-se argumentado assiduamente a importância do TGI na conservação e qualidade da saúde humana. Em função da irregular homeostasia da microbiota intestinal surgem alguns distúrbios como diarreias, obstipação crônica, colite pseudomembranosa, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, câncer de cólon (BADARÓ et al., 2008; BARROS NETO et al., 2011; PINHO, 2008). Nesse sentido, ressalta-se a importância de uma boa alimentação para manter a homeostase intestinal, visto que é através dela que se obtêm os principais nutrientes necessários ao organismo.

2.5.2 Alimentação e Microbiota intestinal

A alimentação tem grande importância na atuação do organismo para a recuperação e conservação da saúde, além de promover melhorias na qualidade de vida das pessoas. Existem diversos tipos de alimentos ofertados, para atender as necessidades nutricionais do organismo, desde produtos naturais até artificiais. Os alimentos passam por vários processos até chegar no seu destino, o conjunto de transformações que as substâncias sofrem até chegar no interior dos organismos vivos, é denominado metabolismo, esse processo abrange a digestão,

absorção, utilização de energia, nutrientes e o reaproveitamento ou expulsão de subprodutos do catabolismo (ALMEIDA et al., 2009).

Existem diversas circunstâncias para que os nutrientes sejam degradados e aproveitados pelo organismo. Ao ingerir qualquer tipo de alimento não significa que ele será absorvido pelas células, para que esse processo aconteça é essencial o equilíbrio entre quantidade e a qualidade de um nutriente. A falta de um nutriente indispensável para o organismo pode prejudicar a disponibilidade, absorção, metabolismo ou promover a “pobreza” nutricional de outros alimentos. Além disso, é fundamental que os ingredientes que o organismo não utiliza sejam eliminados corretamente, bem como as substâncias tóxicas, para assegurar o equilíbrio nutricional e funcional do organismo (ALMEIDA et al., 2009).

Na busca por uma vida melhor e saudável, as pessoas encontram os alimentos funcionais que promovem vários benefícios à saúde, fornecendo os nutrientes necessários para prevenção de doenças. Esses alimentos aprimoram a missão dos processos fisiológicos, e mantem o equilíbrio da microbiota intestinal (CALLEYA; KUAL; PEREIRA, 2010).

Dentre muitos alimentos funcionais, os prebióticos e os probióticos vem tomando espaço cada vez maiores no cotidiano das pessoas. Define-se os prebióticos como substâncias fermentáveis, não digeríveis que promovem o desenvolvimento seletivo e ativa o metabolismo de bactérias benéficas no trato intestinal, especialmente as bifidobactérias. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que atribuem benefícios à saúde se administrados adequadamente. A agregação entre prebióticos e probióticos constituem os simbióticos, sendo indicados por favorecer o desenvolvimento de microrganismos benéficos (SEQUEIRA; RIBEIRO; GOMES, 2008; TSUTSUMI et al., 2011).

Para assegurar a estabilidade adequada da microbiota intestinal deve-se monitorar a suplementação da dieta com simbióticos. Em função disso, o conceito de alimento funcional tem se tornado essencial nos aditivos alimentares, por atribuir benefícios sobre a formação e manutenção da microbiota intestinal (SAAD, 2006).

2.5.3 Disbiose intestinal

Trata-se de uma desordem na microbiota caracterizada por um desajuste da colonização bacteriana, onde ocorre o predomínio de bactérias nocivas sobre as benéficas (MEIRELLES; AZEVEDO, 2007; SANTOS, 2010). Este distúrbio é conhecido como disbiose, cada vez mais comum que vem sendo considerado como relevante no diagnóstico de

várias doenças como diarreias, letargia, depressão e artrite reumatoide (ALMEIDA et al., 2009).

A disbiose intestinal pode proporcionar a multiplicação de bactérias patogênicas e conseqüentemente a produção de toxinas metabólicas. Em outras palavras, quando esta microbiota é abalada por algum desequilíbrio, o organismo fica propício ao crescimento de fungos, bactérias e outros patógenos, esses microrganismos produzem toxinas que são absorvidas pela corrente sanguínea, induzindo processos inflamatórios (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006).

Hipótese

3.Hipótese

A suplementação de resveratrol melhora a disfunção metabólica ao induzir alterações na resistência insulínica, perfil lipídico, distribuição de gordura corporal e modula a microbiota intestinal em modelo animal de camundongo C57BL/6 recebendo dieta hiperlipídica.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da suplementação dos resveratrol na modulação da microbiota intestinal, no perfil lipídico e de glicose em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta hiperlipídica, a qual induziu a um quadro de resistência insulínica nesses animais.

4.2 Objetivos específicos

- Estudo 1: dentre três tipos de dieta hiperlipídica qual induziria de forma rápida e de fácil reprodutibilidade a resistência a insulina;
- Estudo 2: Através de três dosagens de suplementação do fitoterápico resveratrol, 5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg de peso dos animais. Qual teria melhor efeito protetor na RI e modulador da MI, sem efeitos tóxicos a esses animais;
- Avaliar alterações metabólicas por meio das dosagens séricas de glicemia e da mensuração do peso e quantificação dos pesos dos tecidos (fígado e pâncreas) e das gorduras (epididimal, retroperitoneal e marrom);
- Avaliar o consumo alimentar dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e dieta padrão;
- Avaliar através da técnica de PCR-RT, os filo *Bacteróide*, *Firmicutes*, *Actinobacterias* e *Proteobacterias*, nas fezes dos camundongos após o tratamento;
- Avaliar a resistência à insulina pelo Teste de Tolerância à Glicose (GTT), Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT) e dosagem sérica de insulina nos diferentes grupos do estudo;
- Correlacionar a suplementação de resveratrol, com as Bactérias presentes nas fezes dos ratos com resistência insulínica e controle;
- Avaliar a histologia dos tecidos extraído: fígado, pâncreas, intestino grosso e delgado;

- Avaliar o perfil lipídico pela através das concentrações séricas de colesterol total e triglicérides.

Estudo 1

5. Estudo 1: Padronização do modelo de dieta hiperlipídica induzindo a Resistência a Insulina

5.1 Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (protocolo número 003/2016-1), seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional e de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Trata-se de estudo experimental, longitudinal, prospectivo, randomizado de abordagem quantitativa.

5.1.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos C57BL/6 (18 a 20g) provenientes do Biotério Central USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de 5, em caixas de acrílico pequenas (41 x 34 x 16 cm), no biotério do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em condições controladas: temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), sem privação de alimento e água.

Todos os animais foram mantidos no biotério do departamento passaram por duas semanas de adaptação recebendo dieta padrão (Nuvilab CR1) e mais duas semanas para se adaptarem as dietas hiperlipídicas, para então dar início aos experimentos com duração de oito semanas (Figura 3). A maravalha dos animais foi trocada a cada três dias, preferencialmente entre as 7:00 e 10:00h.

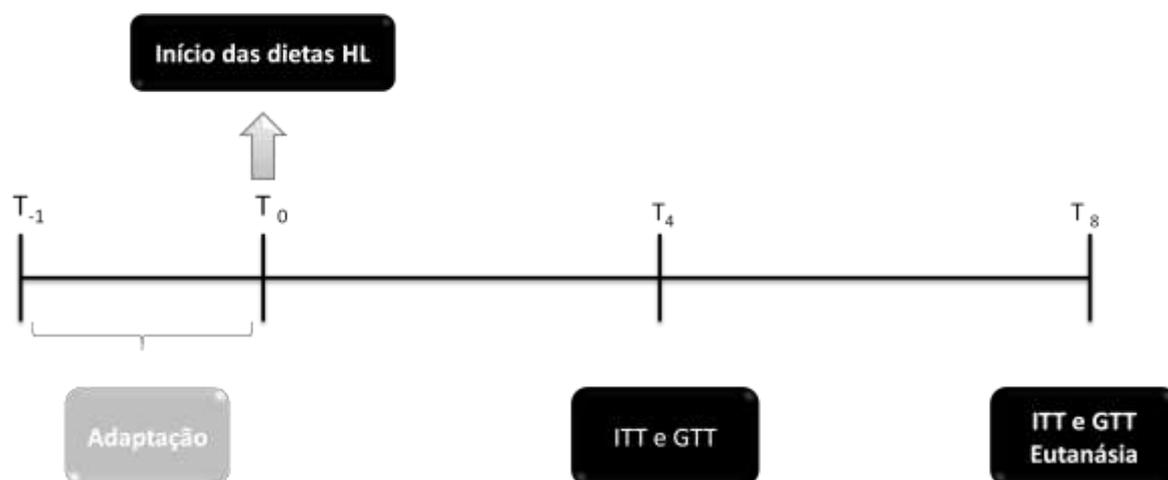


Figura 3 – Delineamento do estudo 1.

Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo denominados: CTR - grupo dieta padrão, HLHG – grupo dieta hiperlipídica e hiperglicídica, HL45 – grupo dieta hiperlipídica 45% e HL60 - grupo dieta hiperlipídica 60%.

Todos os animais foram escolhidos de forma randomizada a integrar cada um dos grupos do estudo e todos os cuidados foram tomados para que o sofrimento destes fosse reduzido.

5.1.2 Eutanásia Animais

Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram coletadas amostras de tecido hepático, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo marrom e pâncreas, os quais foram pesados e imediatamente mantidos em nitrogênio líquido até o término da eutanásia, quando foram conservados em freezer -70°C. Fragmentos de tecido hepático e pancreático foram separados para análise histológica.

5.1.3 Dieta

A ração comercial Nuvilab CR1 foi utilizada como dieta padrão, baseada na recomendação pelo *American Institute of Nutrition*, AIN-93, para roedores em crescimento.

As dietas hiperlipídicas foram desenvolvidas pelo próprio grupo, tendo como base a ração padrão cujas composições estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas.

Ingredientes	CTR (Padrão)*		HLHG**		HL 45**		HL 60**	
	g/100g	Kcal	g/100g	Kcal	g/100g	Kcal	g/100g	Kcal
Nuvilab CR1 Feed	100,0	269,7	36,4	98,2	34,2	92,2	58,4	157,5
Frutose PA	0,0	0	36,4	145,44	8,6	34,2	8,9	35,4
Banha de proco	0,0	0	18,2	163,8	8,6	77,4	17,7	159,3
Óleo de soja	0,0	0	9,1	81,9	14,5	130,5	15,0	135
Leite em pó	0,0	0	0,0	0	34,2	166,9	0,0	0
Hidroxitolueno butilado (BHT)	0,0	0	0,04	0	0,04	0	0,04	0
Total	100	269,7	100	489,34	100	501,2	100	487,2

A composição nutricional da dieta padrão e das hiperlipídicas, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição Nutricional das dietas (g/100g).

	Padrão*	HF 45**	HF 60**	HFHG **
Carboidrato	57,8g (62,5%)	48,47g (34,5%)	35,83g (28,5%)	57,18g (44%)
Lipídeos	4,9g (25,5%)	31,85g (50%)	33,52g (60%)	28,71g (49,8%)
Proteínas	23,6g (12%)	20,37g (14,5%)	14,45g (11,5%)	8,04g (6,2%)
Energia (Kcal/g)	269,7	562	502,9	518,9

* Padrão. Fonte: Nuvilab

** Hiperlipídicas. Calculada a partir da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - Taco Versão 4

5.1.4 Procedimentos experimentais

5.1.4.1 Avaliação Ponderal

Os animais foram acompanhados por 12 semanas com medidas de peso pré-tratamento e a cada semana. A balança utilizada foi digital com capacidade máxima para 15 kg (Filizola S. A., São Paulo, Brasil). O percentual do ganho de peso foi calculado a partir da diferença entre o peso final (PF) e inicial (PI). Para o cálculo da porcentagem de perda de peso utilizou-se a equação:

$$\frac{[(\textit{peso final} - \textit{peso inicial})] \times 100}{\textit{peso inicial}}$$

5.1.4.2 Consumo alimentar

A dieta ofertada diariamente, era fracionada em pequenas porções pesadas e acondicionadas em comedouros específicos. A sobra dos comedouros foi pesada afim de ser calculada a quantidade final de alimentos ingeridos. A água e comida eram verificadas diariamente e trocadas 2 vezes na semana.

5.1.4.3 Eficiência Energética

A eficiência energética foi calculada pela razão entre o ganho de peso corporal (g) e o consumo energético (Kcal), sendo os dados obtidos expressos em g/Kcal, (NERY et al, 2011).

5.1.4.4 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Foi realizado o Teste de Tolerância a Glicose (GTT), após jejum de 10 a 12 horas, sendo feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio de corte na extremidade caudal do animal, logo a seguir foi administrada via intraperitoneal, uma solução de glicose na dose de 1mg/g peso do animal segundo protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0', 30', 60' e 120'. As concentrações de glicose foram determinadas através de glicosímetro *Accu-Chek®* (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

5.1.4.5 Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT)

Após quarenta e oito horas da realização do GTT, foi efetuado o Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT), após jejum de 6 horas, quando foi feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio de corte na extremidade caudal do animal, logo a seguir foi administrada via intraperitoneal, uma solução de insulina na dose de 2UI diluída em 10 ml de soro fisiológico. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0', 30', 60' e 120'. As

concentrações de glicose sanguínea foram determinadas através de glicosímetro *Accu-Chek®* (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

5.1.4.6 Análise Imuno-Histológica

As secções de tecido fixadas com formalina e embebidas em parafina foram cortadas com uma espessura de 5 μm e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. As preparações foram avaliadas, com as identificações não reveladas, por um patologista experiente através de microscopia óptica, o qual estimou a intensidade de esteatose hepática, balonização hepatocelular e sua localização no ácino hepático. A análise foi realizada em 10 campos de maior aumento escolhidos aleatoriamente (ampliação x400) em cada lâmina. A classificação da gravidade das alterações histológicas foi a seguinte: ausência de alterações, alterações leves, alterações moderadas e alterações graves.

5.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando os softwares Graphpad Prism 5.1 e SPSS *Statistics 21.0* para confecção de gráfico e a realização de testes estatísticos.

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A normalidade e homoscedasticidade dos modelos foram verificadas por análise gráfica. Todas as variáveis não apresentaram distribuição normal, sendo então avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pos-test de Mann-Whitney. O nível de significância admitido foi de 0,05 em todos o casos.

5.3 Resultados

5.3.1 Evolução do Peso Corporal, Ganho de Peso e Glicemia Capilar

A tabela 3 mostra os valores médios e desvios-padrão das variáveis metabólicas, dos diferentes grupos estudados na primeira fase, ao final de 12 semanas de estudo.

Tabela 3. Perfil do ganho de peso corporal, peso dos tecidos e das variáveis metabólicas nos grupos CTR, HL 45, HL 60 e HLHG (valores expressos em média e desvios-padrão).

	CTR	HL 45	HL 60	HLHG
Ganho de peso (g)	8,2±1,3	21,2±7,4	24,6±5,3	13,8±3,6
Consumo alimentar (g)	25,3±3,98	20,5±9,64	20,0±5,03	23,2±5,52
Glicose final (mg/dl)	171±32,3	146±31,7	224±17,1	114±28,2
Fígado (g/g peso)	3,94±0,48	3,13±0,56	3,33±0,58	3,57±0,36
Pâncreas (g/g peso)	0,44±0,07	0,29±0,11	0,36±0,07	0,43±0,07
Gord. Epididimal (g/g peso)	1,46±0,70	4,4±0,90	5,52±1,29	4,04±1,44
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	0,22±0,15	1,18±0,20	1,35±0,56	1,10±0,57
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,22±0,06	0,06±0,01	0,21±0,06	0,25±0,89

A avaliação inicial e final do perfil de peso corporal esta representada na Tabela 4.

Com relação ao perfil de peso corporal no início e ao final das 12 semanas de estudo, foi encontrada diferença significativa quando compara o peso final dos grupos em relação ao peso inicial ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores iniciais e finais dos peso corporal, expressos em média ± DP, nos grupos CTR, HL 45%, HL 60% e HLHG (média ± DP).

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)*
CTR	19 ± 1,73	32,8 ± 4,08
HL 45	18,8 ± 0,83	40 ± 8,15
HL 60	19,2 ± 1,30	43,8 ± 19,2
HLHG	18,7 ± 1	29,2 ± 2,04
p valor	0,07	0,01**

* Mann-Whitney do peso final entre os grupos. ** Mann-Whitney do peso final comparado ao peso inicial.

O ganho de peso dos animais quando comparado entre os diferentes grupos controle (CTR), Hiperlipídico 45% (HL 45), Hiperlipídico 60% (HL 60) e Hiperlipídica e hiperglicídica (HLHG), mostra que todos obtiveram um crescimento significativo, representados na Figura 4. Kruskal-Wallis: $p = 0,008$

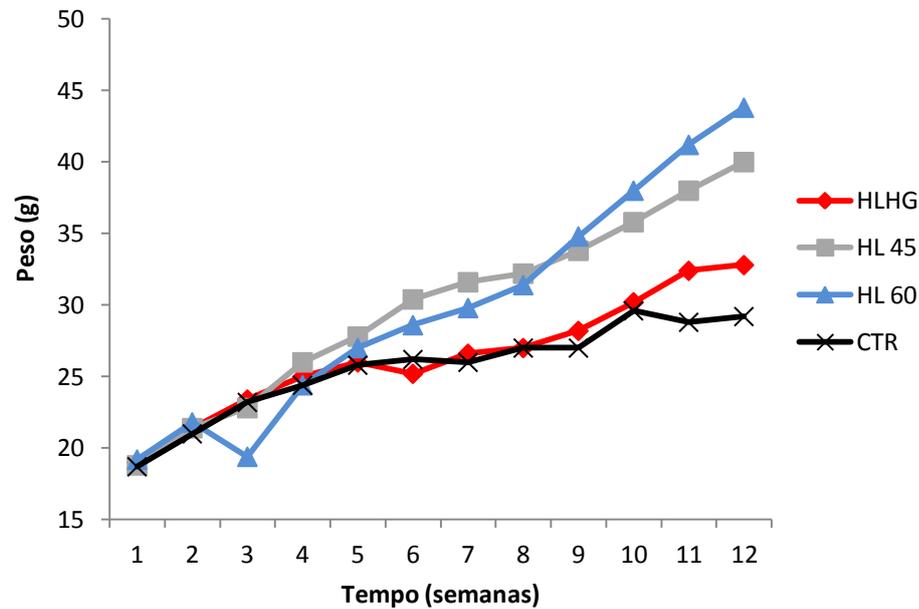


Figura 4. Evolução do ganho de peso dos animais nos diferentes grupos (média \pm DP).

