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

O CONSUMO DA POLPA DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MARTIUS) DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO ATENUA A ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATAS E PROTEGE A PROLE CONTRA O EXCESSO DE LIPÍDEOS

PRISCILA OLIVEIRA BARBOSA

Ouro Preto – MG

Março, 2019

PRISCILA OLIVEIRA BARBOSA

O CONSUMO DA POLPA DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MARTIUS) DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO ATENUA A ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATAS E PROTEGE A PROLE CONTRA O EXCESSO DE LIPÍDEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica

Orientadora: Profª. Dra. Renata Nascimento de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Profª. Dra. Melina Oliveira de Souza

B238c Barbosa, Priscila Oliveira .
O consumo da polpa de açaí (Euterpe oleracea Martius) durante a gestação e lactação atenua a esteatose hepática e protege a prole contra o excesso de lipídeos [manuscrito] / Priscila Oliveira Barbosa. - 2019.
158f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Renata Nascimento de Freitas.
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

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

1. Açaí . 2. Euterpe . 3. Fígado - Doenças. 4. Lipídios - Metabolismo . I. Freitas, Renata Nascimento de . II. Silva, Marcelo Eustáquio . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 616.36

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

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

ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 15 dias do mês de março do ano de 2019, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Priscila Oliveira Barbosa, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Renata Nascimento de Freitas (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Maria Lucia Pedrosa (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Priscila Oliveira Barbosa 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "O Consumo da Polpa de Açaí (Euterpe Oleracea Mart.) Durante a Gestação e Lactação Atenua a Esteatose Hepática em Ratas e Protege a Prole Contra o Excesso de Lipídeos", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 15 de março de 2019.

Presidente: _____

Membro: Dennys Esper Corrêa Cintra - videoconferência _____

Membro: Julio Beltrame Daleprane - videoconferência _____

Membro: Maria Lucia Pedrosa _____

Membro: Renata Guerra de Sá Cota _____

Doutorando: Priscila Oliveira Barbosa _____

“Chega um momento em sua vida, que você sabe:

quem é imprescindível para você,

quem nunca foi,

quem não é mais,

quem será sempre.” (Charles Chaplin)

Dedico este trabalho aos meus pais Mauro e Rita, e meus irmãos Mauro Cézar e Felipe Augusto: vocês são a minha melhor parte.

Um agradecimento especial as agências de fomento e instituições que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Robert Gordon University (RGU) – Aberdeen – UK

Agradecimentos Pessoais

Após um ciclo de estudos na Universidade Federal de Ouro Preto, tive o privilégio de me formar em Nutrição, obter um título de mestre em Ciências Biológicas, e agora após uma longa caminhada, chego ao fim de mais uma trajetória: o doutorado. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

Meu muito obrigada a minha orientadora e amiga Renata Nascimento de Freitas, sem o seu dinamismo, apoio e força nos momentos oportunos, o desenvolvimento deste trabalho não seria possível. Obrigada por mostrar que o caminho nem sempre será fácil, mas com amor, dedicação e persistência, podemos alcançar tudo que almejamos. Sua confiança, orientação e críticas construtivas foram a fonte do meu bem-estar em seu laboratório e do êxito dos nossos projetos.

Ao professor Marcelo Eustáquio Silva, coorientador desse trabalho, por sua imprescindível ajuda com o modelo experimental e paciência ao ensinar. Se hoje eu tenho confiança em trabalhar com animais de laboratório, foi por seu incentivo e auxílio, que tornou tudo mais fácil e divertido. Obrigada também ao Jair Pastor e Cloadoaldo, pelo carinho com os animais, conselhos e palavras trocadas na sala de criação.

À minha coorientadora Melina Oliveira de Souza, que sempre se interessou em saber o que eu fazia e como eu conduzia as análises de bancada. Sou muito grata por seus comentários perspicazes e encorajamento. Obrigada por ter abraçado este projeto e tirado algumas longas horas do seu dia para discutir e enriquecer a minha escrita.

Um trabalho bem feito é construído a várias mãos, e sem a mão experiente do Dr. Wanderson G de Lima, as análises histológicas não proporcionariam dados tão relevantes. Agradeço também pelas inúmeras horas de discussão científica sobre estatística. Ao técnico André que se disponibilizou para me ajudar no preparo dos tecidos e colorações.

Aos integrantes do Laboratório de Epidemiologia Molecular, minha segunda casa durante os anos de pós-gradução. Obrigada professora Joana F do Amaral, Dra. Carla Teixeira Silva, Dra. Daniela Pala, MSc. Raiana Souza e Silva e MSc. Talita Malhagães. As conversas, os

cafés e as várias risadas tornaram o ambiente leve e agradável, propiciando o desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

Obrigada aos queridos alunos de iniciação científica pela ajuda neste projeto, Daniel de Souza Paula, Douglas Coutinho, Gabrielly Simões e Lygia Rangel, pela disponibilidade, bom humor e espírito de equipe. À Deuziane P Paiva e Maraísa Porfíria S Silva, fica registrado aqui minha apreciação por sua ajuda neste trabalho, vocês me permitiram superar inúmeros obstáculos.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Giovanna Bermano, I can't thank you enough for the opportunity, help, contributions of time and ideas to make my work a possible one. I felt motivated and encouraged every time I attended your meeting. It was a real privilege and an honour for me to share your exceptional scientific knowledge but also of your extraordinary human qualities.

The professors and colleagues of the research group that I made part in Robert Gordon University: Professor Cherry Wainwirght, Professor Gemma Barron, Ronnie Okafor, Sarah Walsh and Sara Zanini. I thank them for their companionship and for providing a so pleasurable and friendly working atmosphere. I am also truly thankful for their always prompt help, whenever I needed it.

I would like to say thanks to the friends I have done in Robert Gordon University: Benedicta Iag, Calum McNerney, Franziska Pohl, Josh Burns, Matteo Scipioni, and Serena Renzi. You provided a stimulating and fun-filled environment. Their presence was very important in a process that is often felt as tremendous solitaire. Especially Hazel Ramage and Mhairi Paul, you will always have a special place in my heart. I hope to see you soon!

Às queridas Miliane Fagundes e Ana Maria Viana, pela disponibilidade em me ajudar sempre que eu precisei nos experimentos com os animais. Teria sido um caminho tortuoso sem as "mãozinhas" ágeis de vocês. *Valeu!*

À professora Maria Terezinha Bahia por ter cedido os *kits* bioquímicos utilizados neste trabalho.

Ao professor William de Castro Borges e ao técnico Bruno Mattei pela disponibilidade em discutir técnicas de proteômica e *western blotting.*

A todos os professores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, que tanto se dispuseram a ajudar nesses últimos anos.

Aos colegas, alunos, professores, técnicos e funcionários da Escola de Nutrição, meu agradecimento por tornarem meus dias melhores apenas com um simples sorriso, por compartilhar histórias no corredor e me ajudar em experimentos que não eram do meu domínio. Obrigada em especial aos técnicos Bruno Nogueira e Raphael Borges pelas aulas particulares de química.

À querida MSc. Sttefany Viana meu muito obrigada pelo suporte com as dosagens de estresse oxidativo, pelas discussões científicas (e políticas) sempre tão agradáveis. Obrigada pela sororidade na busca de objetivos em comum. Você vai longe, mulher!

Last but not least, Ana Paula Menezes, Glenda Siqueira Viggiano e Paula Magalhães Gomes, meu muito obrigada pelas amizade, companheirismo e histórias divididas nesses últimos anos; as incontáveis risadas e inúmeros conselhos a 7000 km foram fundamentais.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincado à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos. (Isaac Newton).

Resumo

O excesso de lipídios do ambiente uterino pode desencadear o desenvolvimento e a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Compostos bioativos presentes em plantas são uma abordagem terapêutica interessante por desempenhar diferentes efeitos sobre o metabolismo. Um fruto com alto teor de compostos fenólicos e com possível efeito benéfico é o açaí, porém pouco se sabe sobre seu efeito na dieta materna hiperlipídica. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea* M.) durante a gestação e lactação, na prole de ratas Fischer alimentadas com uma dieta hiperlipídica. Vinte e oito ratas foram divididas em quatro grupos: dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HF), dieta controle mais 2% de polpa de açaí (CA) e dieta hiperlipídica mais polpa de açaí (HFA), duas semanas antes do acasalamento e durante todo o período gestacional e lactacional. O metabolismo lipídico e oxidativo das ratas foi avaliado e os filhotes machos foram estudados em dois momentos: após o nascimento (P1) e desmame (P21). Nossos resultados mostram que o grupo de ratas HFA apresentou aumento na massa corpórea e redução no peso relativo do fígado, gordura e conteúdo hepático de colesterol. Também houve uma redução na esteatose hepática no grupo de ratas HFA, entretanto, observamos aumento no colesterol sérico e da expressão de *Srebpf1* e *Fasn.* Em relação ao estado redox, foram encontrados aumento nos níveis hepáticos de malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada no grupo HF. A suplementação com polpa de açaí foi capaz de prevenir aumento no estresse oxidativo, redução dos níveis hepáticos de MDA e de proteínas carboniladas e da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no grupo HFA. Em relação a prole, encontramos um menor valor no peso absoluto do fígado nos animais HFA P1 e P21. HFA-P21 apresentou redução no colesterol sérico quando comparados com HF-P21. Também foi verificado redução na esteatose hepática de HFA-P21. Houve redução na expressão de *Srebpf1* em HFA-P1, enquanto a expressão de *Sirt1, Srebpf1* e *Fasn* aumentou no grupo HFA-P21. Não foram observadas diferenças significativas na expressão proteica de SIRT1 e SREBP1. Em relação ao estado oxidativo, não foram encontradas diferenças significativas nas enzimas antioxidantes e nos biomarcadores. Pode-se concluir que a introdução do açaí na dieta materna HF preveniu o acúmulo de gordura hepática e restabeleceu a homeostase do estado redox das ratas. Os efeitos observados na prole sugerem que a introdução de alimentos ricos em compostos bioativos, como o açaí, podem retardar o dano hepático o causado pela dieta materna HF.

Palavras-chaves: Açaí; *Euterpe oleracea* Martius; dieta materna hiperlipídica; doença hepática gordurosa não alcoólica; metabolismo lipídico; metabolismo redox.