Em relação ao ganho de peso corporal total ao longo das 12 semanas de intervenção, mostrou-se diferença entre os grupos. Sendo que CTR foi diferentes estatisticamente dos grupos HL45 e HL60, respectivamente 0,032 e 0,008 . Assim como HF60% vs HFHG também apresentaram diferença estatística p valor 0,016 . Quando avaliamos HF45% vs HFHG nota-se uma tendência a ao grupo hiperlipídico a ter um maior peso já que seu p valor é 0,056.

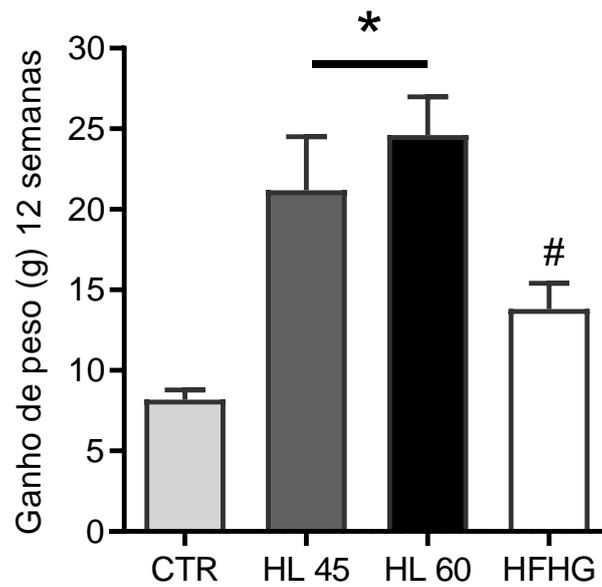


Figura 5. Ganho de peso corporal total entre os grupos CTR, HL 45, HL e HLHG (média \pm DP).

5.3.2 Peso dos Órgãos e Tecidos

Na Figura 6 podemos observar o peso dos tecidos hepáticos e pancreático, gordura epididimal, tecidos adiposo marrom e gordura retroperitoneal, coletados na eutanásia dos animais. O peso dos tecidos foi corrigido pelo peso corpóreo total de cada animal e os valores representados na mesma figura.

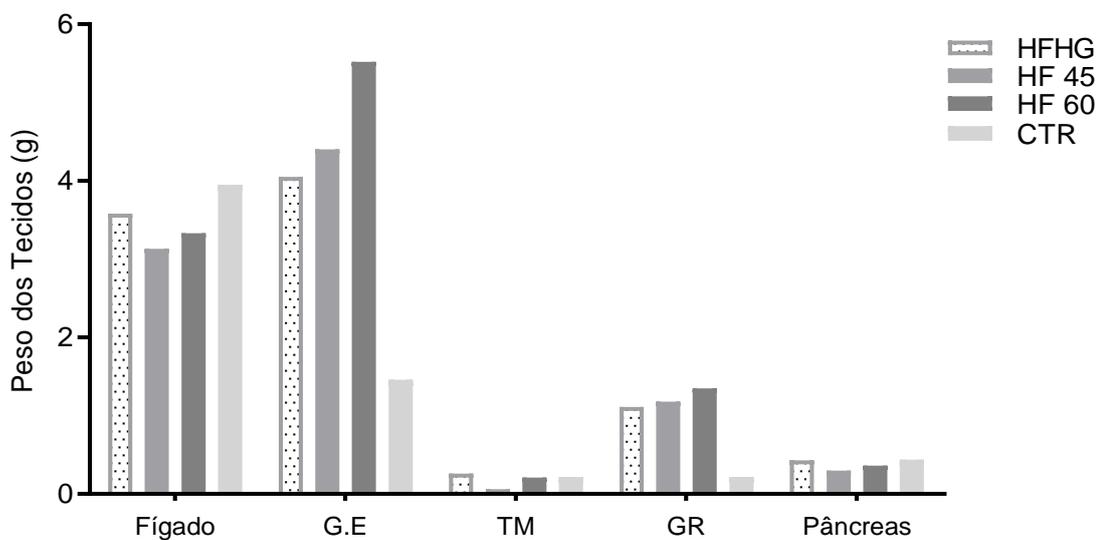


Figura 6. Peso dos tecidos coletados na eutanásia, corrigidos pelo peso corporal (média \pm DP), dos grupos , HL 45, HL 60 e HLHG (média \pm DP).

Em relação ao peso do tecido hepático (fígado), podemos observar peso maior no grupo CTR quando comparado ao demais grupo, porém este não foi estatisticamente significativo (Figura 6 e Tabela 8). Quando pareado o peso do fígado do grupo CTR e HL 45L, houve diferença estatística significativa, $p=0,032$ (Figura 7 e Tabela 9). Assim como o tecido hepático, o tecido pancreático não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,051$), conforme Figura 8 e Tabela 8. Mas quando pareado o peso corrigido do pâncreas do grupo CTR e HL 45%, houve diferença estatística significativa, $p=0,032$ (Figura 8 e Tabela 9).

Nota-se que tanto a gordura retroperitoneal, gordura epididimal e tecido adiposo marrom apresentaram diferença estatística entre os grupo, $p=0,013$, $p=0,009$ e $p=0,011$ respectivamente. Dessa forma encontramos diferenças na gordura retroperitoneal entre o grupo CTR com os grupos restante (HLHG, HL 45 e HF 60) sendo seus níveis de significância iguais a $p=0,008$, demonstrado na Figura 9 e Tabela 6, 7 e 8.

O peso da gordura epididimal após o pos-test de Mann-Whitney encontrou-se diferença estatística com $p=0,008$ no seguintes grupos: CTR e HL45 e CTR e HL60, já entre CTR e HLHG localizou-se o valor de p de 0,016, representados na Figura 10, Tabela 6,10 e 11.

Já o tecido adiposo marrom apresentou diferença estatística significativa ($p=0,008$) nos grupos CTR e HL45L, HL60 e HL45, e HL45 e HLHG (Figura 11 e tabelas 6,9 e 10).

Na tabela 5, são rerepresentados e comparados os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais estudados CTR, HL45, HL60 e HLHG.

Tabela 5. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais.

	CTR	HL 45	HL 60	HLHG	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,94 \pm 0,48	3,13 \pm 0,56	3,32 \pm 0,58	3,57 \pm 0,36	0,103
Gord. Epididimal (g/g peso)	1,04 \pm 0,70	4,40 \pm 0,90	5,5 \pm 1,29	4,04 \pm 1,43	0,009*
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,22 \pm 0,68	0,06 \pm 0,13	0,21 \pm 0,06	0,26 \pm 0,89	0,011*
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	0,22 \pm 0,15	1,18 \pm 0,20	1,35 \pm 0,64	1,10 \pm 0,57	0,013*
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,44 \pm 0,07	0,29 \pm 0,11	0,36 \pm 0,07	0,43 \pm 0,69	0,051

* Kruskal-Wallis $p < 0,05$

Na tabela 6, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais CTR e HF45%.

Tabela 6. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais CTR e HL45.

	CTR	HL45	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,94 \pm 0,48	3,13 \pm 0,56	0,032*
Gord. Epididimal (g/g peso)	1,04 \pm 0,70	4,40 \pm 0,90	0,008*
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,22 \pm 0,68	0,06 \pm 0,13	0,008*
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	0,22 \pm 0,15	1,18 \pm 0,20	0,008*
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,44 \pm 0,07	0,29 \pm 0,11	0,032*

* Mann-Whitney $p < 0,05$

Na tabela 7, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais CTR e HL60.

Tabela 7. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais CTR e HL60.

	CTR	HL60	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,94 \pm 0,48	3,32 \pm 0,58	0,095
Gord. Epididimal (g/g peso)	1,04 \pm 0,70	5,5 \pm 1,29	0,008*
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,22 \pm 0,68	0,21 \pm 0,06	0,841
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	0,22 \pm 0,15	1,35 \pm 0,64	0,008*
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,44 \pm 0,07	0,36 \pm 0,07	0,095

* Mann-Whitney $p < 0,05$

Na tabela 8, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais CTR e HLHG.

Tabela 8. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais CTR e HLHG.

	CTR	HLHG	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,94 \pm 0,48	3,57 \pm 0,36	0,222
Gord. Epididimal (g/g peso)	1,04 \pm 0,70	4,04 \pm 1,43	0,016*
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,22 \pm 0,68	0,26 \pm 0,89	0,690
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	0,22 \pm 0,15	1,10 \pm 0,57	0,008*
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,44 \pm 0,07	0,43 \pm 0,69	0,841

* Mann-Whitney $p < 0,05$

Na tabela 9, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais HL60 e HL45.

Tabela 9. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais HL60 e HL45.

	HL60	HL45	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,32 \pm 0,58	3,13 \pm 0,56	1
Gord. Epididimal (g/g peso)	5,5 \pm 1,29	4,40 \pm 0,90	0,151
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,21 \pm 0,06	0,06 \pm 0,13	0,008*
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	1,35 \pm 0,64	1,18 \pm 0,20	0,690
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,36 \pm 0,07	0,29 \pm 0,11	0,056

* Mann-Whitney $p < 0,05$

Na tabela 10, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais HL45 e HLHG.

Tabela 10. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais HL45 e HLHG.

	HL45	HLHG	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,13 \pm 0,56	3,57 \pm 0,36	0,310
Gord. Epididimal (g/g peso)	4,40 \pm 0,90	4,04 \pm 1,43	1
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,06 \pm 0,13	0,26 \pm 0,89	0,008*
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	1,18 \pm 0,20	1,10 \pm 0,57	0,690
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,29 \pm 0,11	0,43 \pm 0,69	0,056

* Mann-Whitney $p < 0,05$

Na tabela 11, são rerepresentados e comparados, através do teste de Mann-Whitney, os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais HL60 e HLHG.

Tabela 11. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais HL60 e HLHG.

	HL60	HLHG	p valor
Tec. Hepático (g/g peso)	3,32 \pm 0,58	3,57 \pm 0,36	0,310
Gord. Epididimal (g/g peso)	5,5 \pm 1,29	4,04 \pm 1,43	0,421
Tec. Adiposo Marrom (g/g peso)	0,21 \pm 0,06	0,26 \pm 0,89	0,421
Gord. Retroperitoneal (g/g peso)	1,35 \pm 0,64	1,10 \pm 0,57	0,548
Tecido Pancreático (g/g peso)	0,36 \pm 0,07	0,43 \pm 0,69	0,151

* Mann-Whitney $p < 0,05$

5.3.3 Consumo alimentar e Eficiência energética

O consumo em gramas e em kcal dos grupos com dieta hiperlipídica foi maior comparado ao CTR. Por outro lado o HL 60 apresentou maior consumo em gramas e kcal quando comparado ao HLHG. A eficiência energética também foi significativa maior no HL 60 comparado ao CTR e HLHG (Tabela 12).

Tabela 12. Consumo alimentar e eficiência energética obtidos para camundongos alimentados com dieta padrão (CTR), hiperlipídica e hiperglicídica (HLHG), hiperlipídica 45% (HL45) ou hiperlipídica 60% (HL60)

Grupo	CTR	HLHG	HL 45	HL 60
Consumo total (g)	202 ± 2	186 ± 14*	164 ± 23*	160 ± 9*#
Consumo total (kcal)	546 ± 6	910 ± 62*	824 ± 117*	778 ± 42*#
Eficiência energética (g/kcal x 10 ⁻²)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,6	1,7 ± 2,3	2,5 ± 0,6*#

*diferente de CTR

diferente de HFHG

+diferente de HF45.

Os dados são média ± DP, Teste de Mann-Whitney (p<0,05)

5.3.4 Análise do Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado na 4 semana antes do início da intervenção e 24 horas antes da eutanásia dos animais (12 semanas), após jejum prévio de 8 horas. A glicemia basal dos foi diferente estatisticamente (p<0,05) para o GTT realizado em 4 semanas para CTR vs HL45, HL45 vs HLHG e HL45 vs HL60 (Figura 11B). No tempo 60 minutos encontramos diferença entre CTR vs HL45, CTR e HL60 e HL60 e HLHG. Ao final da oitava semana de intervenção encontro-se diferença entre CTR vs HLHG, CTR vs HL60 e HL60 vs HL45 na glicemia basal. No entanto ainda na oitava semana nota-se que houve uma piora na tolerância à glicose no tempo 60 minutos na dieta hiperlipídica 45% e hiperlipídica 60%, como é demonstrado na Figura 11D. (test Mann-Whitney p<0.05 CTR vs HL45 e CTR vs HF60).

A partir da curva do GTT é possível calcular a área sob a curva (AUC, *area under curve*) para representar o grau de intolerância à glicose. A partir da curva formada pelo teste é traçada uma reta do ponto de glicemia basal ao ponto da glicemia final (tempo 120) e calculada a área sob a curva. Quanto mais rápido a curva voltar aos valores basais, menos será a AUC e maior sensibilidade à insulina apresenta o indivíduo. Ou seja, quanto menor a AUC, mais tolerante, e quanto maior a AUC, mais intolerante á glicose esse será. O grau de intolerância à glicose esta fortemente relacionado com o aumento da resistência à insulina. Pode-se constatar nos período de 4 semanas (Figura 7A) uma maior AUC no Grupo HL60 quando comparado ao grupo CTR e HLHG . Já na semana 8 encontrou-se uma diferença significativa quando comparou-se HL60 com os demais grupos, e HL45 com CTR, não havendo diferenças entre os demais grupos, conforme representado na Figura 7 C.

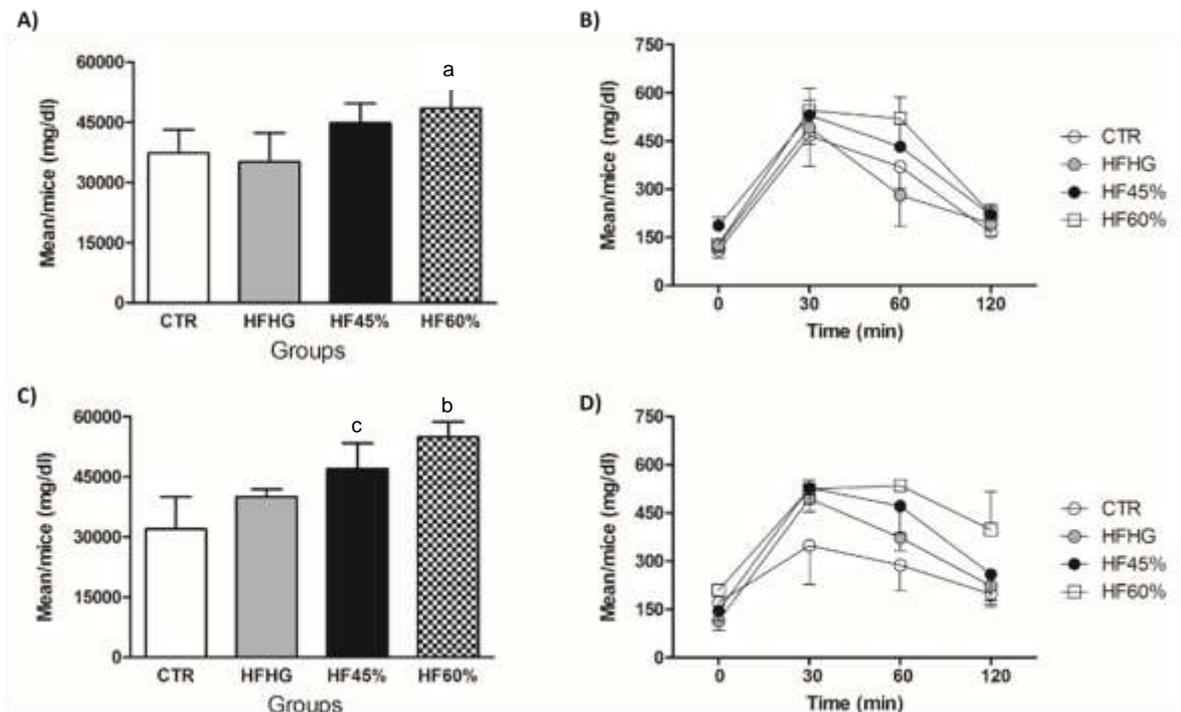


Figura 7 . Teste de tolerância à glicose (GTT), mensurando a glicemia nos tempo 0 (basal),30,60 e 120 minutos após a injeção de glicose à 50% (1mg/g de peso) intraperitoneal, representando pelas curvas glicêmicas ao longo do tempo de cada grupo. A Figura 11B e C representa a área sob a curva (AUC) a partir da curva glicêmica (mg/dl) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizada após 12 semanas das diferentes dieta. A Figura 11 A e C representa a variação da média \pm desvio padrão da curva de GTT realizado na quarta semana de início de dieta. P valor $<0,05$ para CTR vs HF 60%, HFHG vs HF 45% e HFHG vs HF60%. Kruskal-Wallis $p=0,46$.

Para avaliar a sensibilidade à insulina, foi realizado o teste de sensibilidade insulínica (ITT) 4 semana antes do início da intervenção e 48 horas antes da eutanásia dos animais, após jejum prévio de 6 horas (Figura 8A e 8C). Este teste demonstrou maiores níveis glicêmicos médios no grupo HL60 (14478 ± 1273 na 4 semana e 17426 ± 4555 na oitava semana) somente no tempo basal na semana 4 e no tempo final no tempo final na semana 8 , como é demonstrado na Figura 12A e 12C, o que sugere uma menor sensibilidade à insulina causada pela adição de lipídios a dieta na proporção de 60%. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 8B e 8D, observando-se, então um aumento significativo da AUC quando comparamos o HL60 ao grupo HL45 (17426 ± 4555 vs 11377 ± 2733) p valor 0,02.

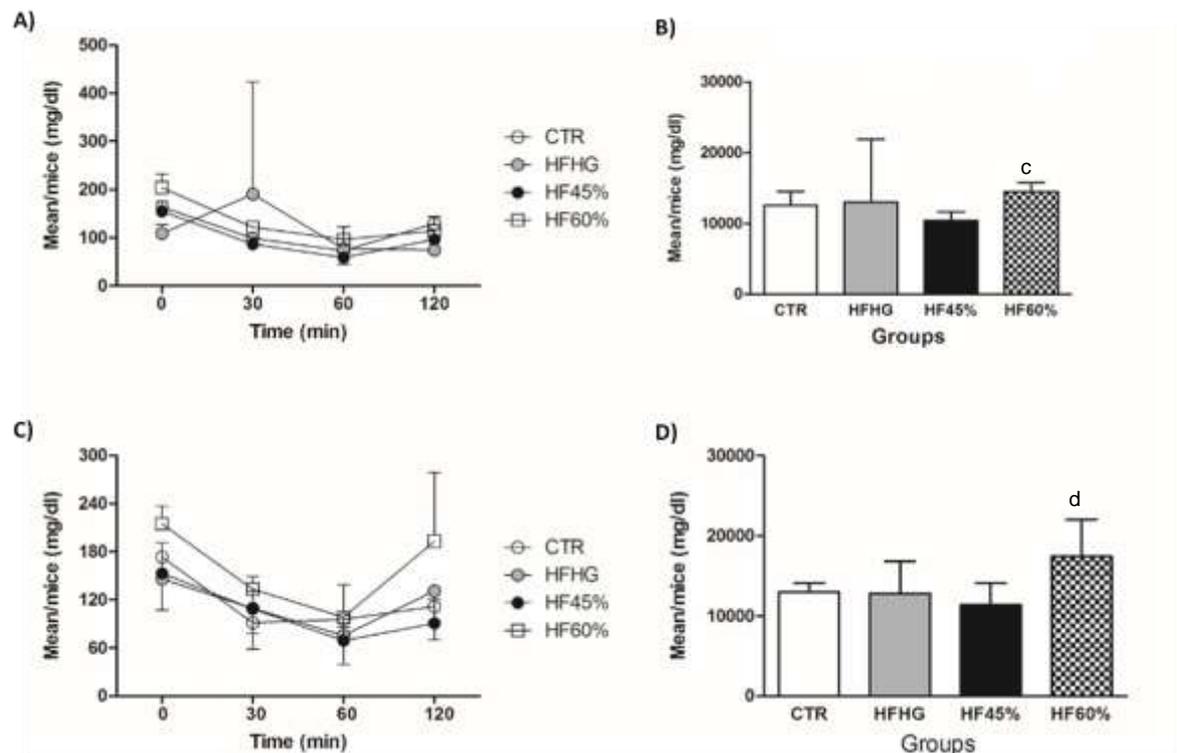


Figura 8. Teste de tolerância à insulina (ITT), mensurando a glicemia nos tempo 0 (basal), 30,60 e 120 minutos após a injeção de insulina intraperitoneal na dose de 0,75UI/Kg, e representando pelas curvas glicêmicas ao longo do tempo de cada grupo. A Figura 12A e C representa a variação da média \pm desvio padrão da curva de ITT. A Figura 12B e D representa a área sob a curva (AUC) a partir da curva glicêmica (mg/dl) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizada após 12 semanas das diferentes dieta. Kruskal-Wallis $p=0,039$

5.3.5 Imuno-Histologia

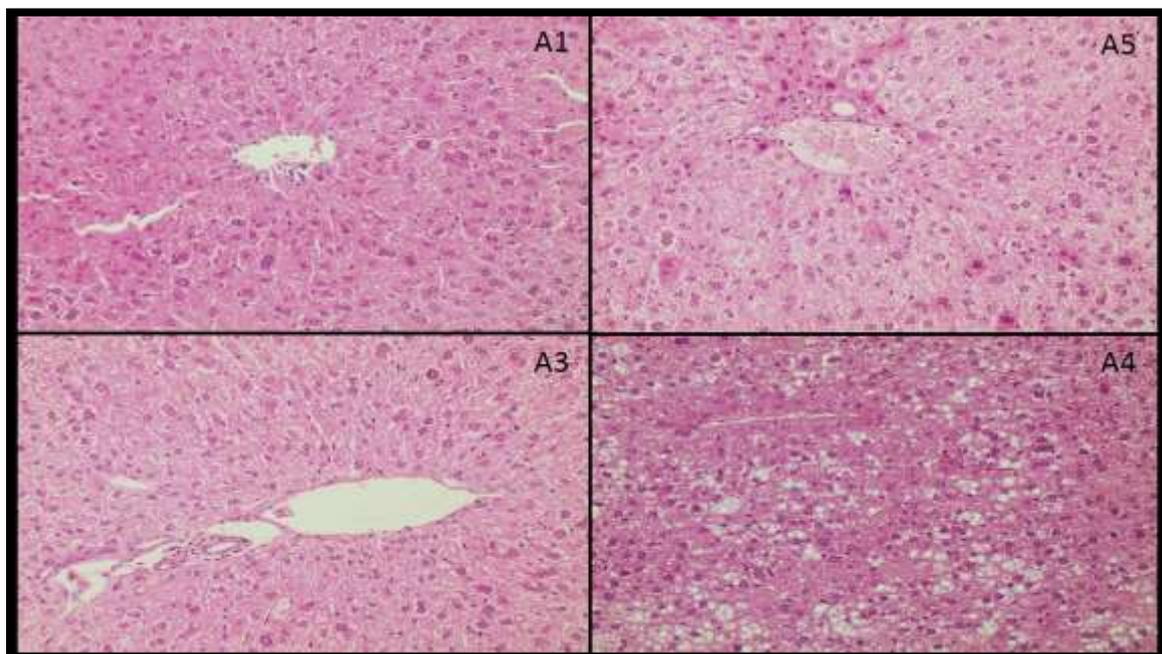


Figura 9. Corte de Fígado com ampliação de 40x. Sendo A1, A2, A3 e A4 pertencentes aos grupos: CTR, HLHG, HL45 e HL60 respectivamente.

Através da figura 4 acima é possível notar no quadro A4, a qual se refere ao fígado dos animais tratados com dieta HL60, os hepatócitos com citoplasmas ocupados por grandes vacúolos claros que deslocam os núcleos para a periferia da célula.

Já nas figura 5 são mostrados cortes de tecido pancreático, sendo visível na imagem A4 a hipertrofia das ilhotas pancreáticas dos animais alimentados com dieta HL60.

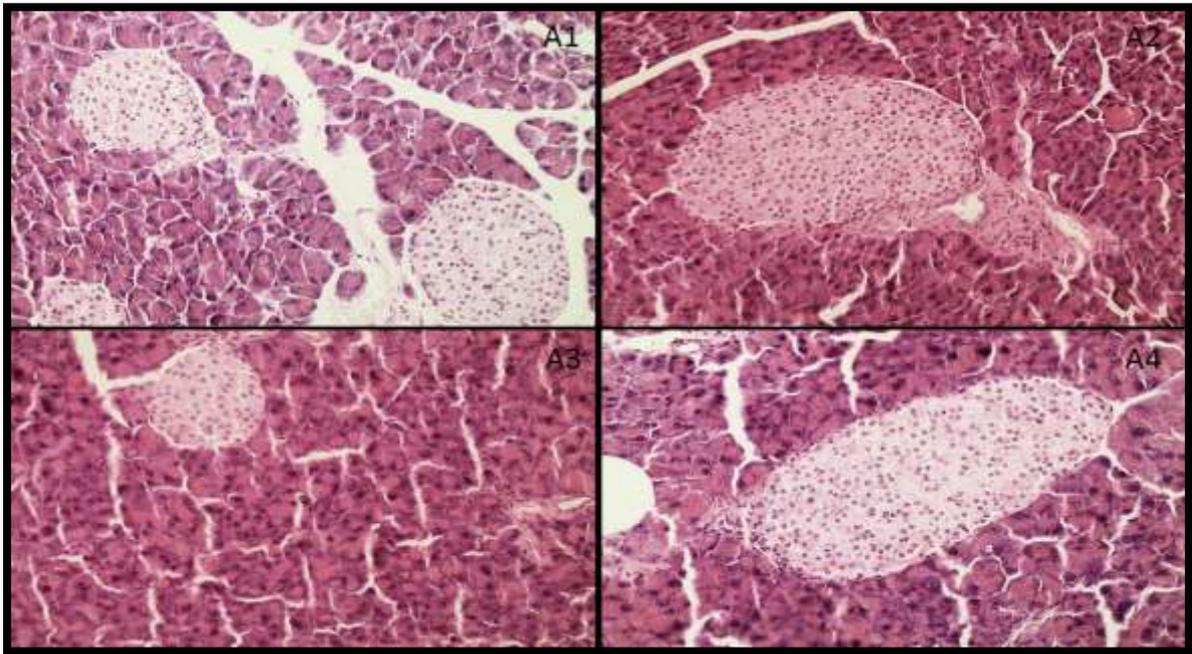


Figura 10. Corte do Pâncreas com ampliação de 40x. Sendo A1, A2, A3 e A4 pertencentes aos grupos: CTR, HLHG, HL45 e HL60 respectivamente.

5.4 Discussão

Nesse primeiro estudo foi avaliado o efeito de dietas hiperlipídica em diferentes concentrações no metabolismo de camundongos C57BL/6 adulto-jovens, sendo analisado: peso dos animais, peso dos órgãos, consumo alimentar e parâmetros bioquímicos.

É sabido que a transição nutricional é um fator determinante para o surgimento do sobrepeso e da obesidade, pois com a industrialização, a urbanização e a entrada da mulher no mercado de trabalho, ocorreu o fornecimento de dietas com alta densidade energética e a diminuição da atividade física, surgindo um novo estilo de vida, os quais chamaram de contemporâneo (ALMEIDA; NASCIMENTO; LAUS, 2013; DISHCHEKENIAN e cols. 2011; TARDIVO; FALCÃO, 2006).

A resistência à insulina é uma condição, genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e gordurosas. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina e, portanto, a situação de resistência à insulina se acompanha de hiperinsulinemia. Mais ainda, nesta situação não se observam alterações nas demais funções da insulina

Dietas com altas concentrações lipídicas são algumas das principais causas de obesidade e da RI, pois a gordura é altamente consumida por ser muito palatável, o que pode ser demonstrado em experiências feitas com animais de laboratórios (ESTADELLA e cols., 2004).

Em nosso estudo, embora o consumo calórico tenha sido semelhante para os grupos avaliados, observamos que os animais do grupos HF 45% e HF60% apresentaram ganho de peso significativo quando comparado ao grupo CTR, diferindo de Almeida et al, que observaram que ao final de 8 semanas, o ganho de peso dos animais do grupo alimentado com Dieta Hiper calórica (ração comercial, leite condensado e óleo de milho) não diferiu estatisticamente daquele grupo alimentado com ração comercial (ALMEIDA et al., 2010). Pastore et al não observaram diferença estatística do ganho de peso dos ratos Wistar machos alimentados durante 12 semanas com dieta de cafeteria (ração comercial, bolacha de maisena, amendoim torrado e chocolate granulado) quando comparado ao grupo controle (PASTORE et al., 2010). Souza et al. ressaltam que os animais que recebem dieta hiper calórica nem sempre aumentam o peso corporal quando comparado aos animais do grupo controle, pois

segundo Polacow e Lancha Júnior ocorre uma diminuição no seu consumo diário alimentar, devido a alta densidade energética destas dietas de cafeteria, corroborando com nosso estudo que mostrou que o grupo HFHG, semelhante a dieta cafeteria (rica em glicídios e lipídios), não apresentou ganho de peso estatisticamente significativo ($p=0,421$). (SOUZA et al., 2001; POLACOW et al., 2007)

Ainda sobre o ganho de peso dos animais alimentados com dieta hiperlipídica podemos afirmar que esse ganho ocorreu em função do aumento deste macronutriente (lipídios) e não devido uma maior ingestão dietética. Duarte et al. constatou-se que mesmo sem alterar a quantidade diária de ração ingerida, a dieta hiperlipídica promoveu obesidade, fato que também observamos em nosso estudo (DUART et al., 2006). Segundo Estadella, descreveram que uma dieta hiperlipídica aumentou a taxa de leptina na circulação sistêmica dos animais. Um outro estudo de Fam e colaboradores mostrou que uma dieta hiperlipídica causou diminuição na sensibilidade da leptina. (ESTADELLA et al., 2004; FAM et al., 2006)

Esses dados podem ajudar a explicar os nossos resultados, pois uma reduzida sensibilidade à Leptina, mesmo com níveis maiores desse hormônio poderiam justificar o 20 ganho de peso dos animais, tendo em vista que as ações da leptina é a indução dos mediadores anorexígenos tais como pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela afetamina e cocaína (CART), os quais inibem os mediadores orexígenos como Neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), causando a indução do gasto energético com processos metabólicos “fúteis”, como a geração de calor via termogenia ou proteína desacopladora e a diminuição do consumo de alimento (LEHNINGER, 2006, p. 703-708). Assim, com menor atividade de leptina, possivelmente devido a uma falha nessas vias reguladoras o comportamento da alimentação não seria reduzido proporcionalmente ao aumento do tecido adiposo, como usualmente acontece em condições normais. Outro fator de grande importância que também pode contribuir para maior adiposidade, independentemente de uma maior ingestão calórica, é o tipo de gordura utilizada na composição da dieta. De acordo com Buettner e cols., as gorduras saturada e monoinsaturada são capazes de promover, de forma mais pronunciada, obesidade e resistência à insulina quando comparadas à gordura poli-insaturada, sendo estas capazes de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado. Esses autores afirmam ainda que, entre as gorduras utilizadas em seu trabalho, a banha de porco (mistura de gordura saturada e monoinsaturada) certamente é a mais recomendada para a geração de um modelo válido de roedor obeso com alterações metabólicas. (BUETTNER et al., 2006)

Em acordo com esses autores, nosso estudo apresenta o mesmo tipo de gordura utilizado para composição da dieta hiperlipídica. Esses dados sugerem que o maior ganho de peso e de tecido adiposo nos animais que se alimentaram da dieta hiperlipídica tenha sido em função da maior densidade energética da ração e do tipo de gordura utilizada, e não em função de uma provável hiperfagia, como já descrito previamente por outros autores a exemplo de Ramirez e colaboradores, Worwick e Hariri e Thibault (RAMIREZ et al.,1989; WORWICK,1996; e HARIRI e THIBAUT, 2010).

Após o período de administração das dietas hiperlipídica, observou-se um aumento significativo da glicemia de jejum, em comparação aos animais que receberam a dieta controle. A literatura ainda apresenta resultados divergentes. McDonald e colaboradores, utilizando fêmeas wistar, não observaram diferença na glicemia de jejum entre os grupos por eles analisados. Em seu estudo, foi ofertada uma dieta hipercalórica rica em lipídio (41% da energia total) por um longo período, identificando-se apenas um aumento gradual ao comparar diferentes momentos do experimento (7, 26, 39 semanas). Entretanto, tais autores também ressaltam que mesmo não havendo diferença significativa do peso corporal entre os distintos grupos, houve modificações nos compartimentos de gordura, sendo este um fator de risco para desenvolvimento de distúrbios metabólicos. (MACDONALD et al., 2011)

Já Fujimoto et al, utilizando machos Sprague-Dawley, encontraram valores de glicemia de jejum e de insulina superiores nos animais que foram submetidos a 77 dias de indução da resistência à insulina através da dieta hiperlipídica. Estes autores também determinaram a área sob a curva da glicose, onde foi maior nos animais alimentados com a dieta rica em lipídio, em relação aos animais que receberam dieta padrão, apresentando características de intolerância a glicose, analisada através do TOTG, confirmando os resultados que encontramos em nosso estudo, o qual apresentou AUC maior para as dietas hiperlipídicas, mas com significância somente entre as dietas HF45% e HF60%.

O aumento da glicemia no nosso estudo pode ser explicado pelo fato de que os ácidos graxos, combustível essencial da célula beta no estado normal, também se tornam tóxicos à célula beta quando presentes cronicamente em níveis elevados. A exposição prolongada das células β aos ácidos graxos aumenta a secreção basal de insulina inibindo, porém, a secreção de insulina estimulada pela glicose. A lipotoxicidade é mediada provavelmente pelo acúmulo de um sinal citosólico derivado da via de esterificação do ácido graxo. Os ácidos graxos inibem a expressão do gene da insulina na presença de níveis elevados de glicose, em parte devido à regulação negativa do fator de transcrição pancreático duodenal homeobox-1. Ácidos graxos

em excesso também levam a morte da célula β por apoptose tanto in vivo como in vitro (DONATH e SHOELSON, 2011)

Estudo 2

6. Estudo 2: Padronização do modelo dose-resposta do suplemento Resveratrol

6.1 Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (protocolo número 003/2016-1), seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional e de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Trata-se de estudo experimental, longitudinal, prospectivo, randomizado de abordagem quantitativa.

6.1.1 Animais

Foram utilizados 32 camundongos C57BL/6 (18 a 20g) provenientes do Biotério Central USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de 4, em caixas de acrílico pequenas (41 x 34 x 16 cm), no biotério do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em condições controladas: temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), sem privação de alimento e água.