Abstract

Excess lipids in the uterine environment may trigger the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Bioactive compounds present in plants are an interesting therapeutic approach to perform different effects on metabolism. A fruit with high content of phenolic compounds and with possible beneficial effect is the açaí (*Euterpe oleracea* Martius), but little is known about its effect on maternal high-fat diet. This study aims to evaluate the effect of açaí pulp supplementation during pregnancy and lactation, in the offspring of Fischer rats fed on a high-fat diet. Twenty-eight rats were divided into four groups: Control Diet (c), high-fat diet (HF), control diet plus 2% of açaí pulp (CA) and high-fat diet plus 2% of açaí pulp (HFA), two weeks before mating and during the whole gestational and lactational period. The lipid and oxidative metabolism of the rats was evaluated and the male pups were studied in two moments: after birth (P1) and weaning (P21). Our results show that the group of HFA dams showed an increase in body mass and a reduction in the relative liver weight, fat and hepatic content of cholesterol. Also, there was a reduction in hepatic steatosis in the group of HFA dams, however, we observed increase in serum cholesterol and the expression of *Srebf1* and *Fasn.* In relation to the redox state, an increase in hepatic levels of malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein in the HF group. The supplementation with açaí pulp was able to prevent increase in oxidative stress, reduction of the hepatic levels of MDA and carbonylated proteins, and the activity of the enzymes SOD, CAT and GPx in the HFA group. Regarding the offspring, we found a lower value in the absolute liver weight of the animals HFA P1 and P21. HFA-P21 showed a reduction in serum cholesterol when compared to HF-P21. A reduction in hepatic steatosis of HFA-P21was also observed. There was a reduction in the expression of *Srebpf1* in HFA-P1, while the expression of *Sirt1, Srebpf1* and *Fasn* increased in the HFA-P21. No significant differences were observed in the protein expression of SIRT1 and SREBP1. In relation to the oxidative state, no significant differences were found in the antioxidant enzymes and biomarkers. It can be concluded, that the introduction of açaí pulp in the HF maternal diet prevented the accumulation of liver fat and restored the homeostasis of the redox state of the dams. The effects observed in the offspring suggest that the introduction of foods rich in bioactive compounds, such as açaí, can slow down liver damage caused by the maternal HF diet.

Keywords: Açaí; *Euterpe oleracea* Martius; high-fat maternal diet; non-alcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; redox metabolism.

Lista de Figuras

Figura 1: Espectro de patologias da doença da doença hepática gordurosa não alcoólica.....26

Figura 2: Estrutura química básica dos compostos fenólicos. 40

Figura 3: Antocianinas presentes no açaí (Euterpe oleracea Martius). 45

Figura 4: Delineamento experimental.....67

Figura 5: Cortes histológicos representativos do fígado das ratas alimentadas 86

Figura 6: Grau de esteatose hepática das ratas. 86

Figura 7: Cortes histológicos representativos do fígado da prole P21.....87

Figura 8: Grau de esteatose hepática da prole P21 88

Figura 9: Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) das ratas.. 88

Figura 10: Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) da P21.....89

Figura 11: Níveis séricos de colesterol total (A), triglicérides (B), colesterol HDL (C) e colesterol não-HDL (D) das ratas.. 90

Figura 12: Níveis séricos de colesterol total (A), triglicérides (B), colesterol HDL (C) e colesterol não-HDL (D) da P21 91

Figura 13: Níveis hepáticos de gordura total (A), colesterol total (B) e triglicérides (C) das ratas.. 92

Figura 14: Níveis hepáticos de gordura total (A), colesterol total (B) e triglicérides (C) da P21.. 93

Figura 15: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado das ratas em relação à beta-2-microglobulina. 93

Figura 16: Expressão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado da prole P1 (A) e da prole P21 (B) em relação à beta-2-microglobulina ...94

Figura 17: Western blotting para SIRT1 (A) e SREBP1 (B) das ratas. 95

Figura 18: Western blotting para SIRT1 e SREBP1 para a prole P1 (A e B) e P21 (C e D)...96

Figura 19: Níveis hepáticos de MDA (A) e proteína carbonilada (B) das ratas. 97

Figura 20: Níveis hepáticos de MDA (A) e proteína carbonilada (B) da P21 98

Figura 21: Atividade das enzimas SOD (A), GPx (B) e CAT (C) no fígado das ratas.....99

Figura 22: Atividade das enzimas SOD (A), GPx (B) e CAT (C) no fígado da P21. 100

Figura 23: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo redox no fígado das ratas em relação à beta-2-microglobulina 100

Figura 24: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo redox no fígado da P1 (A) e P21 (B) em relação à beta-2-microglobulina. 101

Figura 25: Expessão gênica relativa de mRNA de Sirt3 em relação à beta-2-microglobulina 101

Figura 26: Resultados da PCR com identificação dos Gpx1, Gpx3, Gapdh e β2.....137

Figura 27: Resultados da PCR com identificação dos genes Sirt1, Sirt3, Sod1 e Sod2. 138

Figura 28: Resultado da PCR com identificação do gene Srebpf1 121 bp. 138

Figura 29: Resultados da PCR com identificação dos genes Ucp1, Fasn e Ucp2. 139

Figura 30: Curva de avaliação da eficiência do gene Gapdh. 140

Figura 31: Curva de avaliação de eficiência do gene β2 141

Figura 32: Curva de avaliação de eficiência do gene Gpx1.....142

Figura 33: Curva de avaliação de eficiência do gene Gpx4.....143

Figura 34: Curva de avaliação de eficiência do gene Sirt1.....144

Figura 35: Curva de avaliação de eficiência do gene Sirt3.....145

Figura 36: Curva de avaliação de eficiência do gene Sod1 146

Figura 37: Curva de avaliação de eficiência do gene Sod2 147

Figura 38: Curva de avaliação de eficiência do gene Srebpf1.....148

Figura 39: Curva de avaliação de eficiência do gene Fasn.....149

Figura 40: Curva de avaliação de eficiência do gene Ucp2.....150

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição de ácidos graxos presentes no açaí.....47

Tabela 2: Minerais e vitaminas presentes no açaí.....49

Tabela 3: Composição das dietas experimentais utilizadas no trabalho 66

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos 78

Tabela 5: Composição química da polpa de açaí utilizada no estudo.....82

Tabela 6: Teores de polifenóis totais e antocianinas na polpa congelada de açaí 82

Tabela 7: Atividade antioxidante pelos métodos do radical $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ para polpa congelada de açaí. 82

Tabela 8: Ingestão alimentar, peso corporal e peso do fígado das ratas 84

Tabela 9: Peso corporal e peso do fígado da prole P1e P21. 85

Lista de Abreviações

A – Dieta grupo controle suplementada com açaí
ABCG5 – do inglês, *ATP-binding cassette sub-family G member 5*
ABCG8 - do inglês, *ATP-binding cassette sub-family G member 8*
ABTS – do inglês, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ACC – Acetil-CoA carboxilase
Acetil-CoA – acetil coenzima A
ACS - acetil-CoA sintase
AGL – Ácido graxo livre
AGL – ácidos graxos livres
ALT – Alanina aminotransferase
AMPK – do inglês, *AMP-activated protein kinase*
ANOVA – Análise de variância
ARE – do inglês, *antioxidante response element*
AST – Aspartato aminotransferase
ativando proteínas forkhead (FOXO) e o co-ativador 1 ‘alfa’ do receptor ativado por proliferador do peroxissomo (PGC1α)
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – do inglês, *bovine sérum albumin*
C – Dieta grupo controle
CAP-e – do inglês, *cell-based antioxidant protection in erythrocytes*
CAT - Catalase
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX - Ciclooxigenases
CPT1 – Carnitina palmitoil transferase 1
desacopladora 2 (UCP-2),
DGAT – Diacilglicerol aciltransferase
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoolica
DMSO – Dimetil sufóxido
DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina
DOHaD – do inglês, *developmental origins of health and disease*
DP – Desvio padrão
DPPH – 2,2–Difenil–1–picril–hidrazila
EAG – Equivalente de ácido gálico
EDTA – do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*
EGF – fator de crescimento epidérmico
EGTA – do inglês, *egtazic acid*
EHNA – Esteato-hepatite não alcoolica
ER – Retículo endoplasmático
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ETC – Cadeia transportadora de elétrons
FADH2 – Flavina adenina dinucleotídeo
$FADH_{2)}$ - flavina adenina dinucleotídeo
FAS – ácido graxo sintase
GPx – Glutationa peroxidase
GR – Glutationa redutase

GSH – Glutationa reduzida
GSSG – Glutationa oxidada
H&E – Hematoxilina e Eosina
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HF – Dieta hiperlipídica
HFA – Dieta hiperlipídica suplementada com açaí
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMGCS2 – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase
IAA – Índice de atividade antioxidante
IDL- Lipoproteína de densidade intermediária
IDR – Ingestão diária recomendada
IL-6 – Interleucina 6
JNK – do inglês, *c-Jun N-terminal kinases*
KCN – Cianeto de potássio
Keap1 – do inglês, *kelch-like ECH-associated protein 1*
LCAD – Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa
LDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
MDA - Malondialdeído
MTT – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio brometo
MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados
NaCL – Cloreto de sódio
NAD+ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
P1 – Prole pós-natal
P21 – Prole pós-desmame
PAI1 - Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
Prx3 – Peroxiredoxina 3
Prx5 – Peroxirredoxina 5
PGC-1α – Co-ativador 1 ‘alfa’ do receptor ativado por proliferador do peroxissomo
PON1 – Paraoxonase 1
PPAR– receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PSMF – do inglês, *protein-sparing modified fast*
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
PVDF – do inglês, *polyvinylidene difluoride*
SIRT1 – Sirtuina 1
SIRT3 – Sirtuina 3
SOD – Superóxido dismutase
SREBP - proteína de ligação ao elemento regulador do esterol
TAG – Triacilglicerol
TEAC – do inglês, t*rolox equivalent antioxidant capacity*
TrxR2 – tioredoxina redutase 2
Trx2 – tiorredoxina 2
TMTP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF – Fator de necrose tumoral
TBST – Tris Tween-20
VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

1. Introdução 224

2. Revisão Bibliográfica 256

2.1. Doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) 26

2.1.1. Etiopatogenia 27

2.2. Programação metabólica 37

2.3. Compostos fenólicos e DHGNA 39

2.4. Açaí 42

2.4.1. Nutrientes e compostos bioativos 44

2.4.2. Efeitos benéficos do açaí – Estudos da literatura 50

3. Justificativa 57

4. Objetivos 59

4.1. Objetivo geral 60

4.2. Objetivos específicos 60

5. Metodologia 61

5.1. Polpa de açaí 62

5.1.1. Determinação da composição centesimal 62

5.1.2. Obtenção do extrato 62

5.1.3. Determinação do conteúdo de polifenóis 63

5.1.4. Determinação do conteúdo de antocianinas 63

5.1.5. Determinação da atividade antioxidante 64

5.2. Delineamento Experimental 65

5.2.1. Dietas 65

5.2.2. Animais 66

5.3. Amostra de sangue e fígado 69

5.4. Análises Morfohistológicas 69
5.5. Dosagens Bioquímicas 70
5.6. Determinação de lipídeos totais no fígado 70
5.7. Enzimas Antioxidantes 71
5.7.1. Preparo das amostras 71
5.7.2. Proteínas totais 71
5.7.3. Atividade da Catalase 72
5.7.4. Atividade da Glutationa Peroxidase 73
5.7.5. Atividade da Superóxido Dismutase 74
5.8. Marcadores do Estresse oxidativo 74
5.8.1. Proteina Carbonilada 74
5.8.2. Dialdeído Malônico 75
5.9. Expressão gênica 76
5.9.1. Isolamento do RNA total 76
5.9.2. Síntese de cDNA 76
5.9.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) 77
5.10. Western Blot 78
5.10.1. Extração proteica 78
5.10.2. Proteínas totais 79
5.10.3. Expressão proteica de SIRT1 e SREBP1 79
5.11. Análises Estatísticas 80
6. Resultados 81
6.1. Polpa de açaí 82
6.1.1. Composição físico-química 82
6.1.2. Teor de polifenóis e antocianinas 82
6.1.3. Capacidade antioxidante 82

6.2. Caracterização da DHGNA 83
6.3. Metabolismo lipídico 89
6.4. Metabolismo redox 96
7. Discussão 102
8. Conclusão 114
9. Perspectivas 116
10. Referências 118
11. Anexos 135
Anexo I – Certificado CEUA 136
Anexo II – Otimização PCR 137
Otimização 139
Anexo III – Artigo Publicado 151
Anexo IV – Artigo em progresso 152

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo de triglicérides nos hepatócitos. Esta doença abrange um espectro de condições patológicas que variam desde esteatose hepática simples a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) caracterizada pela presença de inflamação, que pode progredir para cirrose ou carcinoma hepático (BRUNT, 2010).

A alta prevalência de DHGNA em crianças e adolescentes na última década tem chamado a atenção dos pesquisadores, aumentando o número de estudos nesta área a fim de explicar essa ocorrência (PAPANDREOU, ROUSSO, MAVROMICHALIS, 2007; MARZUILLO, DEL GIUDICE, SANTORO, 2014). Os estudos epidemiológicos têm colocado em evidência a ligação entre as fases periconceptuais, fetais e infantis, e o desenvolvimento e progressão da obesidade, bem como das doenças metabólicas associadas com o aumento da adiposidade (CHEN et al., 2017; MCGILLICK et al., 2017) . Neste sentido, a exposição do feto durante a gestação e lactação provenientes da dieta e/ou obesidade materna poderia justificar o desenvolvimento precoce de DHGNA na população pediátrica. Este fenômeno tem sido chamado de programação metabólica, e pode ser definido como uma modificação no metabolismo do feto, devido a condições adversas do útero, que implica em uma resposta permanente após o nascimento (LUCAS, 1991).

A dieta hiperlipídica tem sido amplamente utilizada na literatura para induzir a DHGNA em modelos animais experimentais e o consumo dessa dieta reflete o cenário mundial atual, no qual o consumo excessivo de lipídios pode contribuir para o aumento das doenças hepáticas na população (SPEAKMAN et al., 2008; WILLIAMS et al., 2014). Na última década, houve um progresso considerável na compreensão de como o excesso de ingestão de lipídios via dieta materna altera as vias metabólicas no útero, predispondo o feto ao acúmulo de gordura no fígado e, consequentemente, o desenvolvimento de DHGNA na vida adulta (HUGHES, OXFORD, 2014).

Diversas vias metabólicas têm se destacados no desenvolvimento e progressão da DHGNA, é o caso das sirtuínas, uma família de proteínas dependentes dos níveis intracelulares de NAD+, que desempenham um importante papel no metabolismo energético (SACCONNAY, CARRUPT, NURISSO, 2016). A sirtuína 1 (SIRT1) e a sirtuína 3 (SIRT3) têm sido extensivamente estudadas devido ao seu envolvimento em vários processos metabólicos relacionados ao metabolismo lipídico e oxidativo. SIRT1 desacetila a proteína de

ligação ao elemento regulador do esterol (SREBPs) promovendo a inibição de sua atividade (PONUGOTI et al., 2010). SREBPs são fatores de transcrição e três diferentes isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2, estão presentes em células de mamíferos Os SREBPs ativam diretamente a expressão de mais de trinta genes relacionados à síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicérides e fosfolipídios, além de aumentar a expressão de genes envolvidos na geração do NADPH, um cofator necessário utilizado em reações anabólicas como metabolismo lipídico (EBERLE et al., 2004). Em geral, o SREBP-1 regula a transcrição de genes lipogênicos, variando de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos a síntese de colesterol. Estudos avaliando o efeito da dieta materna têm mostrado que o excesso de lipídios pode reduzir a expressão e a atividade da SIRT1 no fígado de mães e filhos, causando alterações no metabolismo hepático e promovendo o acúmulo de gordura (MCCURDY et al., 2009; SUTER et al., 2012).

SIRT3 se localiza na mitocôndria, e é necessária para a manutenção da integridade mitocondrial sob condições de estresse oxidativo (SACCONNAY, CARRUPT, NURISSO, 2016). Estudos com ratos mostraram que a descontinuação da atividade da SIRT3, seja por modificação genética ou por dieta hiperlipídica materna, está associada ao desenvolvimento acelerado de disfunções metabólicas semelhantes à síndrome metabólica em humanos (AHN et al., 2008). Embora a redução da expressão e / ou atividade da SIRT3 esteja provavelmente ligada à redução da função mitocondrial e da capacidade oxidativa, o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), em resposta à oxidação prejudicada dos ácidos graxos, pode alterar a função da SIRT3 (BAO et al., 2010).

Embora as pesquisas com a DHGNA tenham alcançado progresso considerável, ainda não há fármacos específicos para o tratamento da DHGNA. A estratégia terapêutica se concentra em prevenir a cirrose e retardar a progressão ou reverter o quadro de fibrose. Normalmente as intervenções envolvem mudanças no estilo de vida. A maioria dos profissionais visa o tratamento da DHGNA utilizando dieta e exercício, incluindo substâncias antioxidantes. Estudos com terapia antioxidante têm despertado entusiasmo sobre a possibilidade de tratar a doença. Doenças do fígado, especialmente aquelas que envolvem um processo inflamatório, resultam em estresse oxidativo. Receptores de elétrons não enzimáticos, substâncias antioxidantes como vitaminas E, C e polifenóis podem desempenhar um papel importante na proteção da membrana celular, inibindo a disseminação de danos causados pelos radicais livres e a progressão de esteatose simples para esteato-hepatite

(QUIDEAU et al., 2011). Compreender o papel regulador e os mecanismos pelos quais estes compostos dietéticos naturais podem modular o metabolismo redox sugere uma abordagem eficaz para proteger e atenuar distúrbios metabólicos precoces desenvolvidos a partir de uma dieta materna rica em gordura.

O açaí (*Euterpe oleracea* Martius), uma fruta amazônica, com alto teor de compostos fenólicos, tem sido alvo de pesquisas que buscam avaliar seu potencial efeito benéfico na saúde (SCHAUSS et al., 2006a; YAMAGUCHI et al., 2015). Trabalhos recentes avaliaram o efeito do açaí na patologia da DHGNA, e demonstraram uma ação hepatoprotetora desse fruto ao modular a expressão de genes envolvidos na sinalização da adiponectina, lipogênese e oxidação de ácidos graxos (GUERRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito do açaí nos mecanismos moleculares envolvendo o metabolismo hepático e lipídico na DHGNA induzida pela dieta materna hiperlipídica e seu efeito na prole.

Portanto, considerando que a dieta e a obesidade materna têm sido descritas como uma das formas de aumentar a susceptibilidade de DHGNA na população pediátrica, e que os compostos dietéticos têm sido usados como forma de prevenir o desenvolvimento de DHGNA, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de açaí sobre a programação metabólica da DHGNA, induzida por uma dieta hiperlipídica na prole de ratas Fischer. Nossa hipótese é que, em virtude da composição nutricional e do alto teor de polifenóis, a suplementação de açaí na dieta das mães protege as mesmas e sua prole contra a DHGNA induzida pela dieta hiperlipídica, através de vias relacionadas ao metabolismo lipídico e/ou oxidativo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA)

A DHGNA é definida por um acúmulo excessivo de triacilgliceróis (TAG) no fígado. Esta doença abrange um espectro de patologias que vão desde esteatose hepática simples até uma EHNA caracterizada pela presença de inflamação, podendo progredir para cirrose ou carcinoma hepático (BRUNT, 2010; COHEN, HORTON, HOBBS, 2011). O diagnóstico da EHNA é feito através de biópsia com confirmação da presença de mais de 5% de esteatose hepática e sua identificação leva em consideração características histopatológicas que combinam esteatose com degeneração hidrópica, corpúsculos de Mallory, inflamação lobular e fibrose pericelular (KLEINER et al., 2005).