Todos os animais foram mantidos no biotério do departamento passaram por duas semanas de adaptação recebendo dieta padrão (Nuvilab CR1) e mais duas semanas para se adaptarem as dietas hiperlipídicas, para então dar início as quatro semanas de indução da resistência insulínica. Passadas essas semanas iniciou-se o experimento com duração de oito semanas, na qual os animais eram tratados com diferentes doses de resveratrol pelo método de gavagem (Figura 11). A qual era realizada diariamente sempre no período da manhã. A maravalha dos animais foi trocada a cada três dias, preferencialmente entre as 7:00 e 10:00h.

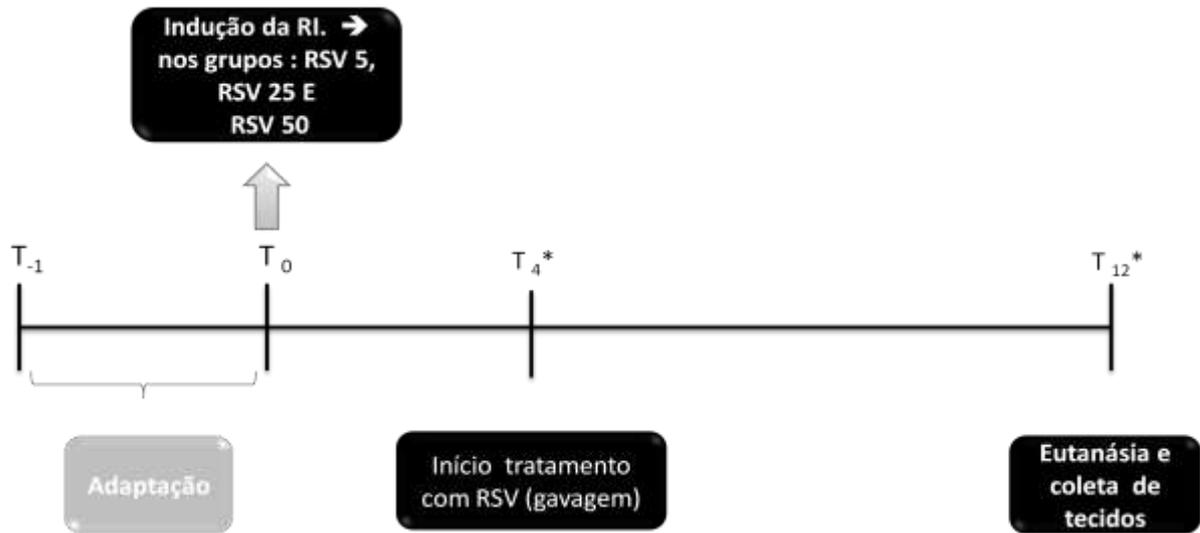


Figura 11 – Delineamento do estudo 2.

6.1.2 Eutanásia Animais

Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram coletadas amostras de tecido hepático, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo marrom e pâncreas, os quais foram pesados e imediatamente mantidos em nitrogênio líquido até o término da eutanásia, quando foram conservados em freezer -70°C . Fragmentos de tecido hepático e pancreático foram separados para análise histológica.

6.1.3 Suplementação

Resveratrol (RSV) = fitoterápico adquirido na forma de pó em Liane - Farmácia de manipulação com 98% de pureza. Este foi administrado em três diferentes dosagens 5 mg/Kg peso do animal, 25 mg/Kg peso do animal e 50 mg/Kg peso do animal. Após pesagem do RSV sendo posteriormente diluído em 1ml de solução salina 0,9%. Doses retiradas com base na literatura.

6.1.4 Procedimentos experimentais

5.1.4.1 Avaliação Ponderal

Os animais foram acompanhados por 12 semanas com medidas de peso pré-tratamento e a cada semana. A balança utilizada foi digital com capacidade máxima para 15 kg (Filizola S. A., São Paulo, Brasil). O percentual do ganho de peso foi calculado a partir da diferença entre o peso final (PF) e inicial (PI). Para o cálculo da porcentagem de perda de peso utilizou-se a equação:

$$\frac{[(\textit{peso final} - \textit{peso inicial})] \times 100}{\textit{peso inicial}}$$

6.4.4.2 Consumo alimentar

A dieta ofertada diariamente, era fracionada em pequenas porções pesadas e acondicionadas em comedouros específicos. A sobra dos comedouros foi pesada afim de ser calculada a quantidade final de alimentos ingeridos. A água e comida eram verificadas diariamente e trocadas 2 vezes na semana.

6.4.4.3 Eficiência Energética

A eficiência energética foi calculada pela razão entre o ganho de peso corporal (g) e o consumo energético (Kcal), sendo os dados obtidos expressos em g/Kcal, (NERY et al, 2011).

6.4.4.4 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Foi realizado o Teste de Tolerância a Glicose (GTT), após jejum de 10 a 12 horas, sendo feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio de corte na extremidade caudal do animal, logo a seguir foi administrada via intraperitoneal, uma solução de glicose na dose de

1mg/g peso do animal segundo protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0', 30', 60' e 120'. As concentrações de glicose foram determinadas através de glicosímetro *Accu-Chek*® (*Accu-chek Performa Roche*, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

6.1.4.5 Análise Imuno-Histológica

As secções de tecido fixadas com formalina e embebidas em parafina foram cortadas com uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. As preparações foram avaliadas, com as identificações não reveladas, por um patologista experiente através de microscopia óptica, o qual estimou a intensidade de esteatose hepática, balonização hepatocelular e sua localização no ácino hepático. A análise foi realizada em 10 campos de maior aumento escolhidos aleatoriamente (ampliação x400) em cada lâmina. A classificação da gravidade das alterações histológicas foi a seguinte: ausência de alterações, alterações leves, alterações moderadas e alterações graves.

6.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando os softwares Graphpad Prism 5.1 e SPSS *Statistics 21.0* para confecção de gráfico e a realização de testes estatísticos.

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Inicialmente foi feito o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos dados. As variáveis com distribuição normal foram avaliadas pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. As variáveis que não tinham distribuição normal foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. O nível de significância admitido foi de 0,05 em todos os casos.

6.3 Resultados

6.1 Evolução do Peso Corporal, Ganho de Peso e Glicemia Capilar

A Tabela 3 mostra os valores médios e desvios-padrão das variáveis metabólicas, dos diferentes grupos estudados ao final das 12 semanas de estudo.

Tabela 3. Perfil do ganho de peso corporal, peso dos tecidos e das variáveis metabólicas nos grupos C, CG, H e HG (valores expressos em média e desvios-padrão).

	C	CG	H	HG
Ganho de peso (g)	10,2±2,2	11±2,4	9,6±2,3	9,2±2
Consumo alimentar (g)	22,40±2,54	21,19±2,01	38,94±4,65	39,96±5,13
Eficiência alimentar (g/g)	0,11±0,06	0,12±0,11	0,07±0,04	0,05±0,05
Consumo energético (Kcal)	82,64±9,39	78,18±7,42	218,8±26,18	218,3±37,14
Eficiência energética (g/Kcal)	0,03±0,01	0,03±0,02	0,01±0,00	0,01±0,01
Glicose final (mg/dL)	109±31,9	139±15,8	137±22,3	137±35
Insulina (ng/mL)	0,52±0,10	0,27±0,18	0,32±0,17	0,21±0,06
Índice HOMA IR	4,25±0,7	2,75±3,1	3,22±2,9	1,83±0,8
Índice HOMA β	90,07	38,45	42,66	38,10
Fígado (g/g de peso)	3,82±0,17	3,84±0,25	4,38±0,58	4,17±0,32
Gordura Epididimal (g/g de peso)	0,93±0,18	0,66±0,28	0,82±0,43	0,84±0,43
Gordura Retroperitoneal (g/g de peso)	0,30±0,09	0,19±0,10	0,29±0,21	0,26±0,18
Tecido Adiposo Marrom (g/g de peso)	0,85±0,25	0,70±0,20	0,82±12	0,71±0,12
Colesterol Sérico Total (mg/dL)	118,1±16,2	112,5±16,3	126,0±36,8	129,0±21,8
Triglicerídeos Sérico (mg/dL)	151,4±30,9	109,0±34,1	88,0±26,1	96,2±13,8
HDL Sérico (mg/dL)	47,7±27,0	63,8±22,4	80,9±17,8	82,0±27,1

C=controle (dieta padrão); CG=controle (dieta padrão+gengibre); H=dieta hiperlipídica; HG=dieta hiperlipídica+gengibre.

A avaliação inicial e final do perfil de peso corporal em conjunto com a glicemia capilar observada no presente estudo está representada na Tabela 4.

Com relação ao perfil de peso corporal no início e ao final das 12 semanas de estudo, foi encontrada diferença significativa quando se compara o peso final dos grupos em relação ao peso inicial ($p < 0,05$).

Adicionalmente, com relação aos níveis de glicemia capilar no início e final do nosso experimento, encontramos diferença significativa apenas no grupo que recebeu dieta padrão suplementada de gengibre ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores iniciais e finais dos peso corporal e glicemia capilar, expressos em média \pm DP, nos grupos C, CG, H e HG.

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)*	Glicemia Inicial (mg/dL)	Glicemia Final (mg/dL)
Grupo C n=10	24,6 \pm 1,9	34,8 \pm 3	119,5 \pm 25,1	109 \pm 32
Grupo CG n=10	22,6 \pm 1,4	33,6 \pm 2	141,5 \pm 30,6	139 \pm 15,9
Grupo H n=10	23,2 \pm 1,4	32,8 \pm 1,7	175,5 \pm 33,1	137 \pm 22,4
Grupo HG n=10	22,8 \pm 2,4	32 \pm 1,9	160,5 \pm 38,7	137 \pm 35,1
valor p	0,07	0,01**	0,03***	0,23

*ANOVA do peso final entre os quatro grupos. **ANOVA $p < 0,05$: peso final comparado ao peso inicial.

***ANOVA da glicemia inicial entre os quatro grupos

O ganho de peso dos animais quando comparados entre os diferentes grupos Controle (C), Hiperlipídico (H) e Controle adicionado de extrato de gengibre (CG) e Hiperlipídico adicionado de extrato de gengibre (HG), mostra na sua evolução que todos obtiveram um crescimento significativo, representados na Figura 2. ANOVA: $p = 0,024$.

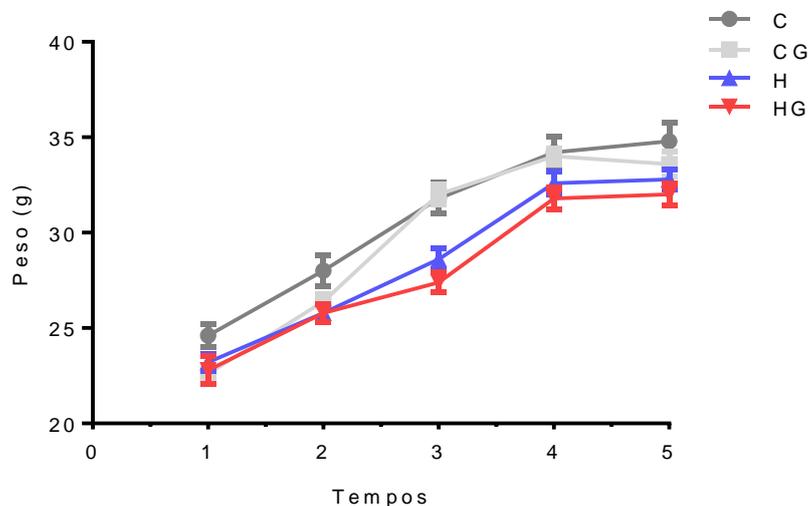


Figura 2. Evolução do ganho de peso dos animais nos diferentes grupos (média \pm DP). ANOVA $p:0,024$

Quando analisamos o percentual de peso entre os grupos experimentais durante as 12 semanas de experimento (Figura 3), verificamos que os grupos CG e HG foram estatisticamente diferentes entre si apenas na quarta semana (% ganho CG>HG) e na oitava semana de tratamento (% ganho HG>CG), não havendo diferença estatística entre as demais avaliações.

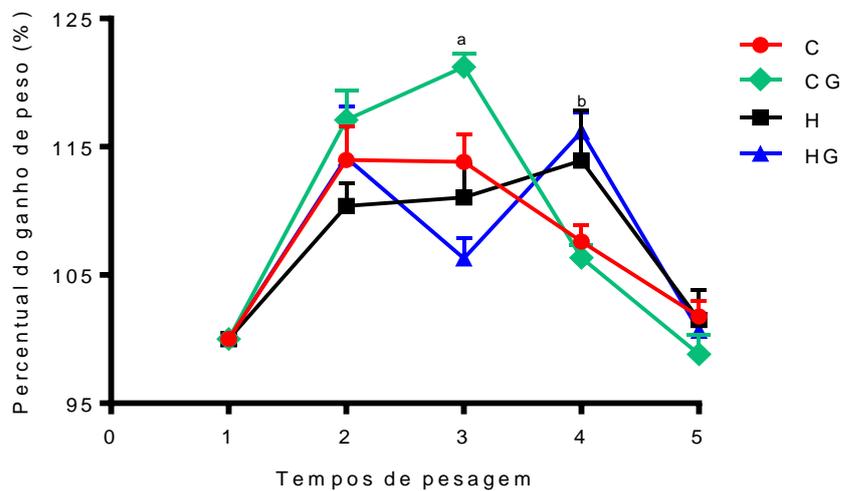


Figura 3. Percentual do ganho de peso corporal (%) dos camundongos nos diferentes grupos (C, CG, H, HG), representados pela média \pm DP. Tempo de pesagem 1: início do experimento – fase de adaptação e início dietas. Tempo de pesagem 2: início da intervenção (adição de gengibre à dieta). Tempo de pesagem 3: 4 semanas do início da intervenção. Tempo de pesagem 4: 8 semanas de intervenção. Tempo 5: final do experimento – 12 semanas de intervenção (eutanásia). ^a $p<0,05$ entre CG e HG, ^b $p<0,05$ entre CG e HG. ANOVA: $p=0,99$

Em relação ao ganho de peso corporal total ao longo das 12 semanas de tratamento, mostrou-se semelhança entre os grupos, com discreta tendência a diminuição no grupo que recebeu dieta hiperlipídica adicionada do extrato de gengibre (HG) como mostra na figura 4.

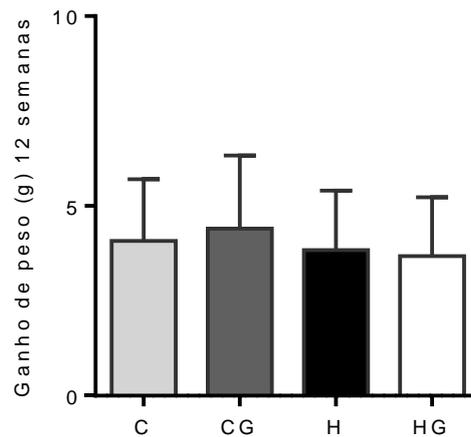


Figura 4. Ganho de peso corporal total entre os grupos C, CG, H e HG (média \pm DP). ANOVA: $p=0,85$.

6.2 Peso dos Órgãos e Tecidos

Na Figura 5 podemos observar o peso dos tecidos hepático, gordura epididimal, tecido adiposo marrom e gordura retroperitoneal, coletados na eutanásia dos animais. O peso dos tecidos foi corrigido pelo peso corpóreo total de cada animal e os valores representados na mesma figura.

Em relação ao peso do tecido hepático (fígado), podemos observar peso menor no grupo HG quando comparado ao grupo H, porém este não foi estatisticamente significativo (Figura 5 e Tabela 7). Quando pareado o peso do fígado do grupo HG e CG, houve diferença estatística significativa; $p=0,008$ (Figura 6 e Tabela 7).

Observa-se semelhança no peso da gordura epididimal entre os grupos (ANOVA: $p=0,39$), conforme é representado na Figura 7. Embora haja uma leve tendência a menor peso do grupo CG quando comparado ao grupo C, este não foi significativo ($p=0,074$), (Tabela 6).

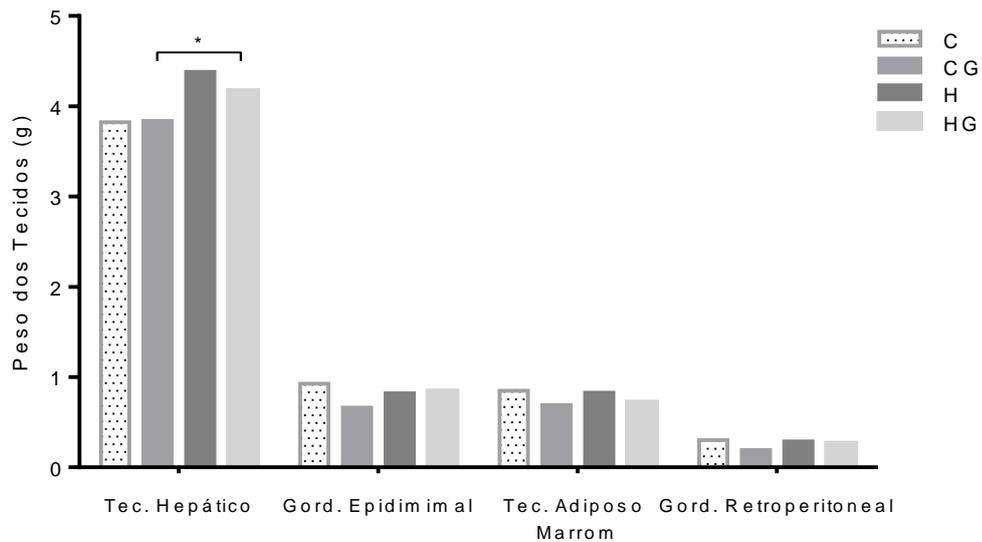


Figura 5. Peso dos tecidos coletados na eutanásia, corrigidos pelo peso corporal (média \pm DP), dos grupos C, CG, H e HG. *Teste T de Student $p < 0,05$.