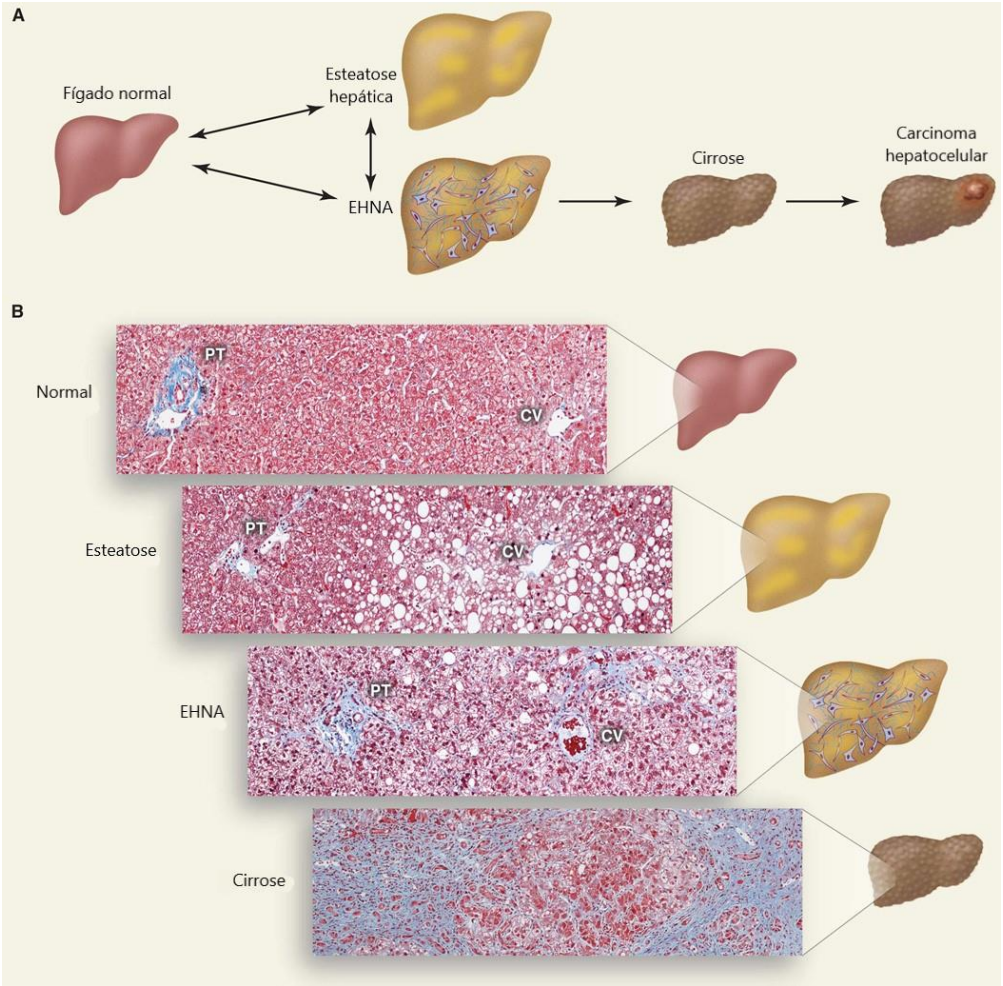


Figura 1: Espectro de patologias da doença da doença hepática gordurosa não alcoólica. (A) Esquema da progressão da DHGNA. O acúmulo de TAG nos hepatócitos causa esteatose. A esteatose associada à inflamação, morte celular e fibrose é chamada de EHNA, que pode progredir para cirrose. Indivíduos com cirrose têm um risco aumentado de carcinoma hepatocelular. (B) Secções histológicas ilustrando fígado normal, esteatose hepática, EHNA e cirrose. As fibras de colágeno são coradas de azul com o tricrômico de Masson. PT: tríade portal, que consiste na artéria hepática, veia porta e ducto biliar; CV: veia central.
Fonte: Cohen, Horton et al., 2011.

A prevalência de DHGNA tem aumentado exponencialmente em paralelo com o aumento dramático da obesidade, e está rapidamente se tornando a causa mais comum de doença hepática em países ocidentais (BYRNE, TARGHER, 2015). Um recente estudo de meta-análise mostra que a DHGNA é altamente prevalente em todos os continentes, mas as maiores taxas são relatadas na América do Sul (31%) e no Oriente Médio (32%), seguidas pela Ásia (27%), EUA (24%) e Europa (23%), enquanto é menos comum na África (14%) (YOUNOSSI et al., 2016). A taxa de DHGNA na população global está em aumento constante (15% em 2005 para 25% em 2010) e, da mesma forma, a incidência de EHNA no mesmo período quase dobrou, indo de 33% para 59,1% (YOUNOSSI et al., 2016).

Além dos números alarmantes para a população global, a ocorrência em crianças e adolescentes nos últimos anos tem chamado a atenção dos pesquisadores. Os trabalhos epidemiológicos sugerem que aproximadamente 2,6% das crianças e 9,6% dos adolescentes sejam afetados pela esteatose hepática; a prevalência sobe para 12% podendo variar até 80% em crianças obesas (ANDERSON et al., 2015). Ademais, a obesidade na infância está associada a desfechos clínicos adversos e maior risco de progressão para EHNA e cirrose (GOYAL, SCHWIMMER, 2016). Espera-se que, na próxima década, a DHGNA na população infantil se torne a causa mais prevalente de insuficiência hepática e uma indicação para o transplante de fígado em crianças e adolescentes no mundo ocidental (TEMPLE et al., 2016).

2.1.1. Etiopatogenia

Os mecanismos etiopatogênicos responsáveis pelo desenvolvimento da DHGNA ainda permanecem mal compreendidos. Efeitos dietéticos sobre o metabolismo lipídico e hormonal, o estresse oxidativo, a ativação de vias inflamatórias em decorrência da obesidade, e a influência de fatores genéticos são reportados como alterações que contribuem independentemente ou em conjunto para o surgimento da DHGNA (ZIVKOVIC, GERMAN, SANYAL, 2007; COHEN, HORTON, HOBBS, 2011; TAKAKI, KAWAI, YAMAMOTO, 2013). A teoria dos dois eventos *("two hits")* proposta por Day e James em 1998 fornece uma base científica para explicar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DHGNA (DAY, JAMES, 1998). O primeiro *"hit"* seria o acúmulo de TAG no fígado em decorrência do aumento da síntese ou entrega de ácidos graxos ao fígado, diminuição da capacidade de oxidar os ácidos graxos e redução da exportação de TAG. O tecido hepático então se torna susceptível a sinais que envolvem o segundo *"hit"*, levando a aumento do estresse oxidativo,

ativação de cascatas inflamatórias, que por sua vez levam a esteato-hepatite e fibrose do tecido.

Entretanto, em vista da complexidade da DHGNA, a teoria mais debatida atualmente na literatura é o modelo dos múltiplos *hits*, onde todos esses fatores paralelos agem sinergicamente no desenvolvimento e progressão da doença. Neste modelo, a resistência insulínica é a condição inicial para o desenvolvimento da DHGNA, favorecendo a lipogênese e inibindo a lipólise. Este evento é seguido dos múltiplos *hits* que envolvem o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, produção de citocinas inflamatórias, alteração da microbiota intestinal, entre outros fatores (BUZZETTI, PINZANI, TSOCHATZIS, 2016).

Nesta seção, os potenciais mecanismos implicados na patogênese e progressão da DHGNA serão abordados.

2.1.1.1. Metabolismo lipídico

Os TAG que são depositados nos hepatócitos são formados a partir de uma reação de esterificação de três ácidos graxos livres (AGL) com o glicerol. Estes ácidos graxos chegam ao fígado a partir de diferentes vias: lipólise do tecido adiposo, diminuição da β-oxidação mitocondrial ou da exportação de TAG como partícula de VLDL, lipogênese *de novo* e fontes alimentares (COHEN, HORTON, HOBBS, 2011; BYRNE, TARGHER, 2015). A deposição hepática de gordura parece ser o resultado da alteração de todas essas vias lipídicas.

A lipólise (hidrólise de TAG) nos adipócitos é controlada por vias hormonais. No estado alimentado, níveis circulantes mais altos de insulina inibem a lipólise, enquanto que, durante o jejum, as catecolaminas favorecem a lipólise. Além do armazenamento de energia, a absorção de AGL circulantes pelo tecido adiposo, também é fundamental para evitar danos a outros órgãos induzidos pela deposição ectópica de ácidos graxos - um processo conhecido como lipotoxicidade (CUSI, 2012). Desta forma, os adipócitos atuam como um "tampão de energia", tanto para armazenar energia para uso futuro quanto para prevenir efeitos prejudiciais de AGL em outras partes do corpo. Todos esses efeitos são prejudicados na condição fisiológica conhecida como resistência à insulina, e é o que torna este evento um importante fator desencadeante da esteatose hepática (GEISLER, RENQUIST, 2017; PARKER, 2018). O descontrole na sinalização insulínica prejudica toda a amplificação do

sinal, promove o bloqueio da captação de glicose e estimula o aumento da lipólise no tecido adiposo, contribuindo para a entrega de AGL para o fígado.

Os AGL que chegam ao fígado podem ser absorvidos pela mitocôndria e sofrer beta-oxidação para geração de energia e corpos cetônicos (BARTLETT, EATON, 2004). O processo é iniciado pela entrada facilitada dos acil-Coa para o interior da mitocôndria através da enzima carnitina-palmitoil-transferase-1 (CPT-1). Os acil-CoA graxos são convertidos em acil-carnitina pela CPT-1 que promove a translocação para o espaço mitoncondrial (EATON, BARTLETT, POURFARZAM, 1996). Longas cadeias de acil-cartinina sofrem beta-oxidação e liberam acetil-CoA que será usado no ciclo do ácido tricarboxílico, liberando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_{2)}$ para geração de ATPs (EATON, BARTLETT, POURFARZAM, 1996).

Estudos têm mostrado que o excesso de AGL além da capacidade oxidativa da mitocôndria, pode promover uma disfunção mitocondrial e reduzir a sua capacidade oxidativa (KOHJIMA et al., 2007; BEGRICHE et al., 2013). Quando a capacidade de oxidação lipídica hepática é excedida, os lipídios passam a ser depositados no hepatócito, contribuindo ainda mais para a esteatose hepática.

Os AGL não direcionados para beta-oxidação pela CPT-1 podem ser esterificados novamente como TAG e embalados e exportados em partículas de VLDL. As VLDL são compostas por TAG, ésteres de colesterol, fosfolipídios e apoliproteínas (apo) B-100, C-I, C-II e E (NELSON, COX, 2011). ApoB 100 é uma apoB específica do fígado que é crítica na montagem de VLDL, que ocorre inicialmente no retículo endoplasmático (ER) (BLASIOLE, DAVIS, ATTIE, 2007). Parece que as principais funções da secreção hepática de VLDL envolvem o tamponamento dos níveis de AGL do plasma através da sua conversão em TAG e exportação via lipoproteína, proporcionando assim uma fonte de combustível lipídica alternativa prontamente disponível. Uma outra função, mas menor, é mobilizar o lipídeo hepático sintetizado a partir da lipogênese *de* novo. Os relatos na literatura mostram que em condições de EHNA, a exposição prolongada do fígado a AGL promoveria estresse de ER e outros estresses oxidativos no fígado, levando à degradação de apoB 100, diminuição na secreção de VLDL, e piora da esteatose hepática (TACER, ROZMAN, 2011).

O mecanismo da lipogênese (síntese de TAG) pode ser empregado para se referir a toda e qualquer síntese de lipídeos, incluindo a síntese endógena de ácidos graxos a partir dos

carboidratos e aminoácidos, conhecida como lipogênese *de novo* (PARRY, HODSON, 2017). Durante esse processo, o piruvato resultante da glicólise entra na mitocôndria onde é convertido em acetil-coenzima A (acetil-CoA) para o metabolismo no ciclo do ácido tricarboxílico (NELSON, COX, 2011). Quando os estoques de energia estão em excesso, os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico começam a se acumular, resultando no transporte de citrato da mitocôndria para o citoplasma, onde é decomposto pela enzima ATP citrato liase a acetil-CoA e oxaloacetato. O citrato é um ativador alostérico da acetil-CoA carboxilase (ACC) e catalisa a conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, que é a principal fonte de carbono para a síntese de ácidos graxos e é considerada a etapa limitante da velocidade na via da síntese de lipídeos (NELSON, COX, 2011). O passo seguinte envolve a ação da enzima ácido graxo sintase (FAS), que usa o malonil-CoA para alongar a cadeia de ácido graxo. Todo o processo de síntese de ácidos graxos, envolve regulação em diferentes níveis, mas uma família tem destaque especial nesse processo: SREBPs.

SREBPs são fatores de transcrição, e apresentam três diferentes proteínas codificadas pelo genoma dos mamíferos: SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2. As proteínas SREBP-1a e SREBP-1c são derivados de um único gene, enquanto que SREBP-2 é codificado em um local de transcrição diferente (BROWN, GOLDSTEIN, 1997). Os SREBPs ativam diretamente a expressão de mais de trinta genes relacionados à síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicérides e fosfolipídios, além de aumentar a expressão de genes envolvidos na geração de NADPH, um cofator necessário utilizado em reações anabólicas como metabolismo lipídico (HORTON, GOLDSTEIN, BROWN, 2002; EBERLE et al., 2004). Em geral, SREBP-1a é um potente ativador de todos os genes responsivos ao SREBP, incluindo aqueles que medeiam a síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicérides. Os papéis do SREBP-1c e do SREBP-2 são mais restritos que o do SREBP-1a. O SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes necessários para a síntese de ácidos graxos, mas não a síntese do colesterol (BROWN, GOLDSTEIN, 1997).

A DHGNA está frequentemente associada a perturbações metabólicas que envolvem a superativação de SREBP1 e seus genes alvos. No fígado normal, a síntese de ácidos graxos é regulada positivamente pelo fator de transcrição SREBP-1c, e na sobrecarga de ácidos graxos, a síntese de ácidos graxos de novo é suprimida através da regulação negativa do SREBP-1c. Entretanto, na DHGNA, parece ocorrer uma superexpressão de SREBP-1c, o que impede o *feedback* negativo via SREBBP-1c (KOHJIMA et al., 2007). Estes dados são

confirmados em diversos modelos murinos de obesidade induzida por dieta, deficientes em leptina e em camundongos db/db, onde a superexpressão de SREBP-1c hepático leva ao desenvolvimento de um fígado gorduroso devido ao aumento da lipogênese (ARAGNO et al., 2009; MOON et al., 2012; PERFIELD et al., 2013).

Em virtude disso, os mecanismos de controle e ativação dos fatores de transcrição da família SREBP têm sido estudados como possível tratamento da esteatose hepática (AHMED, BYRNE, 2007). As abordagens terapêuticas têm como alvo principalmente as vias envolvidas com o metabolismo lipídico e energético; dentre elas, a via das sirtuinas ganhou destaque devido ao seu envolvimento em vários processos metabólicos (DING, BAO, DENG, 2017).

As sirtuinas (SIRT) são uma família de proteínas atualmente classificadas como histonas desacetilase de classe III (HDAC) (SACCONNAY, CARRUPT, NURISSO, 2016). Em contraste com as HDAC de classe I, II e IV, as SIRT são enzimas dependentes dos níveis intracelulares de NAD^+, desempenhando um importante papel no metabolismo energético (FINKEL, DENG, MOSTOSLAVSKY, 2009). Existem sete isoformas de sirtuinas descritas em mamíferos (SIRT1-7) que são amplamente expressas em diferentes órgãos como fígado, cérebro, coração, timo, rins, tecido adiposo branco, entre outros (FRYE, 2000). A localização celular de cada isoforma influencia sua atividade e ação. SIRT1, SIRT6 e SIRT7 são encontradas principalmente no núcleo, onde podem exercer a sua atividade através da regulação da estabilidade do DNA, expressão gênica, manutenção da estrutura da cromatina e/ou progressão do ciclo celular; SIRT2 é encontrado no citoplasma e desempenha função sobre α-tubulina, sugerindo um papel na manutenção da arquitetura celular e divisão; SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são SIRTs mitocondriais que interagem principalmente com proteínas não histonas nas quais exercem a sua atividade catalítica (MICHISHITA et al., 2005).

A sirtuina melhor estudada é a SIRT1 e ela tem sido implicada em uma grande variedade de processos metabólicos, em particular na regulação do metabolismo dos lipídeos e da glicose (KEMPER, CHOI, KIM, 2013). Estudos sugerem que os níveis de expressão e atividade desacetilase de SIRT1 são constitutivamente diminuídos sob condições patológicas (PONUGOTI et al., 2010; WALKER et al., 2010). A atividade desacetilase de SIRT1 também foi demonstrada como inibida pela diminuição dos níveis intracelulares de NAD+ em condições de esteatose hepática em camundongos (YOSHINO et al., 2011). O estresse metabólico induzido por uma dieta rica em gordura aumenta a interação entre SIRT1 e

DBC1, resultando na diminuição da atividade da desacetilase SIRT1 (ESCANDE et al., 2010). Ao contrário da regulação fisiológica normal desta proteína, a regulação transcricional da SIRT1 em condições patológicas ainda permanece mal compreendida. Além disso, permanece em grande parte desconhecido se as modificações pós-traducionais SIRT1 regulam negativamente os níveis de expressão e atividades da SIRT1 sob condições patológicas (SCHUG, LI, 2011).

No fígado, SIRT1 regula o metabolismo dos lipídeos através da desacetilação da família de fatores de transcrição SREBPs. Análises proteômicas concomitante a estudos mecanísticos revelaram que SREBP-1c é acetilada pela histona acetiltransferase p300 e desacetilada por SIRT1 nos resíduos de lisina 289 e 309, e que a desacetilação de SREBP-1c por SIRT1 regula negativamente a atividade transcricional de SREBP-1c promovendo a ubiquitinação e possivelmente, degradação pelo proteassoma (PONUGOTI et al., 2010; WALKER et al., 2010). Consistentemente, o tratamento com ativadores de pequenas moléculas de SIRT1 diminuiu os níveis nucleares de SREBP-1c, enquanto os inibidores de SIRT1 aumentaram os níveis (WALKER et al., 2010). Além disso, a desacetilação por SIRT1 inibiu a ligação de SREBP-1c aos seus genes lipogênicos alvo. Notavelmente, enquanto os níveis de acetilação SREBP-1c foram dinamicamente regulados em resposta a jejum e alimentação em condições fisiológicas normais, os níveis de acetilação SREBP-1c foram constitutivamente elevados em fígados gordurosos de ratos obesos (PONUGOTI et al., 2010). Consistente com o papel da SIRT1 na regulação negativa da SREBP-1c, a superexpressão hepática mediada por adenovírus da SIRT1 ou o tratamento com resveratrol por 1 semana diminuiu os níveis de acetilação da SREBP-1c nesses camundongos com perfis de expressão gênica compatíveis com efeitos metabólicos benéficos (Ponugoti, et al. 2010).

Além disso, a capacidade de SIRT1 em regular o metabolismo lipídico foi demonstrada em estudos relacionando a baixa expressão de SIRT1 com diminuição da β-oxidação. A β-oxidação de ácidos graxos é uma das principais formas de utilização de TAG no fígado em condições de energia limitada, e os reguladores transcricionais, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARα) e o co-ativador 1 ‘alfa’ do receptor ativado por proliferador do peroxissomo (PGC-1α), desempenham papéis-chave nesse processo (RODGERS et al., 2005; RODGERS et al., 2008; PURUSHOTHAM et al., 2009). Rodgers e colaboradores (20005) diminuíram o mRNA de SIRT1 através de um adenovírus e relacionaram a baixa expressão de SIRT1 com redução gênica da β-oxidação e

de genes alvos. Este achado vai de encontro aos dados da literatura, em que camundongos *knockout* para SIRT1 hepática apresentam sinalização diminuída de PPARα e diminuição da expressão de genes envolvidos na β-oxidação, enquanto a superexpressão de SIRT1 leva ao aumento da sinalização transcricional de PPARα. Além disso, os camundongos *knockout* foram mais suscetíveis ao ganho de peso induzido por dieta rica em gordura e à esteatose hepática (PURUSHOTHAM et al., 2009).