Não foi observado diferença no peso do tecido adiposo marrom entre os grupos (ANOVA $p=0,16$) (Figura 5), apesar dos grupos CG e HG mostrarem leve tendência a um peso menor quando comparados, respectivamente, com os grupos C e H, conforme demonstrado na Figura 8.

O peso da gordura retroperitoneal foi semelhante entre os grupos, não sendo observado diferença estatística significativa (ANOVA $p=0,27$), conforme mostra as Figuras 5 e 9.

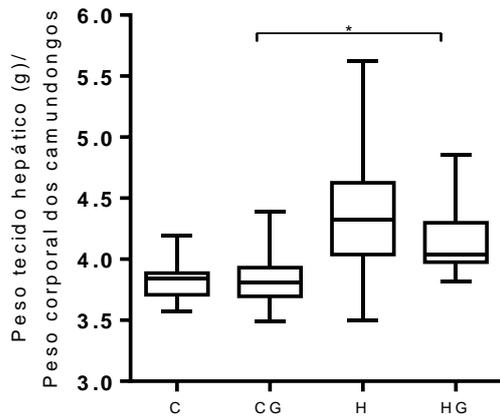


Figura 6. Peso do fígado na eutanásia dos animais dos grupos C, CG, H e HG, corrigidos pelo peso corporal dos camundongos. * Teste t de student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,001$.

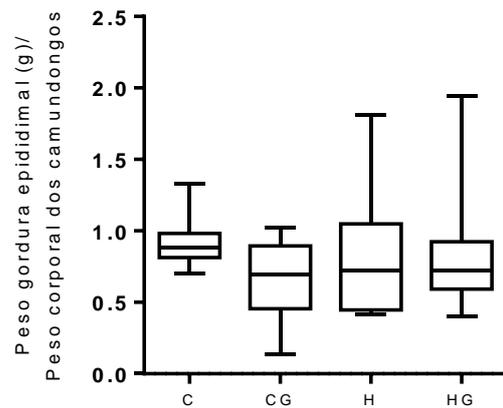


Figura 7. Peso da gordura epididimal na eutanásia dos animais dos grupos C, CG, H e HG, corrigidos pelo peso corporal dos camundongos. ANOVA: $p = 0,39$

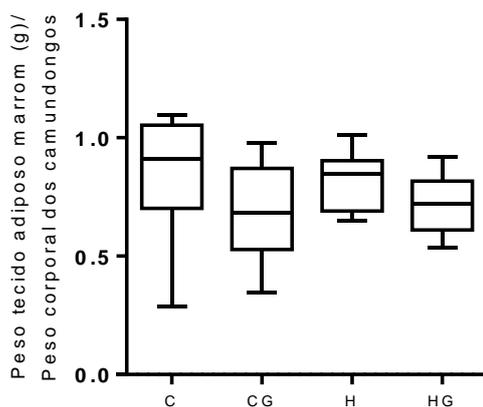


Figura 8. Peso do tecido adiposo marrom na eutanásia dos animais dos grupos C, CG, H e HG, corrigidos pelo peso corporal dos camundongos. ANOVA: $p = 0,16$

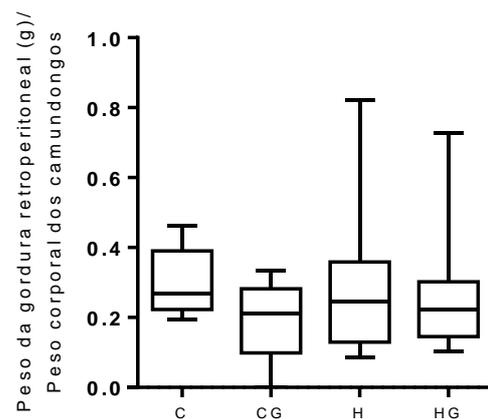


Figura 9. Peso da gordura retroperitoneal na eutanásia dos animais dos grupos C, CG, H e HG, corrigidos pelo peso corporal dos camundongos. ANOVA: $p = 0,27$.

Na Tabela 5, são representados e comparados os valores médios e desvios-padrão do peso corrigido entre os tecidos nos grupos experimentais estudados C, CG, H e HG.

Tabela 5. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) nos grupos experimentais C, CG, H e HG.

	C (n=10)	CG (n=10)	H (n=10)	HG (n=10)	p valor
Tecido Hepático (g/g de peso)	3,824 \pm 3,82	3,839 \pm 3,83	4,379 \pm 4,37	4,168 \pm 4,16	0,001*
Gord. Epididimal (g/g de peso)	0,925 \pm 0,92	0,661 \pm 0,66	0,822 \pm 0,82	0,843 \pm 0,84	0,271
Tecido Adiposo Marrom (g/g de peso)	0,849 \pm 0,84	0,691 \pm 0,69	0,826 \pm 0,82	0,717 \pm 0,71	0,106
Gord. Retroperitoneal (g/g de peso)	0,303 \pm 0,30	0,191 \pm 0,19	0,288 \pm 0,28	0,264 \pm 0,26	0,273

*ANOVA $p < 0,05$

Na Tabela 6, são representados e comparados, através do teste *t* de Student, os valores de média e desvios-padrão do peso corrigido dos tecidos entre os grupos C e CG.

Tabela 6. Valores médios do peso corrigido dos tecidos (média \pm DP) entre os grupos experimentais C e CG.

	C	CG	p valor
Tecido Hepático (g/g de peso)	3,82 \pm 3,82	3,839 \pm 3,83	0,875
Gord. Epididimal (g/g de peso)	0,925 \pm 0,92	0,661 \pm 0,66	0,074
Tecido Adiposo Marrom (g/g de peso)	0,849 \pm 0,84	0,691 \pm 0,69	0,950
Gord. Retroperitoneal (g/g de peso)	0,303 \pm 0,30	0,191 \pm 0,19	0,472

*Teste *t* de Student $p < 0,05$

Na Tabela 7, são representados e comparados, através do teste *t* de Student, os valores médios e desvios-padrão do peso dos tecidos entre os grupos H e HG.

Tabela 7. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) entre os grupos experimentais H e HG.

	H	HG	p valor
Tecido Hepático (g/g de peso)	4,379 \pm 4,37	4,168 \pm 4,16	0,188
Gord. Epididimal (g/g de peso)	0,822 \pm 0,82	0,843 \pm 0,84	0,104
Tecido Adiposo Marrom (g/ g de peso)	0,826 \pm 0,82	0,717 \pm 0,71	0,074
Gord. Retroperitoneal (g/ g de peso)	0,288 \pm 0,28	0,264 \pm 0,26	0,950

*Teste *t* de Student $p < 0,05$

Na Tabela 8, são representados e comparados, através do teste *t* de Student, os valores médios e desvios-padrão do peso dos tecidos entre os grupos CG e HG.

Tabela 8. Valores médios do peso corrigido entre os tecidos (média \pm DP) entre os grupos experimentais CG e HG.

	CG	HG	<i>p</i> valor
Tecido Hepático (g/ g de peso)	3,839 \pm 3,83	4,168 \pm 4,16	0,008*
Gord. Epididimal (g/g de peso)	0,661 \pm 0,66	0,843 \pm 0,84	0,074
Tecido Adiposo Marrom (g/ g de peso)	0,691 \pm 0,69	0,717 \pm 0,71	0,892
Gord. Retroperitoneal (g/ g de peso)	0,191 \pm 0,19	0,264 \pm 0,26	0,428

*Teste *t* de Student $p < 0,05$

5.3 Consumo alimentar, Eficiência Alimentar e Energética

O consumo alimentar das diferentes dietas nos grupos experimentais está representado na Figura 10. Os grupos que receberam dieta com adição do extrato de gengibre não apresentaram diferença significativa no consumo quantitativo quando comparados aos seus pares. Tal achado sugere que o sabor pungente do gengibre não afetou a ingestão alimentar. Além disso, houve um consumo significativamente maior de dieta hiperlipídica adicionada de extrato de gengibre (grupo HG) quando comparada à dieta padrão adicionada do extrato de gengibre (grupo CG), $p < 0,0001$ teste *t* de Student.

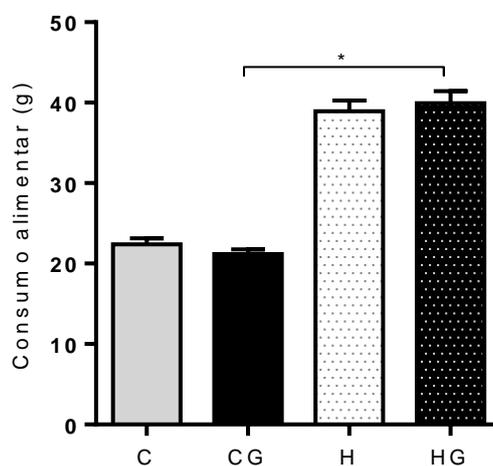


Figura 10. Consumo alimentar médio em cada grupo, representados pelas médias e desvios-padrão dos grupos C, CG, H e HG durante o experimento. * $p < 0,0001$ (teste t)

Para definir a eficiência do consumo alimentar dos animais avaliamos a eficiência alimentar da dieta que é calculado pela razão do ganho de peso médio e o consumo da dieta. Foi observado um consumo alimentar menor nos grupos H e HG, quando comparados aos grupos (C e CG), conforme demonstra a Figura 11.

Quanto à densidade energética da dieta, podemos observar que não houve ganho de peso corporal acentuado entre os grupos que receberam adição de gengibre (CG e HG) quando comparados aos que não receberam adição de gengibre (C e H), o que sugere uma menor eficiência energética, sendo avaliado pelo cálculo da razão entre o ganho de peso médio e consumo energético, observado na Figura 12. Aliado a estes fatos, verificou-se que os grupos não diferenciaram significativamente quanto à ingestão energética total da ração no final do experimento. Os dados descritivos destes achados estão representados na Tabela 9.

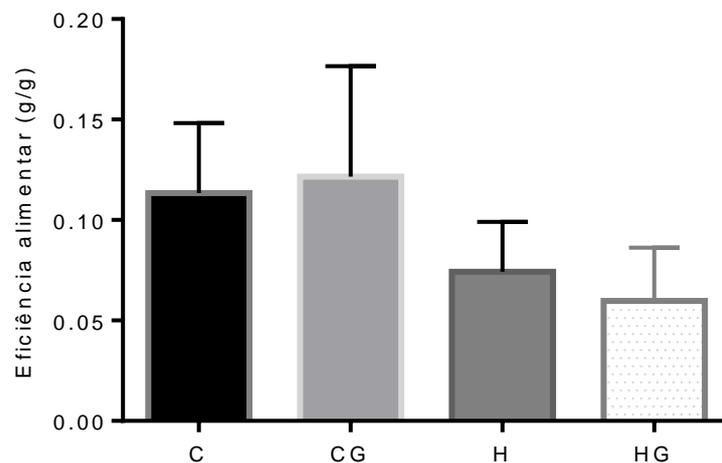


Figura 11. Gráfico da eficiência alimentar representada pela média do (ganho de peso (g) / consumo alimentar (g)) dos grupos C, CG, H e HG. ANOVA $p=0,67$

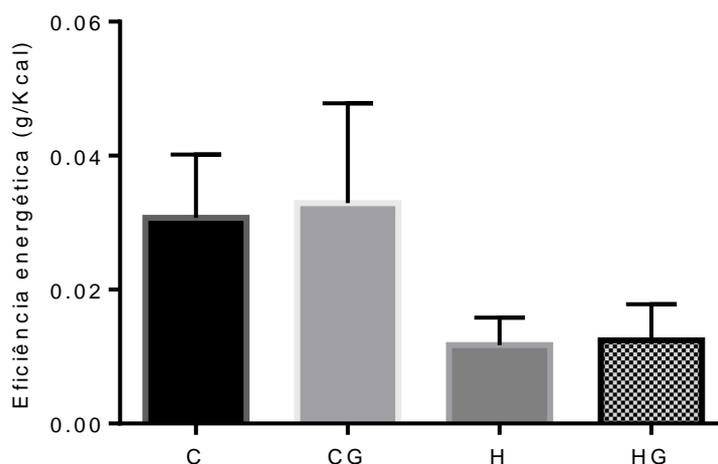


Figura 12. Gráfico da eficiência energética representada pela média do (ganho de peso (g) / consumo energético (Kcal)) dos grupos C, CG, H e HG. ANOVA p=0,27

Tabela 9. Dados descritivos do Consumo alimentar (g), Eficiência Alimentar (g/g) e Eficiência Energética (g/Kcal) representados pela média \pm desvios padrão nos grupos experimentais C, CG, H e HG.

	Consumo alimentar	Eficiência Alimentar*	Eficiência Energética**
C (n=10)	22,40 \pm 2,54	0,11 \pm 0,06	0,03 \pm 0,01
CG (n=10)	21,19 \pm 2,01	0,12 \pm 0,11	0,03 \pm 0,02
H (n=10)	38,94 \pm 4,65	0,07 \pm 0,04	0,01 \pm 0,00
HG (n=10)	39,96 \pm 5,13	0,05 \pm 0,05	0,01 \pm 0,01

*ANOVA p=0,67 **ANOVA p=0,27

6.4 Parâmetro Bioquímicos

6.4.1 Análise da Glicemia Capilar, Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Os valores de glicemia capilar foram coletados nos grupos experimentais após 4, 8 e 12 semanas do início da suplementação ou não do extrato do gengibre e nenhuma diferença estatística foi significativa, como mostra a Figura 13.

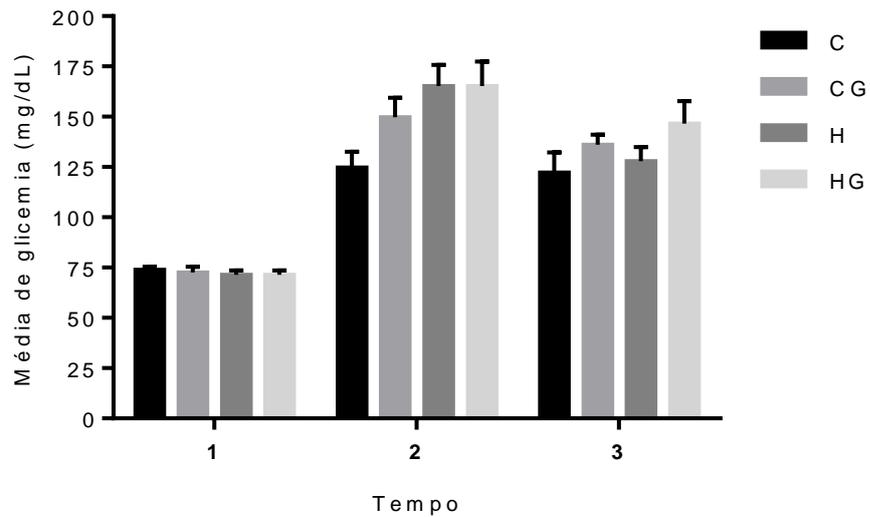


Figura 13. Níveis de glicemia capilar, representados pela Média + DP nos grupos C, CG, H e HG nos tempos 1. Início do experimento, tempo 2: Início da suplementação do extrato de gengibre nos grupos CG e HG, tempo 3: Final do experimento. ANOVA: $p=0,93$

Quando comparamos os níveis de glicemia capilar no início e final do experimento, encontramos diferença significativa entre os grupos C e CG (teste t de Student $p<0,05$, grupo CG em relação ao grupo C), conforme mostra a Figura 14.

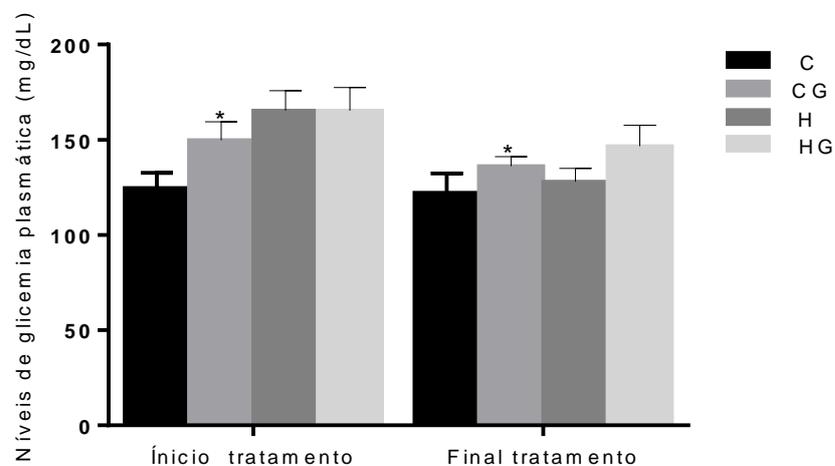


Figura 14. Níveis de glicemia capilar representados pela Média + DP entre os grupos C, CG, H e HG, comparando os níveis de glicemia capilar no início e final do experimento. ANOVA: 0,37 *Teste *t* de Student $p < 0,05$ em relação ao grupo C.

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado 24 horas antes da eutanásia dos animais, após jejum prévio de 10 horas. A glicemia basal do grupo HG ($187,8 \pm 96\text{mg/dL}$) mostrou-se menor que o grupo H ($298 \pm 164\text{mg/dL}$), $p < 0,05$. Por outro lado, o grupo CG ($243 \pm 130\text{mg/dL}$) foi semelhante quando comparado ao grupo C ($242,5 \pm 146\text{mg/dL}$). A dieta hiperlipídica adicionada do extrato de gengibre (HG) determinou melhora significativa na tolerância à glicose quando comparada ao grupo hiperlipídica sem o extrato (H) no tempo 120 minutos, como mostra a Figura 15A (teste *t* student, $p < 0,05$ HG vs H).