Diversas evidências apontam também para um papel fundamental de SIRT3 no organismo como um emergente regulador do estresse metabólico, particularmente relevante para a função das mitocôndrias (LOMBARD et al., 2007; AHN et al., 2008). SIRT3 é a sirtuína mitocondrial mais estudada, é uma proteína solúvel localizada na matriz mitocondrial. Estudo realizado em camundongos *knockout* para SIRT3 no fígado, mostra que 65% de todas as proteínas presentes nas mitocôndrias têm pelo menos uma lisina acetilada (HEBERT et al., 2013). Vários alvos de SIRT3 foram identificados, tais como acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD), uma enzima envolvida na primeira reação do processo de oxidação de ácidos graxos, a enzima mitocondrial 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase 2 (HMGCS2, pertencente à família da HMG-CoA sintase) que está envolvida na formação de corpos cetônicos e na enzima mitocondrial acetil-CoA sintase (ACS) que converte acetato em acetil-CoA (FUJINO et al., 2001; HIRSCHEY et al., 2010; SHIMAZU et al., 2010). A SIRT3 também regula os níveis de acetilação do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e regula a síntese de ATP (AHN et al., 2008). Além disso, a succinato desidrogenase (uma das subunidades do complexo II) foi identificada como um alvo direto da SIRT3, sugerindo um papel da SIRT3 na regulação do complexo II (CIMEN et al., 2010; FINLEY et al., 2011).

A SIRT3 é regulada durante condições de estresse nutricional. Estudos recentes em camundongos deficientes em SIRT3 demonstraram que o jejum reduz a oxidação de ácidos graxos e a produção de ATP, e isso foi associado ao aumento do conteúdo hepático de TG (HIRSCHEY et al., 2010). Em contrapartida, o excesso calórico também é capaz de reduzir a atividade da SIRT3 hepática, prejudicando a função mitocondrial e induzindo a hiperacetilação de várias proteínas mitocondriais (HIRSCHEY et al., 2011a; HIRSCHEY et al., 2011b). A alimentação crônica com excesso de gordura suprime a expressão de SIRT3, aumenta a acetilação da proteína mitocondrial e, em última análise, reduz a oxidação de ácidos graxos. Os camundongos sem SIRT3 sob dieta hiperlipídica mostram características

aceleradas da síndrome metabólica, como obesidade, resistência à insulina, hiperlipidemia e EHNA (HIRSCHEY et al., 2011b).

Por último, mas não menos importante, a dieta tem um papel fundamental no desenvolvimento da DHGNA (MCCARTHY, RINELLA, 2012). O balanço energético positivo tem impactos importantes sobre o controle e progressão da doença. Dietas ricas em ácidos graxos saturados induzem um aumento na gordura hepática e na resistência à insulina em comparação com dietas isocalóricas enriquecidas com ácidos graxos monoinsaturados ou poli-insaturados (MCCARTHY, RINELLA, 2012). Os mecanismos pelos quais a gordura saturada modula o metabolismo hepático são incompletamente compreendidos. Vale ressaltar que vários processos inflamatórios/oxidativos e outras vias metabólicas afetadas pelo excesso de gordura, têm sido propostas para contribuir com a patogênese da DHGNA (LEAMY, EGNATCHIK, YOUNG, 2013). Os desencadeantes inflamatórios, incluindo o LPS, promovem a liberação de citocinas induzida por TLR4 pelas células de Kupffer, resultando em resistência à insulina mediada por JNK; os ácidos graxos saturados promovem lesão da mucosa intestinal e distúrbios da flora bacteriana, resultando no aumento da permeabilidade do epitélio intestinal induzido por endotoxina e translocação bacteriana (ZHANG, YANG, 2016); ademais, o aumento de AGL no fígado ocasiona uma sobrecarga na β-oxidação levando também ao aumento de ERO e concomitantemente do estresse oxidativo, que por sua vez exacerba a lipotoxicidade favorecendo a progressão da esteatose simples para EHNA.

2.1.1.2. Metabolismo oxidativo

O termo “estresse oxidativo” foi introduzido na biologia há 30 anos e o seu conceito baseava-se na “perturbação do equilíbrio pró-oxidante e antioxidante, em favor do primeiro” (Sies, 1985). A definição atual inclui o papel das ERO na sinalização celular e descreve o estresse oxidativo como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, conduzindo à ruptura da sinalização redox e dos mecanismos de controle” (Sies, 2007).

O mecanismo mais bem estudado envolvendo o papel do estresse oxidativo e da DHGNA talvez seja a disfunção mitocondrial (BEGRICHE et al., 2013). A sobrecarga de AGL nas mitocôndrias pode levar a um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Esta ocorrência leva à dissipação do potencial de membrana e à perda da capacidade de síntese de ATP, resultando em um comprometimento da função

mitocondrial e uma geração de ERO aumentada (BORNIQUEL et al., 2007). O aumento da oxidação de ácidos graxos promove um aumento do fluxo de elétrons na ETC, podendo gerar um "vazamento de elétrons" (devido à redução da atividade dos complexos ETC), garantindo uma reação direta entre elétrons e oxigênio, levando à formação de ERO, ao invés da reação normal mediada pela citocromo C oxidase que combina oxigênio e prótons para formar água (GRATTAGLIANO et al., 2012). A perda do citocromo C pelas mitocôndrias produz três vezes mais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do que as mitocôndrias não-depletadas (KUSHNAREVA, MURPHY, ANDREYEV, 2002). A beta-oxidação incompleta conduz ao acúmulo de acil-carnitinas de cadeia longa, ceramidas e diacilgliceróis, intermediários lipotóxicos que podem ativar a cascata de sinalização inflamatória (PATTERSON et al., 2016). Parece haver um ciclo vicioso entre a capacidade oxidante mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, sendo pensado como uma das bases para o desenvolvimento da esteato-hepatite.

Os níveis de ERO são controlados por um sistema complexo de defesas que limitam o acúmulo de oxidantes, incluindo enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas, tioredoxinas e tiorredoxinas redutases, e as enzimas envolvidas no controle dos níveis e do estado redox da glutationa (BORNIQUEL et al., 2007). Dado o papel fundamental desempenhado pelas mitocôndrias na produção de ERO em decorrência da oxidação de ácidos graxos, esta organela é provida de proteínas antioxidantes, incluindo a proteína desacopladora 2 (UCP-2), que previne a geração mitocondrial excessiva de ERO, e enzimas desintoxicantes como Mn superóxido dismutase (MnSOD), glutationa peroxidase 4 (GPx4), peroxirredoxina 5 (Prx5), tiorredoxina 2 (Trx2) e tioredoxina redutase 2 (TrxR2), e as isoformas mitocondriais de peroxiredoxina 3 (Prx3) e glutationa peroxidase 1 (GPx1), entre outras (BORNIQUEL et al., 2007). Anormalidades mitocondriais alteram o equilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes, levando a um aumento de ácidos graxos não metabolizados no citosol e a consequente indução no aumento da produção de ERO (ROLO, TEODORO, PALMEIRA, 2012). A disfunção pode ocorrer por múltiplos mecanismos, que vão desde danos ao DNA mitocondrial até desequilíbrio sirtuínico.

SIRT1 tem um efeito regulador indireto no estresse oxidativo, ativando proteínas *forkhead* (FOXO) e PGC1α, envolvidas na transcrição de genes de enzimas antioxidantes e na capacidade desintoxicante de ERO (OLMOS et al., 2013; LI et al., 2015). Já SIRT3 tem a função de regular a capacidade antioxidante da célula através da modulação direta das

principais enzimas antioxidantes que atuam na prevenção de danos oxidativos (BAUSE, HAIGIS, 2013). Os efeitos antioxidantes da SIRT3 são mediados em parte pela sua interação com MnSOD e isocitrato desidrogenase 2 (IDH2) (SOMEYA et al., 2010; TAO et al., 2010). SIRT3 desacetila diretamente a SOD2 nas mitocôndrias e aumenta sua capacidade de eliminar ERO. Camundongos *knockout* para SIRT3 exibem diminuição da atividade da SOD2 e aumento do estresse oxidativo, sugerindo um papel da SIRT3 na EHNA (BAO et al., 2010).

SIRT1 e 3 usam o NAD+ como co-fator e induzem várias melhorias metabólicas em diferentes tecidos (HOUTKOOPER et al., 2010). Sendo assim, é possível que a depleção de NAD+ possa contribuir para a disfunção mitocondrial, obstruindo a resposta adaptativa mediada via SIRT a altos níveis hepáticos de AGL. Em conjunto, esses resultados sugerem que a regulação negativa de SIRT1 e 3 no fígado, pode ter um papel na fisiopatologia da esteatose hepática associada ao estresse oxidativo.

Outros mecanismos implicados na patogênese da DHGNA incluem estresse do retículo endoplasmático e crescimento bacteriano no intestino com aumento da permeabilidade intestinal. O estresse do ER pode ser causado por uma variedade de estresses biológicos, incluindo hiperinsulinemia e hiperlipidemia, e pode resultar na ativação de várias vias que levam a inflamação, apoptose e disfunção mitocondrial (ZHANG et al., 2014). O supercrescimento bacteriano resulta na produção e liberação de lipopolissacarídeos, os quais podem ativar a produção de TNF-α em células de Kupffer e, assim, induzir inflamação hepática (MA, ZHOU, LI, 2017).

Como é claramente explicado pelo mecanismo fisiopatológico da própria DHGNA descrito acima, (a clássica teoria dos dois *hits* ou a atualizada teoria dos múltiplos *hits*), o estresse oxidativo representa um mecanismo central na base do *hit* que conduz à formação de ERO e promove a progressão da DHGNA. Esse evento ocorre em resposta ao excesso de ácidos graxos nas células hepáticas, de sua depleção de energia e consequente disfunção mitocondrial levando ao aumento do estresse oxidativo e, por fim, ao dano celular. Estudos em modelos animais têm demonstrado esses mecanismos, e há também confirmações em humanos (SHIMOMURA et al., 2017; BOLAND et al., 2018), dando uma visão precisa da importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da DHGNA. Além disso, essas teorias encontraram uma confirmação “clínica” dos estudos que evidenciaram a associação entre a síndrome metabólica e também seus componentes (hipertensão, obesidade e dislipidemia) individualmente (DIEHL, 2004; GHOLAM et al., 2007; KRISHAN, 2016).

Em relação a população pediátrica, é um desafio compreender as causas que levam ao surgimento da DHGNA e de que forma ocorre a progressão da doença ao longo do tempo. Atualmente, há evidências crescentes que associam o aumento de DHGNA na população pediátrica e alta prevalência de obesidade materna, sugerindo que outras condições ambientais estão contribuindo para o aparecimento precoce dessa doença. O excesso de lipídeos provenientes de um ambiente uterino obesogênico pode promover esteatose hepática, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação – alterações fundamentais para a progressão da DHGNA (STEWART, HEERWAGEN, FRIEDMAN, 2013). Isto sugere que talvez o *hit* inicial para o acúmulo de gordura no fígado, possa estar ocorrendo ainda no útero associado a uma dieta materna hiperlipídica e/ou hiperglicídica.

2.2. Programação metabólica

No início dos anos 1800, a visão médica do ocidente envolvia as chamadas "impressões maternas" (SHILDRICK, 2000). Acreditava-se que a exposição de um organismo a novas experiências, exercia efeitos ao longo do seu desenvolvimento. Contudo, somente no século XIX a ideia de que o ambiente influência no desenvolvimento nos primeiros anos de vida foi aprimorada e o termo "reprodução" começou a ser empregado, fazendo alusão à hereditariedade (LÓPEZ-BELTRÁN, 2007).

A Segunda Guerra Mundial foi um evento crucial na elaboração da abordagem envolvendo efeitos da nutrição materna sobre o desenvolvimento de crianças. Durante o famoso Inverno da Fome Holandesa (1944-1945), a escassez de alimentos proporcionou um estado de subnutrição nas mulheres grávidas e nascimento de crianças com peso abaixo do normal (GLUCKMAN, BUKLIJAS, HANSON, 2016). Através de um estudo de coorte anos mais tarde, foi observado que esses indivíduos apresentavam padrões diferenciados de composição corporal na vida adulta (RAVELLI, STEIN, SUSSER, 1976).

Seguindo esse raciocínio, a teoria desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD), proposta por Barker no início dos anos 80, destaca a importância da relação entre as fases periconceptual, fetal e precoce da vida (BARKER, OSMOND, 1986). Interessantemente, a hipótese de Barker foi elaborada a partir de estudos geográficos utilizando registros detalhados dos óbitos em localidades do Reino Unido. Através destes estudos foi observado uma forte relação entre as áreas de alta mortalidade infantil no início do século XX e as áreas de alta mortalidade cardiovascular entre 1968 e 1978 (BARKER, OSMOND, 1986). Estas

observações levaram a uma associação positiva entre baixo peso ao nascer e desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta. A hipótese para esta explicação é a base da teoria da DOHaD e propõe que o risco para desenvolver doenças é regulado por fatores externos em períodos críticos do desenvolvimento, especialmente a nutrição materna deficiente durante a gestação e infância.

Embora a hipótese de Barker represente uma excelente descoberta, há uma ênfase excessiva no peso ao nascer, enquanto que na realidade, os eventos iniciais da vida podem predizer os resultados de doença na vida adulta através de várias maneiras, dependendo do tipo e do momento do insulto. Portanto, o uso do termo "*programming"* – programação metabólica, explorado e difundido por Alan Lucas no início dos anos 90, é mais amplo e leva em conta acertos e erros metabólicos não identificados fenotipicamente logo após o nascimento (LUCAS, 1991). O termo programação metabólica abrange a ideia que um órgão ou tecido em período de diferenciação bem como de crescimento, exposto a um estímulo ou insulto do ambiente, estão susceptíveis a lesões altamente sensíveis (LUCAS, 1991).

Na sociedade atual, a escassez de nutrientes foi substituída por um excesso de nutrientes, e a obesidade se tornou um problema crescente de saúde pública (NG et al., 2014). O aumento da prevalência de obesidade é evidente entre as mulheres grávidas, de modo que aproximadamente 50% das mulheres em idade fértil estão acima do peso (DODD, BRILEY, 2017). De acordo com a hipótese da programação metabólica, um ambiente uterino rico em lipídeos poderia também exercer efeito na saúde e bem-estar da prole, com sequelas tanto a curto como a longo prazo.

Notavelmente, vários estudos ligam a obesidade materna durante a gravidez com um risco aumentado de obesidade na vida adulta e o desenvolvimento de desordens metabólicas (MCGILLICK et al., 2017). Todavia, estudos epidemiológicos em seres humanos são limitados porque não conseguem avaliar a contribuição apenas da obesidade materna sem a influência dos efeitos da exposição pré-natal e fatores genéticos (CHEN et al., 2017). Não se sabe ao certo até que ponto as alterações são promovidas pela obesidade materna ou pela nutrição materno-fetal por si. O emprego de modelos animais facilita estudos que visam determinar a importância relativa da obesidade materna, do excesso de uma nutrição materna e do ambiente pós-natal (LI, SLOBODA, VICKERS, 2011). A utilização de dieta materna hiperlipídica é um dos reflexos dos hábitos alimentares na sociedade ocidental e tem sido

uma ferramenta importante nos estudos dos mecanismos subjacentes a programação metabólica da DHGNA (WILLIAMS et al., 2014).

Diversos modelos em ratos, camundongos e até mesmo primatas não humanos, usando diferentes abordagens dietéticas, fornecem evidencias ligando um ambiente uterino obesogênico e o desenvolvimento de DHGNA em seus descendentes. Os dados mostram que uma dieta materna rica em gordura pode levar a um fenótipo de DHGNA nos filhotes independente da obesidade materna e/ou da prole (BRUCE et al., 2009; MCCURDY et al., 2009). Adotar uma mudança no hábito alimentar substituindo uma dieta rica em gordura para uma dieta de baixo teor de gordura na gravidez, é capaz de melhorar os desfechos metabólicos na prole, o que enfatiza a importância da escolha alimentar durante o perito gestacional (MCCURDY et al., 2009). Achados semelhantes mostram que mesmo a adoção de uma dieta padrão após o desmame, uma dieta hiperlipídica desde o período pré-gestacional até a lactação é capaz de programar o fígado fetal e induzer esteatose hepática na prole adulta (BRUCE et al., 2009).

À luz da constatação de que a dieta materna pode afetar a “programação inicial”, predispondo os filhos a desenvolverem (ou não) vários tipos de doenças mais tarde na vida, intervenções dietéticas específicas antes, durante e após a gestação visam melhorar a qualidade da dieta (CAPRA et al., 2013). Do ponto de vista da saúde pública, a compreensão das interações entre obesidade/dieta materna e alterações no metabolismo da prole é crucial para a elaboração de estratégias destinadas a melhorar a epidemia das desordens metabólicas associadas.

2.3. Compostos fenólicos e DHGNA

A DHGNA surgiu como uma doença associada ao estilo de vida, logo mudanças nos hábitos alimentares e atividade física incluem a primeira linha de tratamento para esta condição. Dietas de estilo ocidental, especialmente aquelas que são ricas em ácidos graxos e açúcares simples, são poderosos indutores de obesidade e a DHGNA, precisando ser evitados (ZIVKOVIC, GERMAN, SANYAL, 2007). A adesão à dieta tradicional mediterrânea, caracterizada pelo consumo de alimentos ricos em antioxidantes em geral, e de polifenóis em particular, pode ser considerada uma abordagem potencial no tratamento da DHGNA, e até mesmo uma valioso instrumento de prevenção deste distúrbio.

Polifenóis ou compostos fenólicos são caracterizados por terem um ou mais anéis aromáticos ligados a grupos hidroxila e podem ser classificados em diferentes subgrupos: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos (QUIDEAU et al., 2011). Os flavonóides constituem o maior subgrupo de polifenóis e mais de 4000 diferentes tipos de flavonóides foram identificados. A estrutura química dos flavonóides envolve um núcleo fundamental composto por quinze átomos de carbono dispostos em três anéis (C6-C3-C6), dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia C heterocíclica) acoplado ao anel A (Figura 2). Os flavonóides podem ser subdivididos em diferentes grupos de acordo com o rearranjo de sua estrutura química: flavonas, flavonóis, flavononas, isoflavonas e antocianinas (PANCHE, DIWAN, CHANDRA, 2016).

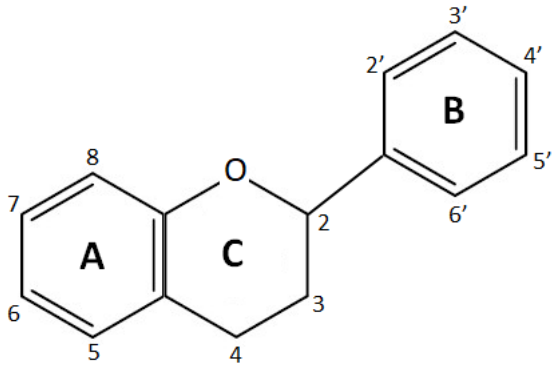


Figura 2: Estrutura química básica dos compostos fenólicos.

O potencial antioxidante dos flavonóides é complexo e envolve diferentes níveis de ação (HAN, ZHANG, SKIBSTED, 2012). Estes compostos atuam diretamente através da eliminação de radicais livres; no entanto, o sequestro desses radicais não é uma ação bioquímica única. A oxidação de lipídios, por exemplo, envolve três estágios diferentes: 1) iniciação (radicais livres removem um hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado para formar um radical lipídico); 2) propagação (radical lipídico e oxigênio molecular formam radicais peróxidos lipídicos, que se decompõem em mais radicais); 3) terminal (os novos radicais reagem uns com os outros ou com antioxidantes para eliminar radicais) (QUIDEAU et al., 2011). Os flavonóides podem atuar em qualquer nível de uma das três fases; estes compostos podem bloquear a iniciação, sequestrar radicais primários, podem reagir com os radicais peróxido para retardar a propagação e também podem reagir com os outros radicais formados durante a propagação, acelerando o processo de terminação.