A partir da curva do teste de tolerância à glicose é possível calcular a área sob a curva (AUC, *area under curve*) para representar o grau de intolerância à glicose. A partir da curva formada pelo teste de tolerância à glicose é traçada uma reta do ponto da glicemia basal ao ponto da glicemia final (tempo 120 min) e calculada a área sob a curva. Quanto mais rápido a curva voltar aos valores basais, menor será a AUC e maior sensibilidade à insulina apresenta o indivíduo. Ou seja, quanto menor a AUC, mais tolerante, e quanto maior a AUC, mais intolerante à glicose é o indivíduo. O grau de intolerância à glicose está fortemente relacionado com o aumento da resistência à insulina. Pôde-se constatar uma menor AUC somente no grupo HG ($23535 \pm 5826\text{mg/dL} \times \text{min}$), quando comparado ao grupo H ($38553 \pm 6793\text{mg/dL} \times \text{min}$). Não se obteve diferença entre os demais grupos, conforme representado na Figura 15B.

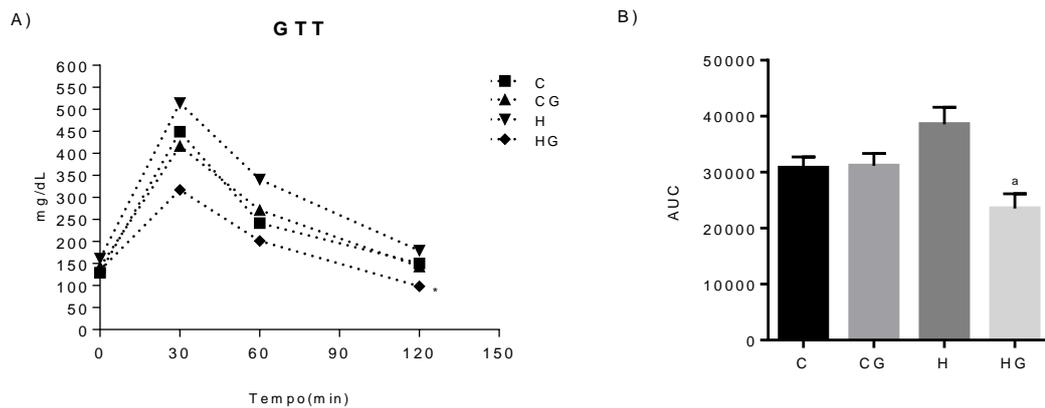


Figura 15. Teste de tolerância à glicose (GTT), mensurando a glicemia nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose à 50% (1mg/g de peso) intraperitoneal, representado pelas curvas glicêmicas ao longo do tempo de cada grupo. A Figura 15A representa a variação da média \pm desvios padrão da curva do GTT. ANOVA: $p < 0,05$ *teste t de Student $p < 0,05$ HG vs H. A Figura 15B representa área sob a curva (AUC – area under curve) a partir da Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 12 semanas de dieta dos mesmos grupos. $p = 0,01$ vs H.

Para avaliar a sensibilidade à insulina, foi realizado o teste de sensibilidade insulínica (ITT) 48 horas antes da eutanásia dos animais, após jejum prévio de 6 horas (Figura 16A). Este teste demonstrou menores níveis glicêmicos médios no grupo CG ($64,5 \pm 39$ mg/dL) quando comparado ao grupo C ($85,1 \pm 21$ mg/dL), o que sugere uma maior sensibilidade à insulina causada pela adição do extrato de gengibre a este tipo de dieta, caracterizando a normalização da sensibilidade à insulina no grupo que foi tratado. Quando comparamos o grupo HG (78 ± 41 mg/dL) ao grupo H ($67,31 \pm 32$ mg/dL), este teste não demonstrou a mesma resposta glico-insulinêmica favorável. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 16B, observando-se, então, redução significativa da AUC mediante tratamento com o gengibre no grupo CG, quando comparado ao grupo C (6474 ± 1583 vs $9489 \pm 957,7$; $p = 0,006$). Em resumo, a resposta significativamente positiva do gengibre, visualizada pelo cálculo da AUC no teste do ITT, esteve presente apenas quando este foi adicionado à dieta padrão.

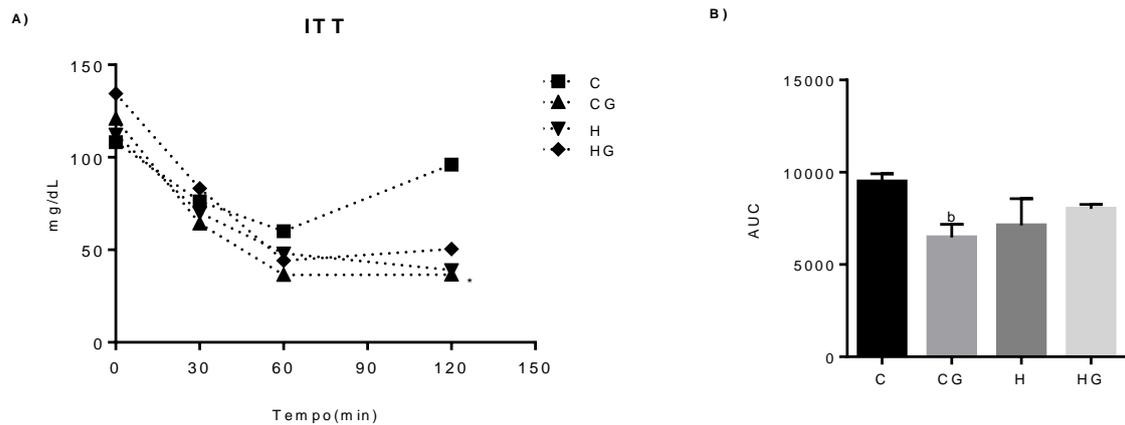


Figura 16. Teste de tolerância à insulina (ITT), mensurando a glicemia nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina intraperitoneal na dose de 0,75UI/Kg, e representado pelas curvas glicêmicas ao longo do tempo em cada grupo. ANOVA $p=0,24$ *teste t de Student $p<0,05$ CG vs C. A Figura 16A representa a variação da média \pm desvios padrão da curva do ITT. A Figura 16B representa a área sob a curva (AUC-area under curve) a partir da Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância à insulina realizado após 12 semanas de dieta dos mesmos grupos. ANOVA $p=0,054$ b $p=0,0065$ vs C.

6.4.2. Insulinemia e Avaliação da Resistência à Insulina

A quantificação dos níveis de insulina sérica no soro dos camundongos, mostrou que entre os grupos experimentais com ou sem suplementação não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA $p=0,40$) em C ($0,52\pm0,21$ ng/mL), CG ($0,27\pm0,31$ ng/mL), H ($0,32\pm0,30$ ng/mL) e HG ($0,21\pm0,11$ ng/mL). Ao analisarmos os possíveis efeitos entre os grupos suplementados com o gengibre, verificamos que o gengibre não alterou significativamente a insulina dos animais em nenhuma dieta.

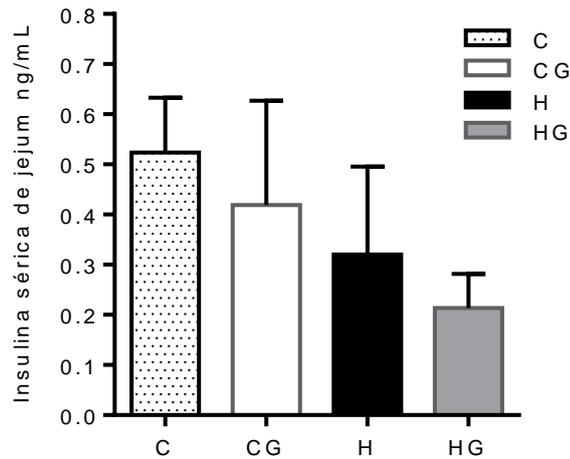


Figura 17. Níveis de insulina sérica representados pela Média + DP entre os grupos C, CG, H e HG. ANOVA: 0,40

Os dados de glicose e insulina de jejum, ambos obtidos imediatamente antes do momento da eutanásia dos animais, foram utilizados para o cálculo dos índices de modelos homeostáticos padronizados na literatura (HOMA-IR, método que avalia a resistência à insulina; e HOMA- β , para avaliação estimada da capacidade secretória das células β -pancreáticas (WALLACE et al, 2004). Embora os resultados apresentem uma tendência na diminuição nos índices entre os grupos que receberam suplementação com gengibre, quando comparados aos seus pares, a análise pelo teste ANOVA não encontrou evidências de significância estatística.

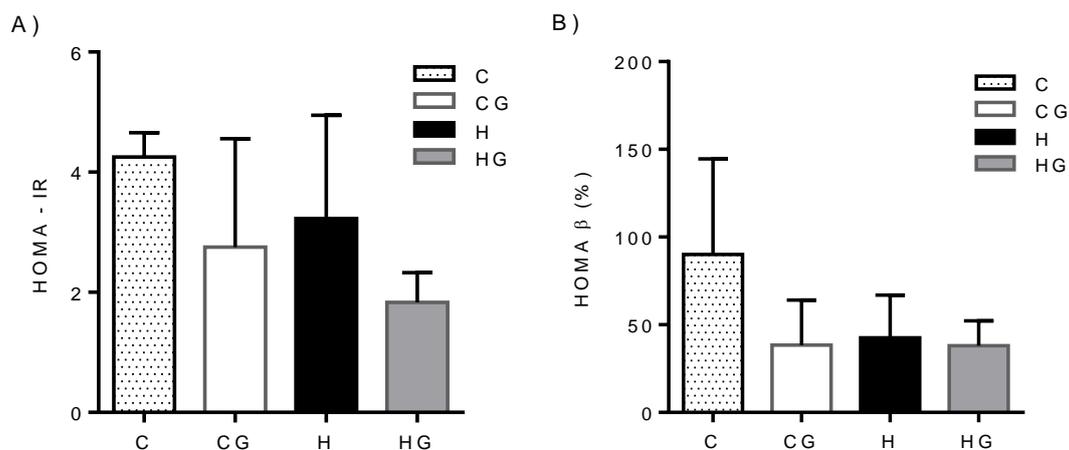


Figura 18. Índices HOMA IR (A) e HOMA β (B), obtidos a partir das glicemias e insulinemias em jejum dos grupos C, CG, H e HG, para avaliação da resistência à insulina e capacidade de secreção de insulina. (HOMA IR - ANOVA: 0,57 e HOMA β - ANOVA p:0,54)

6.5 Discussão

A Síndrome Metabólica (SM) inclui a presença de obesidade, resistência insulínica e dislipidemia, que predispõe ao diabetes tipo 2, e tem se tornado mais prevalente nos últimos anos. A alta ingestão de uma alimentação calórica e rica em gorduras, frequente no estilo de vida moderno, a longo prazo, levam a um perfil lipídico alterado e o desenvolvimento da SM. Além do mais, a combinação da diminuição do gasto energético também contribui para a prevalência atual crescente de diabetes tipo 2 e obesidade (NAMMI et al, 2009).

O desenvolvimento desta síndrome sofre forte influência de fatores genéticos e ambientais, este último sendo os mais frequentemente estudados em humanos ou em modelos animais (NAMMI et al, 2009). Faz-se necessário o controle não somente da glicemia, mas também dos lipídeos, a fim de reduzir as graves complicações e desfechos negativos desta condição (MOLLER, 2001). Dessa forma, novos agentes medicinais com propriedades duais são de grande relevância. As opções atuais disponíveis tais como modificação da dieta ou combinação de drogas hipolipemiantes e antidiabéticas sintéticas têm suas próprias limitações e efeitos colaterais indesejados (NAMMI et al, 2009).

Assim, tem surgido uma crescente demanda para o estudo e avaliação de abordagens tradicionais para o tratamento de desordens metabólicas, particularmente o uso de ervas ou plantas com propriedades e efeitos terapêuticos, como é o caso do gengibre (NAMMI et al, 2009).

Levando-se em consideração todos estes aspectos, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar e destacar os resultados da adição do extrato de gengibre (gengirol) como suplementação na dieta de camundongos C57BL/6, investigando-se assim o seu efeito preventivo na síndrome metabólica, obesidade e resistência à insulina. Ao inferir um tratamento diferencial de alimentação previamente protocolada em um modelo animal com elevada predisposição genética para o desenvolvimento de doenças metabólicas, conseguimos observar os resultados que nos permitiram avaliar o desenvolvimento destes animais ao longo do experimento.

Nos diversos artigos encontrados, a adição do gengibre em modelo animal apresenta resultados nem sempre consistentes, pois a variedade na composição dietética oferecida não é padronizada e a forma de aplicação envolve o uso de formulação variada. Além disso, a maioria dos modelos de estudos voltados para a prevenção de obesidade demonstram variabilidade na metodologia, amostras e resultados, o que dificulta encontrar um modo eficaz entre os diversos tipos de intervenções (HANDERMAN et al, 2000).

Em nossos experimentos utilizamos como suplementação o extrato do gengibre em pó, com o composto bioativo à base de gengirol, certificado e garantido por análise laboratorial. Tal composto pode ser facilmente obtido no varejo, com custo relativamente baixo, além de que tal apresentação poderia ser manipulada na forma de cápsulas ou mesmo oferecida nesta forma original, com boa aceitação para o uso cotidiano em conjunto com a alimentação regular da população brasileira. O uso de extrato seco ou fresco é considerado produto medicinal em alguns países, e o processo que envolve a desidratação conserva melhor as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos do gengibre (MAHMOUD; ELNOR, 2013).

Ao todo, o crescimento dos camundongos C57BL/6 ao longo do estudo mostrou-se dentro do esperado, sendo de forma natural e como parte do crescimento habitual destes animais.

No que diz respeito aos resultados obtidos através da suplementação com extrato de gengibre na dieta padrão e hiperlipídica, os camundongos mostraram alguns resultados diferentes daqueles encontrados na literatura.

Em primeiro lugar, a análise múltipla evidenciou que o ganho de peso corporal total não foi diferente entre os grupos ao final do experimento, o que, por sua vez, não alcança o objetivo primário do estudo em discussão. Este importante dado vai de encontro ao que foi observado por Goyal e Kadnor (2006), que utilizaram a dose de 250mg/Kg de peso corporal em camundongos e mostraram redução de peso no grupo que recebeu dieta hiperlipídica, indicando que o gengibre pode ser considerado uma terapia complementar para a prevenção da obesidade. No estudo de Nammi et al, 2009, que comparou diferentes dosagens de gengibre, houve também relatos que, após 6 semanas de dieta hiperlipídica, evidenciou-se resultados satisfatórios em relação ao peso.

Ao fazermos uma análise pormenorizada da variável peso corporal dos animais, encontramos diferença estatística significativa entre os grupos quando comparamos o peso final com o peso inicial. Este achado se opõe a recentes dados da literatura, onde não houve diferença significativa entre o peso inicial e final quando animais foram suplementados ou não com extrato de gengibre (MISAWA et al, 2015).

Também nesse mesmo sentido, ao avaliarmos os resultados nos diferentes tempos estudados, observamos diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à comparação do percentual do ganho de peso entre os grupos CG e HG na quarta e oitava semana. Paradoxalmente, verificamos primeiramente um percentual de ganho de peso significativamente maior no grupo CG em relação ao HG com quatro semanas. E num

segundo momento, podemos observar um efeito inverso, com maior percentual de ganho de peso no grupo HG na oitava semana. Isso nos leva a pensar que o gengibre apresenta efeito relativamente efêmero sobre o percentual de ganho de peso quando associado a uma dieta hiperlipídica, visto que esta resposta não se sustenta após mais quatro semanas de estudo (oitava semana do experimento), e ao final do estudo (12 semanas), o efeito primariamente positivo torna-se relativamente nulo. Em suma, novos estudos deverão ser conduzidos a fim de avaliar quais mecanismos poderiam estar influenciando a ausência de uma resposta positiva prolongada do uso do gengibre suplementado à dieta hiperlipídica dos animais.

Alguns estudos mostram que os animais submetidos a uma dieta hiperlipídica podem ser diferentemente resistentes ou susceptíveis ao ganho de peso corporal (HILL et al, 2000). E recente estudo também aponta que o uso de dieta hiperlipídica por tempo prolongado diminui a quantidade de energia consumida pelos animais ao longo das semanas (SOUTH et al, 2014), levando ao mesmo consumo energético final dos animais que consomem dieta padrão.

Em um estudo conduzido por MALIK e SHARMAA (2011), ratos machos Wistar foram alimentados com dieta hiperlipídica com diferentes doses de gengibre. No primeiro experimento a amostra foi inicialmente randomizada e dividida em 8 grupos, sendo que o primeiro e segundo grupo receberam dieta normal e dieta hiperlipídica, respectivamente; grupos três, quatro e cinco receberam dieta hiperlipídica adicionada de 250mg, 500mg e 1g/kg de gengibre liofilizado em pó, respectivamente; os grupos seis e sete receberam dieta hiperlipídica adicionada de gengibre e propranolol (30mg/kg/animal) ou somente propranolol (30mg/kg/animal), respectivamente; e finalmente, grupo oito recebeu sibutramina (5mg/Kg) associada a dieta hiperlipídica. Houve pouco efeito na redução do ganho de peso corporal com o uso do gengibre em camundongos e ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica; em contrapartida, houve uma melhora no perfil da composição da adiposidade corporal associada a outras patologias (MALIK; SHARMAA, 2011). Ainda em outro estudo, que também analisou as propriedades fitoquímicas, farmacológicas e toxicológicas do gengibre, foi mostrado, porém, que o extrato teve maior efetividade na perda de peso corporal e também na redução dos níveis do lipidograma (ALI et al, 2008).

Com relação a um estudo conduzido em humanos, pode-se citar a publicação de Hasani-Ranjbar et al 2009, mostrou que o gengibre diminuiu significativamente o peso corporal, circunferência da cintura e do quadril. Além do mais, teve efeito *anti-hiperlipidêmico* e antihiperlipidêmico, entre outros efeitos anti-obesidade.

Recentes resultados sobre os efeitos da suplementação do extrato de gengibre em modelo de camundongo C57BL/6 obesos induzidos pela dieta hiperlipídica não apresentaram

diferenças significativas na ingestão calórica (MISAWA et al, 2015). Uma validação de aspecto importante no nosso trabalho é no que se refere à eficiência da dieta, onde se analisa a capacidade do animal perder ou ganhar peso conforme são submetidos a diferentes modelos de dietas. Não encontramos diferença significativa nas dietas consumidas pelos grupos quando realizada análise da eficiência alimentar da dieta ($p=0,67$) e eficiência energética ($p=0,27$), ou seja, quando analisamos se a dieta foi efetiva em propiciar ganho de peso corporal durante o experimento, o resultado sugere que os animais que receberam dietas hiperlipídicas, apesar de apresentarem uma maior consumo alimentar em gramas, tiveram uma menor eficiência em converter uma maior quantidade de calorias ingeridas em massa corporal. Os grupos C e CG apresentaram maior eficiência energética, porém não foi estatisticamente significativo, bem como o que observamos nos grupos H e HG, que tiveram menor consumo em gramas e semelhante consumo em calorias entre eles. Estes resultados vão de encontro aos estudos que observaram maior eficiência energética em grupos alimentados por dieta hiperlipídica, onde foi utilizado a banha como gordura saturada (White et al, 2013). Alguns estudos referem que o modelo de dieta hiperlipídica está relacionado à eficiência alimentar, pois o aumento da ingestão de gordura tem mais efeito sobre o peso corporal (HARIRI; THIBAUT, 2010; NERY et al, 2011).

Ainda com relação à influência do extrato de gengibre no consumo alimentar, o maior consumo de dieta hiperlipídica adicionada de gengibre em relação ao controle com adição do mesmo reforça a hipótese de que os camundongos não foram influenciados pela introdução de uma substância estranha aos seus paladares; ou seja, o consumo significativamente mais elevado de dieta hiperlipídica (grupo HG) em relação à dieta padrão (grupo CG) é oriundo provavelmente da composição da dieta hiperlipídica, propriamente dita, que tende a ter melhor palatabilidade, é mais hipercalórica, além de cerca de 18% menos proteica em relação à dieta padrão, o que causa maior consumo devido à proporcionar menor saciedade. Assim como encontrado na literatura, a ingestão da dieta não foi afetada pelo consumo do extrato do gengibre (BEATTIE et al, 2011) e apesar do cheiro e gosto pungente não afetou a ingestão calórica, indicando não haver aversão ao sabor no presente estudo (MISAWA et al, 2015).

Estudo conduzido por Madkor et al. em 2010 avaliou o uso de alho, gengibre, cúrcuma, ou a mistura em pó dos três componentes, em modelos adultos de ratos machos Wistar saudáveis ou diabéticos induzidos por Streptozotocina-Nicotinamida. Os ratos não diabéticos receberam por gavagem 200mg/Kg de peso corporal de cada componente separadamente ou misturado. Citando o gengibre com uso separado ou misturado, o estudo revelou não alterar significativamente os níveis de glicemia de jejum e insulina em ratos

saudáveis. Por outro lado, em estudo recente conduzido em humanos, durante 10 semanas, onde avaliou o perfil metabólico do uso do gengibre com adição de 1000mg/Kg de peso corporal na alimentação de pacientes em diálise peritoneal, houve redução nos níveis de glicemia de jejum quando comparado aos valores iniciais do experimento (IMANI et al, 2015). Quando comparamos os níveis de glicemia capilar no início e final do nosso experimento, encontramos diferença significativa apenas no grupo que recebeu dieta padrão suplementada de gengibre ($p < 0,05$), mostrando que o gengibre não teve efetividade no grupo que recebeu dieta hiperlipídica suplementada com o extrato.

Em nosso estudo, o uso do extrato de gengibre (500mg/Kg de peso corporal/dia) mostrou ter efetividade na resistência à insulina quando avaliamos o GTT. Isso demonstra que a dieta hiperlipídica adicionada do extrato de gengibre determinou aumento significativo na tolerância à glicose quando comparada ao grupo controle com adição ou não do extrato. Considerando-se as propriedades conhecidas do gengibre, a combinação de tais efeitos pode contribuir para a prevenção da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Do mesmo modo, o gengibre adicionado à dieta hiperlipídica também exerceu efeito preventivo em relação à resistência insulínica em estudo conduzido por Li et al, em 2014. Adicionalmente, em estudo que foram realizados testes de tolerância à glicose oral e intraperitoneal, testes de tolerância à insulina e clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, ratos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com gengibre apresentaram tolerância à glicose diminuída e piora da sensibilidade à insulina no tecido periférico (BIELOHUBY et al, 2013).

Em um estudo no qual ratos machos foram alimentados com dieta hiperlipídica contendo 20g de lipídios/100g da dieta, o gengibre foi adicionado na dieta na forma de extrato a 5% e comparado ao orlistat, visando avaliar a capacidade de ambos na redução do ganho de peso e na prevenção da obesidade. O estudo concluiu que o gengibre teve uma grande capacidade de reduzir o peso corporal, com efeito positivo sobre aumento do nível de HDL-colesterol. No entanto, o extrato (25-100mg/kg) não reduziu níveis de glicemia sanguínea, coagulação e frequência cardíaca (MOHAMOUD; ELNOR, 2013; WEIDNER; SIGWART, 2000).

Os estudos têm demonstrado que a dieta hiperlipídica palatável é utilizada com sucesso para a reprodução de modelo de obesidade e síndrome metabólica. Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica a partir de 3 semanas do início do seu consumo mostram haver aumento na quantidade dos tecidos retroperitoneal, epididimal, bem como aumento na secreção de insulina (DUARTE et al, 2006). Em nosso estudo, quando avaliamos o peso das

vísceras e gordura retroperitoneal, verificamos a presença de obesidade visceral através dos tecidos coletados, o que pode condizer com os primeiros sinais da síndrome metabólica. Realizamos avaliação dos pesos do fígado, gordura retroperitoneal, gordura epididimal e tecido adiposo marrom. O peso do fígado dos animais do grupo HG foi menor se comparado ao grupo H, porém não foi significativo. Apenas quando HG foi pareado ao grupo CG que houve relação significativa ($p=0,008$). Além disso, o peso do tecido adiposo retroperitoneal foi maior nos grupos C, H e HG, porém sem significância estatística quando comparados entre eles ou com o grupo CG. Por outro lado, mantiveram-se em pesos relativamente menores quando comparado aos demais tecidos.

O presente estudo não encontrou diferenças significativamente positivas em relação à distribuição e composição da gordura corporal dos camundongos e sua relação com o peso corporal total, tampouco se pôde avaliar se houve a redução da massa dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, após administração do gengibre, em relação ao início do estudo. Nesse aspecto, é importante destacar o estudo de Malik e Sharma de 2011, o qual demonstrou o efeito antiobesidade do pó de gengibre liofilizado adicionado à dieta hiperlipídica de ratos Wistar machos. Tanto do ponto de vista preventivo como terapêutico, o uso de tal substância por oito semanas durante o estudo reduziu o ganho de peso corporal, peso do tecido adiposo, melhorou a homeostase lipídica e glicêmica, bem como diminuiu a relação colesterol total/HDL-colesterol, sugerindo um papel potencial desta terapia para a obesidade e doenças associadas. Outro trabalho a mencionar é de Han et al 2005, que demonstrou um peso corporal significativamente menor em 2 e 8 semanas, bem como um peso reduzido dos tecidos adiposos ao final de um estudo que usou como intervenção preventiva o extrato aquoso de gengibre a 1 e a 3% contido na dieta hiperlipídica de camundongos. Ao final, o autor sugere que o efeito antiobesidade do extrato pode ser em parte devido à inibição da absorção intestinal de lipídeos da dieta pelos compostos ativos do *Z. officinale* Roscoe (HAN et al, 2005).

Dados similares aos relatados sobre o presente estudo logo anteriormente em relação ao perfil do tecido adiposo branco puderam ser observados na média do peso do tecido adiposo marrom. Quando comparamos os animais que receberam suplementação aos animais que não receberam, os primeiros apresentaram uma tendência a valores menores de peso do tecido marrom, porém não houve diferença estatística. Sobre este aspecto, pode-se citar estudo no qual ratos alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica adicionada do extrato de gengibre apresentaram como resultado uma menor atividade da lipase pancreática e significativamente menor acúmulo de tecido adiposo (BETTIE et al, 2011). Em outro estudo,

em paralelo à redução de peso corporal, a adição de extrato de gengibre evitou o aumento do acúmulo de gordura epididimal, retroperitoneal e perirenal induzido por uma dieta hiperlipídica (MISAWA et al, 2015).

Um dos pontos fortes deste estudo está no fato de que se pôde evidenciar uma redução na glicemia capilar final quando comparada a inicial no grupo CG, que foi significativo quando comparada ao seu par (C). Este resultado nos mostra um efeito positivo do gengibre no que diz respeito ao metabolismo da glicose. Nesse mesmo sentido, podemos citar a publicação de ALI et al, 2008. Em seu estudo, ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina receberam 500mg/Kg de extrato aquoso de gengibre cru via intraperitoneal por 7 semanas. O grupo correspondente ao modelo diabético sem suplementação mostrou hiperglicemia acompanhada de perda de peso. Na dose de 500mg/Kg, o grupo suplementado com gengibre cru obteve significativo efeito na redução da glicemia sérica, colesterol e triglicerídeos quando comparados aos ratos diabéticos do grupo controle.

Discussão

7.DISCUSSÃO

Para nosso conhecimento, o presente trabalho é pioneiro em nosso meio, uma vez que buscou avaliar os efeitos da suplementação do resveratrol, um mimetizador de restrição calórica, em pacientes com diabetes tipo 2 atendidos em um hospital universitário de nível terciário, ou seja, recebendo os casos mais graves e com longos períodos de evolução da patologia e suas complicações. Dessa forma o objetivo do estudo foi verificar o efeito da suplementação do resveratrol no perfil glicêmico e lipídico, e no metabolismo energético de pacientes diabéticos tipo 2.

Vale ressaltar que buscou-se não interferir no estilo de vida dos voluntários, na tentativa de reproduzirmos uma situação cotidiana no que diz respeito ao hábito alimentar, prática de atividade e ao tratamento medicamentoso habitual do participante.

Primeiramente, em relação ao grupo , pode ser observado que os 2 grupos não apresentaram-se diferente estatisticamente .

Ainda em relação aos grupos, pode-se observar que eles não apresentaram diferenças quanto à idade e o tempo de evolução do diabetes. De uma forma geral, um número considerável de participantes apresentou doenças associadas a patologia, hipertensão (93%) e dislipidemias (57%). Quanto as complicações relacionados ao DM2, tais como retinopatia, neuropatia e nefropatia 30% dos participantes relatam apresentar algum deles.

Comparando-se os grupos quanto à composição corporal, foi constatado que não houve diferença estatística entre eles, ou seja, os participantes pertencentes ao grupos não apresentaram diferenças quanto ao peso, IMC, circunferências corporais e pregas cutâneas, não havendo, dessa forma, influência do resveratrol nas variáveis antropométricas.

Os participantes do presente estudo também foram avaliados quanto à prática de atividades físicas utilizando um questionário internacional validado para a população brasileira. A maior parte da população foi classificado como sedentário (57%) e apenas uma pequena parcela (14%) como ativa. Não houve diferença entre os grupos quanto à prática de atividades físicas.

A importância da atividade física para a saúde já foi documentada na literatura (PINES, 2009). Como exemplo, é conhecido o efeito da atividade física na diminuição do risco para DCV, câncer de mama, melhora do humor e da qualidade de vida. É importante destacar que para que haja melhora da qualidade de vida e prevenção de doenças, a prática regular de exercícios físicos deve ser aliada à hábitos alimentares saudáveis, controle do peso e ao não-tabagismo (BEITZ; DÖREN, 2004). Segundo Rachón e Teed (2010), além da

redução da ingestão alimentar, a prática de atividades físicas aeróbicas deveria ser estimulada uma vez que foi demonstrado que aumenta a lipólise da gordura visceral.

Sternfeld et al. (2005) partilhou da mesma concepção da atividade física por afirmar que níveis mais elevados de atividade física, particularmente atividades físicas de intensidade vigorosa, associam-se à menores porcentagens de gordura corporal e circunferência da cintura. Seu estudo sugere que a prática regular de atividades físicas, particularmente as vigorosas, podem ser efetivas para a preservação de uma composição corporal mais favorável. Além disso, afirmou que diversos estudos transversais mostraram uma associação inversa entre a prática de atividades físicas e o IMC. Segundo Chang et al. (2000), o aumento da atividade física pode diminuir o acúmulo de gordura intra-abdominal e atenuar os riscos de DCV, através das seguintes alterações: melhora do perfil lipídico, contribuição para a normalização da pressão arterial, aumento da circulação colateral, diminuição da frequência cardíaca no repouso e durante o exercício nos pacientes diabéticos.

Quanto à alimentação dos voluntários estudados, observou-se que os grupos mostraram-se bastante homogêneos. Quando a alimentação foi avaliada pelo recordatório alimentar de 24 horas (Rec24h), o qual estimou somente os macronutrientes, não houve diferença entre os grupos. A maior parte dos voluntários apresentou a ingestão de macronutrientes dentro das recomendações. No entanto, um elevado percentual (85%, média dos 2 dias avaliados) apresentou a ingestão calórica aquém do gasto energético de repouso mensurado pela calorimetria indireta, o que põe em risco a veracidade das informações coletadas quanto à ingestão alimentar, uma vez que todos os participantes apresentavam excesso de peso.

Segundo Karelis et al. (2010), a ingestão calórica é comumente estimada usando técnicas de auto-relato, sendo que a subnotificação se constitui um problema frequente que pode variar de 10 a 91%, dependendo da população, método e definição de subnotificação. A subnotificação tem sido mais frequente em mulheres do que em homens, em idosos mais que em jovens e entre os obesos. Ela tem sido associada a perfis psicológicos desfavoráveis como depressão, baixa imagem corporal, restrição alimentar e ansiedade. Uma evidência de que esteja ocorrendo subnotificação é a diminuição da ingestão de lipídios, fato não observado em nosso estudo.

Quando a alimentação foi avaliada segundo o dia alimentar habitual, observou-se também que não houve diferença entre os grupos e a maioria dos voluntários também apresentou a ingestão de macronutrientes dentro do recomendado. Mais uma vez, foi observado um elevado percentual de voluntárias (64%) com a ingestão calórica aquém das

necessidades energéticas basais. Pode-se verificar que pela maioria dos voluntários terem um nível socioeconômico semelhante, apresentavam um hábito alimentar similar do ponto de vista qualitativo.

Vale ressaltar que o dia alimentar habitual busca representar o hábito alimentar, enquanto que o Rec24h não representa o hábito alimentar já que analisa a alimentação de apenas 1 dia, sendo necessários mais dias de registros alimentares, incluindo dias de semana e de final de semana.

Já em relação à alimentação analisada pelo questionário de frequência alimentar (QFA), podem ser observadas diversas inadequações porém de forma qualitativa. Mas como já mencionado o QFA foi utilizado afim de investigarmos o consumo de alimentos fontes de resveratrol e somente um dos pacientes ingeria e em baixa quantidade e somente duas vezes no mês

Segundo Freitas, Philippi e Ribeiro (2011), a avaliação do estado nutricional abrange vários métodos e técnicas, dentre os quais se destaca a avaliação do consumo alimentar. Os métodos de inquérito da ingestão alimentar podem ser classificados em retrospectivos, como o dia alimentar habitual, o Rec24h e o QFA, que avaliam o consumo passado (recente e remoto), e os prospectivos, como o registro dietético e a análise bromatológica dos alimentos, que têm a finalidade de avaliar a ingestão atual (COSTA et al., 2006).

O Rec24h e o QFA são os métodos investigativos mais utilizados em estudos epidemiológicos. O Rec24h é um método em que o entrevistado relata tudo o que consumiu no dia anterior. Entre as vantagens de sua utilização, incluem-se a rápida aplicação, recordação recente do consumo, uma vez que a proximidade do período recordado é maior do que pelos outros instrumentos, melhorando a acurácia do método; a população estudada não precisa ser alfabetizada, além de ser o método que menos propicia alteração no comportamento alimentar. Por outro lado, esse método requer capacidade do entrevistador em estabelecer um diálogo com o entrevistado, não engloba a sazonalidade, variação diária da alimentação e existe uma tendência à subestimação do tamanho das porções. Além disso, um único recordatório não reflete a ingestão habitual, devido à variação intrapessoal (COSTA et al., 2006).

Por sua vez, o QFA é caracterizado por uma lista de alimentos e uma escala de frequência em unidades de tempo, podendo conter informações sobre o tamanho das porções consumidas e abrange um período longo de tempo (no caso do presente estudo, o QFA se refere à ingestão alimentar de 1 ano atrás), permitindo englobar a sazonalidade. Para McPherson et al. (2000), o QFA consiste em um método relativamente objetivo, simples e

adaptável à população de estudo. Por outro lado, por conter uma lista de alimentos pré-estabelecida, pode não contemplar todos os alimentos disponíveis para o consumo além de utilizar medidas padronizadas. Comparado ao Rec24h, o QFA requer menos treinamento do entrevistador e pode ser aplicado em entrevista pessoal ou auto-administrado e postado ao local de pesquisa (VILLAR, 2001).

Observou-se que o grupo suplementado com resveratrol não apresentou melhora nos controles glicêmico e lipídico, corroborando com dados encontrados por Brasnyo e colaboradores (BRASNYO et al., 2011) que avaliaram o efeito da suplementação de resveratrol em um estudo duplo cego, randomizado, controlado onde 19 pacientes diabéticos foram divididos em 2 grupos: resveratrol e placebo. A suplementação foi realizada por 4 semanas e a dose de resveratrol foi de 5 mg. Sendo observada propensão na redução da resistência insulínica, no controle glicêmico e no perfil lipídico nos pacientes suplementados com resveratrol, e os autores sugerem que esses efeitos possam ser explicados pela redução no stress oxidativo.

Outro dado interessante é que o GR não apresentou concentrações séricas menores de proteína C reativa quando comparada ao GP. Esses dados contradizem os resultados encontrados por Ghanim e colaboradores (GHANIM et al., 2010) que avaliaram o efeito da ingestão de 40 mg de resveratrol em 20 adultos saudáveis, divididos em 2 grupos de 10, onde um grupo recebeu placebo e o outro grupo, resveratrol durante 6 semanas, no qual houve redução dos níveis séricos de proteína C reativa no grupo resveratrol, ao passo que no grupo placebo não houve alteração. A explicação mais plausível para esse achado deve-se ao fato de os pacientes aqui estudados serem diabéticos de longa data (média GR = 17 ± 9 anos e média GP = 12 ± 10) e terem complicações da doença que podem elevar essa proteína.

Em relação aos resultados encontrados de calorimetria indireta, gasto energético de repouso e taxa de oxidação de substratos evidenciou-se que o resveratrol não alterou nenhum desses parâmetros. No entanto, alguns pontos devem ser destacados: o resveratrol sendo considerado um mimetizador de restrição calórica, seria esperado que houvesse uma redução do gasto energético de repouso que não foi confirmado assim como no estudo de Timmers et al (TIMMERS et al., 2011). Esse autor relata em seu estudo haver um aumento do quociente respiratório pós-prandial no grupo suplementado com o resveratrol, indicando que houve uma melhor adaptação da utilização do substrato energético. Esses achados confirmam a teoria de flexibilidade metabólica, o que não corrobora com os resultados encontrados em nosso trabalho uma vez que não houve diferenças na oxidação dos substratos entre os grupos. Sendo que uma das hipóteses que justificam tal resultado seria que o trabalho citado anteriormente

avaliou sujeitos obesos sem outras patologias associadas e no atual estudo foram investigados voluntários diabéticos obesos, os quais já apresentavam a patologia instalada há longa data, o que talvez dificultasse a ação do resveratrol, e como já citado por Kelley (KELLEY et al., 1999) e Corpeleijn (CORPELEIJN et al., 2009) tais sujeitos possuem uma inflexibilidade metabólica, que resultariam na incapacidade de oxidar predominantemente carboidratos como fonte de energia após a ingestão de alimentos.

Em se tratando das limitações do presente estudo, evidenciamos inicialmente a presença de ambos os sexos o que talvez possa ter interferido nos resultados encontrados apesar que a faixa etária das mulheres foi a mesma para ambos e estas se encontravam no período de pós-menopausa o que poderia diminuir os vieses, já que as a distribuição de gordura e as alterações de composição corporal descritas após esse período são semelhantes as que ocorrem no sexo masculino. Outro ponto a ser destacado é o tamanho amostral, no entanto estudos tais como: Ghanim et al 2010 e 2011, Brasnyo et al 2011 e Timmer et al 2011, os quais também avaliaram os efeitos metabólicos da suplementação do resveratrol em diferentes patologias apresentaram um tamanho amostral semelhante e mesmo assim puderam inferir resultados positivos e/ou negativos. Por outro lado ressaltamos que o presente estudo foi pioneiro em nosso meio a investigar o efeito de uma fitoalexina em humanos com diabetes de longo período de evolução. Além disso, vale a pena chamar a atenção que a dose de resveratrol e o tempo de suplementação do presente estudo foram maiores do que as já encontradas em artigos científicos.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o presente estudo permite concluir que o efeito da adição do resveratrol à dieta hiperlipídica de camundongos C57BL/6 foi capaz de:

- gerar um menor percentual de ganho ponderal em 4 semanas de intervenção, ou seja, durante o primeiro terço do estudo;
- melhorar a tolerância à glicose através da menor área sob a curva no teste do GTT após 12 semanas de estudo;
- atenuar o aumento dos níveis de triglicerídeos séricos quando adicionados à dieta hiperlipídica e não quando associados à dieta padrão;
- aumentar significativamente os níveis de HDL-colesterol.

Além disso, o efeito da adição de resveratrol à dieta padrão de camundongos C57BL/6 foi capaz de:

- induzir uma resposta significativamente positiva na sensibilidade insulínica através da menor área sob a curva no teste do ITT após 12 semanas de estudo.

A partir destes resultados, podemos concluir que o suplemento possibilitou níveis normais de sensibilidade à insulina tanto em camundongos que receberam dieta hiperlipídica como naqueles que receberam dieta padrão.

Estes achados reforçam as evidências científicas anteriores no que diz respeito ao uso do resveratrol buscando uma resposta positiva na prevenção da hiperglicemia, utilizando para isso, doses da substância estudada em concentrações proporcionalmente superiores em relação ao peso corporal total do modelo animal (500mg/kg de peso corporal/dia), quando comparadas a outras publicações. Porém, ensaios clínicos adicionais são necessários a fim de avaliar o perfil de marcadores inflamatórios e de expressão de proteínas relacionadas à potencial ação insulimênica e modulação intestinal do resveratrol, visando com isso, reforçar os benefícios antiobesidade já conhecidos dos princípios deste ativos.

Referências Bibliográficas

[ADA] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. *Diabetes Care*; 22(1):S5–S19,1999.

ARCE,L. et al. Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 359, p. 27-38, 1998.

BARGER, J.L.; WALFORD, R.L; WEINDRUCH, R. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. **Exp Gerontol**, Nov-Dec;38(11-12):1343-51, 2003.

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Review Drug Discovery**, 5,493-506,2006

BAUR, J.A et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, 444, 337–342, 2006.

BEHER, D et al . Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. **Chem. Biol. Drug Des.**, 74, 619–624, 2009.

Beletate,V; El Dib,R.; Atallah,A.N. Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**; v.24 , n.1, 2007.

BORDONE, L; GUARENTE,L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, Apr;6(4):298-305, 2005.

BORGES, R.L. et al. Impact of weight loss on adipocytokines, C-reactive protein and insulin sensitivity in hypertensive women with central obesity. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, 89(6): p. 409-14, 2007.

BRASNYÓ, P. et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. **Br J Nutr.** , 106:383-9, 2011.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, 458:1056–1060, 2009.

CANTÓ, C. et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell Metab.** ,Mar 3;11(3):213-9, 2010.

CORPELEIJN,E ; SARIS,W.H ; BLAAK ,E.E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. **Obes Rev.**,10: 178–193,2009.

CORBY, P. **Delineamento experimental: objetivos e ciladas**. In: CORBY, P.Métodos de pesquisa em ciências do comportamento. São Paulo: Atlas,. p. 171-193, 2003

CUPPARI, L. **Guia de Nutrição: nutrição clínica no adulto**. 2ed. Rev e ampl – Barueri – SP: Manole, 2005.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009/ Sociedade Brasileira de Diabetes. – [3.ed] – Itapevi,SP. A.Araújo Silva Farmacêutica, 18-20,2009.

ESPOSITO, K. et al. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. **J Clin Endocrinol Metab.**, 87(8): p. 3864-6, 2002.

- FRAYN, K. N. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. **J Appl Physiol.**, Aug;55(2):628-34,1983.
- GHAMIM, H. et al. An Antiinflammatory and Reactive Oxygen Species Suppressive Effects of an Extract of Polygonum Cuspidatum Containing Resveratrol. **J Clin Endocrinol Metab.**, 95: E1–E8, 2010.
- HAMBROCK, A. et al . Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. **J. Biol. Chem.**,282, 3347–3356, 2007.
- HARRISON, G.G. et al. Skinfold thicknesses and measurement technique. In: LOHMAN, T.G. et al. Anthropometric standardization reference manual. **Human kinetics**, p.55-70, 1991.
- HEILBRONN, L. K. et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. **JAMA.**, Apr 5;295(13):1539-48,2006.
- HENQUIN, J.C. et al. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, 49, 1751–1760, 2000.
- HOTAMISLIGIL, G.S. ; SHARGILL, N.S. ; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259(5091): p. 87-9, 1993.
- HOWITZ, K.T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, 425, 191–196, 2003.
- JENINGA, E.H; SCHOOJANS, K; AUWERX, J . Reversible acetylation of PGC-1 α : connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. **Oncogene** 29:4617–4624,2010.
- KAEBERLEIN, M. et al. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. **PLoS Biol.**, Sep;2(9):E296. Epub 2004 Aug 24, 2004.
- KELLEY, D.E; MANDARINO, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes**, 49: 677–683,2000.
- KELLEY, D.E et al .Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol.**, 277: E1130–1141,1999.
- LAGOUGE, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, 127, 1109–1122, 2006.
- LANDRY, J. et al. (The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97: 5807–5811,2000.
- LARSON-MEYER, D.E. et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. **Diabetes Care**, 29, 1337–1344, 2006.
- LEFEVRE, M. et al . CALERIE team Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. **Atherosclerosis**, Mar;203(1):206-13, 2009.
- LIM, E.L. et al. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. **Diabetologia.**, Oct;54(10):2506-14,2011.

LUMENG, C.N.; DEYOUNG, S.M; SALTIER, A.R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 292(1): p. E166-74,2007.

MARIER, J.F. et al. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. **J Pharmacol Exp Ther.**, Jul;302(1):369-73,2002.

MORARI, J . et al .The role of proliferatoractivated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. **Metab Clin Exp**, 59:215–223,2010.

PERALDI, P. et al. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. **J Biol Chem**, , 271(22): p. 13018-22,1996.

POULSEN, M.M. et al. High-Dose Resveratrol Supplementation in Obese Men. An Investigator-Initiated, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Substrate Metabolism, Insulin Sensitivity, and Body Composition. **DIABETES**, Vol. 62,1186-1189,2013.

RAMADORI, G. et al. Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. **Endocrinology.**,150(12):5326-33,2009.

RIVERA, L. et al. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochem. Pharmacol.**, 77, 1053–1063,2009.

RUDERMAN,N.B. et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 298:E751–760,2010.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(12): p. 7265-70, 2003.

SHOELSON, S. E.; LEE,J.; YUAN,M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **Int J Obes Relat Metab Disord.**,27 Suppl 3:S49-52,2003.

SHOELSON, S. E.; LEE,J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, 116(7): p. 1793-801, 2006.

SILVA, E. P. C. Plano de amostragem utilizado no estudo de reprodução humana no distrito de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 10-22, 1967.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin. Biochem.**, 30: 91-112, 1997.

STEINBERG,G.R.; JORGENSEN, S.B. The AMP-activated protein kinase: role in regulation of skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. **Mini Rev. Med. Chem.**,7,519-526,2007.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans -resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Arch Biochem Biophys.**,391,79–89,2001.

SUN, C. et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. **Cell Metab.** 6, 307–319,2007.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Anti-diabetic effects of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1215, 34–39, 2011.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, obesity and diabetes. **European Journal of Pharmacology**, 635,1–8, 2010.

SZKUDELSKI, T. Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. **European Journal of Pharmacology**, 55, 176–181, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução: Eliane Romanato Santarém...[et al.]. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, 112(12): p. 1821-30.2003

WEINDRUCH, R. et al. Dietary restriction in rhesus monkeys: lymphopenia and reduced mitogen-induced proliferation in peripheral blood mononuclear cells. **Ageing**, Aug;9(4):304-8, 1997

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, 112(12): p. 1796-808, 2003.

[WHO] World Health Organization . **The World Health Report**. Geneva, 1997.

[WHO]World Health Organization . **Prevalence of Diabetes World Wide**, 2000.

VILARRASSA, N. et al. Effect of weight loss induced by gastric bypass on proinflammatory interleukin-18, soluble tumour necrosis factor-alpha receptors, C-reactive protein and adiponectin in morbidly obese patients. **Clin Endocrinol**, 67(5): p. 679-86,2007.

HOU, X. et al. SIRT 1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 1-20,2008

ALMEIDA, S. S; NASCIMENTO, P. C. B. D; LAUS, M. F. Determinantes Ambientais do Comportamento Alimentar e da Obesidade. In: ALMEIDA, S.S; BRAGA COSTA, T.M; LAUS, M.F; STRAATMANN,G (org). **Psicobiologia do Comportamento Alimentar**. Rio de Janeiro. Rubio, 2013. p. 63-82.

ALMEIDA, M. E. F. et al. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídios e glicemia de ratos Wistar. **Alimentos e Nutrição**.2011 v. 22, n. 3, p. 359-365.

BACKHED,F et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 2004. 101(44), 15718–15723.

BACKHED,F et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 2007. 104(3), 979–984.

BAUR,J.A; SINCLAIR,D.A. Therapeutic potential or resveratrol: the in vivo evidence, **Nat. Rev. Drug Discovery**, 2006. 5(6), 493–506.

CORREIA ML, et al. The concept of selective leptin resistance: Evidence from agouti yellow obese mice. **Diabetes**. 2002.51:439-42.

DISHCHEKENIAN, V. R. M.; ESCRIVÃO, M. A. M. S.; PALMA, D.; ANCONALOPEZ, F.; ARAÚJO, E. A. C.; TADDEI, J. A. A.C. Padrões alimentares de adolescentes obesos e diferentes repercussões metabólicas. **Revista de Nutrição**. 2011. v. 1, n. 1, p. 17-29.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, E. S. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol.** 2011; 11: 98-107.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary 39 and exercised rats. **Nutrition.** 2004. v. 20, n.2, p. 218-224.

PASTORE, A. P. et al. Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Nefrologia.** 2010. v. 32, n. 2, p. 195-200.

POLACOW, V. O.; LANCHA JÚNIOR, A. H. Dietas hiperglicídicas: efeito da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídeos, adiposidade corporal e sua associação com a atividade física e com o risco de doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.** 2007. v. 51, n. 3, p. 389-400.

RESPONDEK, F. et al. Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Modulate Intestinal Microbiota and Metabolic Parameters of Humanized Gnotobiotic Diet Induced Obesity Mice. **PLOS ONE.** 2013. 8(8): e71026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071026>.

SOUZA, F. et al. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato monossódico: estudo biométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira.** 2011. v. 16, n. 1, p. 32-45.

TACO. **Tabela Brasileira de composição de alimentos / NEPA** - Unicamp. 4. ed. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2011. 161 p.

TARDIVO, A. P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição e obesidade. **Revista Brasileira Nutrição Clínica.** 2006. v.21, n. 2, p. 117-124.

VAN SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica da obesidade. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica.** 2012. v. 6, p. 441-350.

LEHNINGER, A. L., DAVID, L. N., MICHAEL, M. C. **Princípios de bioquímica.** 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2006, p. 703-708

Anexos

ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO PARA APROVAÇÃO NA REVISTA "DIABETES & METABOLISM"

HIGH-FAT DIET INDUCED INSULIN RESISTANCE AND PANCREATIC ISLET HYPERTROPHY IN ANIMAL MODEL?

A.F Silva-Santos ^{a,*}, A. Gregorio ^b, C. Machado ^c, L.N.Z Ramalho ^d, V.M.M Suen ^e

^{a,b,c,e} LANNEM – Laboratory of Nutrition, Neuroscience and Metabolism, Department of Medicine – Division of Nutrology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil andressa.feijo.santos@gmail.com

^d Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo, CEP 14049-900, Brazil. iramalho@fmrp.usp.br

*Corresponding author: andressa.feijo.santos@gmail.com

ABSTRACT

AIM: Our main aim was to test different high-fat diets, which would be efficient for inducing a model of insulin resistance and obesity for C57BL/6 mice. **METHODS:** Twenty male C57BL / 6 mice, young adults were divided into four groups with five animals each, namely: CTR - standard diet group, HLHG - High Fat and High Carbohydrate diet group, HL45 - 45% High Fat diet group and HL60 - 60% High Fat diet group. After 4 weeks in adaptation, the experiment lasted 8 weeks. Animal feed intake and body weight, insulin and glucose tolerance tests and liver and pancreatic tissue histology were evaluated

RESULTS: We have found statistical difference on groups HL45 and HL60 in final body mass and weight gain. When evaluated the intake in grams and kcal of the groups with high fat diet showed higher intake, but the HL60 noted a higher energy efficiency. As well as HL60 showed significantly larger area under the curve and a pancreatic islet hyperplasia and infiltration of fat cells in the liver. **CONCLUSION:** A low cost diet with 60% of the total energy content as fat induced insulin resistance and suggest a pancreatic islet hypertrophy in animal model.

Keywords: High-fat diet; obesity; insulin resistance; pancreatic isle, C57BL/6 mice .

1. Introduction

Obesity is a chronic disease whose prevalence has grown rapidly becoming a worldwide epidemic. The World Health Organization (WHO) estimated in 2016 that around 1.9 billion adults worldwide are overweight, with 650 million of them obese [1]. In Brazil, data from the Ministry of Health (2017) showed that the prevalence of overweight is 57.7% among men and 50.5% among women. For obesity, the prevalence found was 18.1% for men and 19.6% for women [2].

Obesity is associated with low-grade chronic inflammation that may be the cause of comorbidities, including insulin resistance. Inflammation of visceral adipose tissue results in the accumulation of proinflammatory immune cells such as M1 macrophages, Th1 cells and B cells, leading to insulin resistance [3].

In this sense, studies in animal models have allowed the discovery and description of the pathophysiology of insulin resistance, including changes in metabolic pathways of various tissues such as adipose tissue, skeletal muscles, pancreas and liver.

ANEXO B- APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeito do Resveratrol na microbiota intestinal e nos fatores inflamatórios em modelos animais submetidos à dieta cafeteria*", registrado com o número **003/2016-1**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Vivian Marques Miguel Saen**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, 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 **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 23 de maio de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 105 camundongos C57Bl/6J machos pesando entre 20 a 30g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 23/05/2016 a 30/04/2017.

We certify that the Protocol nº 003/2016-1, entitled "*Effect of Resveratrol in intestinal microbiota and in inflammatory factors in animal in animal models submitted the cafeteria diet*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/23/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 105 male C57Bl/6J mice weighing 20-30g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 04/30/2017.

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA - FMRP - USP