Os flavonóides também podem interagir com metais de transição, executando um processo conhecido de quelação. Metais como o ferro podem cataliticamente formar radicais livres reativos, e algumas estruturas de flavonóides têm a capacidade química de quelar metais em um estado em que a reatividade é inibida (KASPRZAK, ERXLEBEN, OCHOCKI, 2015). Além disso, os flavonóides também podem atuar inibindo as enzimas pró-oxidantes. O exemplo mais proeminente é a inibição da xantina oxidase, que pode, em certos estados, produzir radical superóxido (VAN HOORN et al., 2002). Existe outra ação antioxidante indireta possível dos flavonóides. Estudos avaliaram os efeitos desses compostos na ativação da via Nrf2-Keap1, permitindo que Nrf2 seja translocado para o núcleo e se ligue à região promotora do elemento de resposta antioxidante (ARE) (CARDOZO et al., 2013; BAYELE, DEBNAM, SRAI, 2016). Este mecanismo permite a transcrição de genes codificadores das enzimas antioxidantes desintoxicantes SOD, CAT e GPx.

Recentemente, os efeitos benéficos dos componentes alimentares na prevenção e tratamento de esteatose hepática foram relatados (BAHCECIOGLU et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2012; ALBERDI et al., 2013). Estudos associam os polifenóis isolados de frutas, legumes e verduras comestíveis, com propriedades de promoção à saúde, como efeito anti-inflamatório, hipoglicemiante, anti-hiperlipidêmico, hepatoprotetivo e antioxidante (PAN et al., 2014).

Um dos mecanismos relatados pelos compostos bioativos na melhora da esteatose hepática envolve a ativação de SIRT1, sendo o mais estudado, o resveratrol, um composto polifenólico abundante na casca da uva vermelha (HAOHAO et al., 2015). A indução de SIRT1 via resveratrol contribui para a resposta de fatores de transcrição e moléculas que estão envolvidos no metabolismo de lipídeos. Em diversos modelos de esteatose hepática induzida por dieta rica em gordura, a ingestão dietética de resveratrol foi eficientemente capaz de reduzir o armazenamento hepático de TAG, que por sua vez melhora a acumulação lipídica no fígado. As respostas moleculares obtidas com o uso do resveratrol incluem vias reguladas por SIRT1 e levaram a diminuição da lipogênese, com redução da expressão do fator de transcrição SREBP-1 e das enzimas FAS, ACC e glicose-6-fosfato desidrogenase, e aumento da oxidação de ácidos graxos pela regulação positiva da CPT-1 (SHANG et al., 2008; GOMEZ-ZORITA et al., 2012; ALBERDI et al., 2013).

Outros polifenóis têm sido estudados como potenciais agentes para a prevenção e tratamento da DHGNA (PAN et al., 2014). Alguns destes compostos parecem ser capazes de

ativar SIRT3 e melhorar a esteatose hepática através da redução do estresse oxidativo e regulação de proteínas alvo de SIRT3, como PPARα e MnSOD (YANG et al., 2015; YI et al., 2017)

Ademais, não se descarta a possibilidade de atuação direta dos polifenóis sobre o sequestro de radicais livres, inibindo diversas vias de oxidação de macromoléculas. Os polifenóis também estão relacionados à regulação da expressão de genes, e mais recentemente têm sido associados à modulação do epigenoma de mamíferos (PARK, FRISO, CHOI, 2012; RUSSO et al., 2017)

O Brasil é um país caracterizado por uma rica biodiversidade, e o valor científico da flora brasileira é inquestionável. A variedade de frutas, frutos e outros alimentos nativamente brasileiros, apresentam um potencial uso na promoção à saúde, com capacidade de tornar alguns alimentos mais acessíveis e com baixo custo à população. Nessa perspectiva, estudar e entender o papel regulador e os mecanismos pelos quais os compostos naturais da flora podem atuar no organismo, parece ser uma abordagem interessante para proteger e atenuar desordens metabólicas precoces desenvolvidas ainda no útero em decorrência de uma alimentação materna excessiva ou um ambiente obesogênico.

2.4. Açaí

O açaí é fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Martius, uma bela palmeira que atinge cerca de 15 a 30 m altura e 12 a 18 cm de diâmetro e produz quatro cachos de frutos pesando entre 3 e 6 kg (ROGEZ, 2000). O nome açaí apresenta raízes na língua indígena brasileira o tupi, originalmente yá-çai – e significa fruta que chora, provavelmente relacionada ao fato de que durante o processamento de extração da fruta ocorre a produção de um líquido viscoso. A maior ocorrência é relatada nos estados do Amazonas, Maranhão, Amapá e Pará, provavelmente devido as condições ambientes preferidas para o desenvolvimento da palmeira; temperatura e umidade alta, encontrando condições satisfatórias de cultivo nas faixas climáticas com distribuição regular de chuvas e em áreas que, mesmo com período seco definido, apresentam solo úmido solo, especialmente quando localizado próximo às várzeas e igarapés (CARVALHO et al., 1998).

O açaí é uma fruta redonda com diâmetro variando de 1 a 2 cm e pesando, em média, 1,5 g (BICHARA, ROGEZ, 2011). O epicarpo, na maturidade, é roxo quase preto. O mesocarpo, apresenta cerca de 1 mm, é polpudo, envolvendo um endocarpo duro e volumoso

que segue a forma do fruto e contém em si uma semente. Apenas 17% do açaí é comestível (polpa com casca), sendo necessários cerca de 2 kg de frutos para produzir um litro de suco de açaí, o resto representa o núcleo, contendo as sementes oleaginosas (ROGEZ, 2000). Estima-se que em 2016 o Brasil produziu mais de 220 mil toneladas de açaí, das quais mais de 6 mil toneladas foram exportadas para os Estados Unidos e Japão, o equivalente a US $ 22,6 milhões (BRASIL, 2016).

Existem vários relatos populares, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, indicando o efeito positivo do uso medicinal do açaí no tratamento de vários distúrbios, como febre, dor, gripe e diarréia (HEINRICH, DHANJI, CASSELMAN, 2011). Na literatura atual, os efeitos dessa fruta são cada vez mais evidentes, o que favorece a demanda e seu consumo no Brasil e no exterior.

Antes da grande demanda nacional e internacional de açaí, o extrativismo foi por muito tempo quase exclusivamente uma atividade típica da agricultura familiar. O plantio de *Euterpe oleracea* Martius nos igarapés requer mão de obra hábil para o plantio e a colheita dos frutos. No entanto, a alta procura no mercado tem propiciado investimentos em tecnologia e na produção de frutas através do manejo de açaízais implantados em solos sólidos. Estima-se que cerca de 80% da produção de frutas seja oriunda do extrativismo, enquanto os 20% restantes são provenientes de açaízais manejados (ROCHA, 2004).

O cultivo do açaí é de grande importância socioeconômica, devido ao enorme potencial de plena utilização da matéria-prima (BICHARA, ROGEZ, 2011). Além da extração das frutas, a palmeira é utilizada na fabricação do palmito, suas folhas e ripas de madeira são utilizadas na construção e cobertura de casas rústicas. As sementes também são usadas no artesanato e na produção de fertilizantes orgânicos.

A polpa de açaí é um alimento amplamente consumido pela população brasileira em uma variedade de bebidas e preparações. Nos últimos anos o consumo de açaí tem aumentado em diversos países, principalmente devido aos benefícios que estão sendo rastreadas por trabalhos científicos (YAMAGUCHI et al., 2015). Os efeitos benéficos são normalmente imputáveis aos compostos bioativos presentes (DEL POZO-INSFRAN, BRENES, TALCOTT, 2004). Além da presença de compostos fenólicos, destaca-se a presença de fibras (44,2%) e de lipídeos (32,5%), dos quais mais de 70% são ácidos graxos insaturados (SCHAUSS et al., 2006b).

2.4.1. Nutrientes e compostos bioativos

O açaí é considerado um alimento altamente nutritivo e sua composição fitoquímica e nutricional o indica como um alimento com potencial efeito funcional (BOBBIO et al., 2000; MENEZES et al., 2005). Em termos de nutrientes, o açaí possui, em 100g de peso seco, 32,5 g de gorduras, das quais 8,5 g são ácidos graxos saturados (especialmente ácido palmítico) e 24 g são representados por ácidos graxos insaturados, especialmente ácido oleico (18,3 g) e ácido linoleico (4,1 g). Entre os fitoesteróis, destacam-se o β-sitosterol, o campesterol e o stigmasterol (SCHAUSS et al., 2006b).

A polpa de açaí também contém 8,1% de proteínas e 52,2% de carboidratos (dos quais 1,3% são açúcares e 44,2% são fibras) (SCHAUSS et al., 2006b). Sanabria & Sangronis (2007) estudaram a composição química da polpa de açaí em duas safras do ano de 2005, mostrando que em ambas as safras (fevereiro/julho) o teor de fibra alimentar era bastante elevado (SANABRIA, SANGRONIS, 2007). Para fibra solúvel, encontraram 3,6 g e 2,0 g em 100 g de açaí seco na primeira e segunda colheita, respectivamente; e para fibra insolúvel, foram encontrados 27,3 g e 18,0 g em 100g de matéria seca de açaí, respectivamente (BICHARA, ROGEZ, 2011). Este fruto apresenta um potencial significativo como fonte de fibra alimentar, apresentando valores superiores aos reportados para frutos como morango, figo e goiaba. Em relação aos micronutrientes, o açaí contém os minerais cálcio e ferro e as vitaminas A e C, no entanto, os valores desses micronutrientes divergem bastante de acordo com a fonte bibliográfica (BICHARA, ROGEZ, 2011).

A análise da composição fitoquímica da polpa do açaí mostra que esta fruta é rica em compostos fenólicos. Segundo estudos avaliando o perfil fitoquímico do açaí, os principais constituintes são os polifenóis da classe dos flavonóides, entretanto, outros compostos fenólicos também foram identificados (DEL POZO-INSFRAN, BRENES, TALCOTT, 2004; SCHAUSS et al., 2006b; CHIN et al., 2008).

Nas próximas seções, serão abordados mais detalhes sobre os compostos bioativos e nutrientes presentes no açaí; e logo a seguir, como eles podem agir em diferentes vias metabólicas do organismo.

2.4.1.1. Polifenóis

Talvez o principal interesse em estudar o açaí seja devido à presença de flavonóides com capacidade antioxidante. A composição fitoquímica do açaí é caracterizada pela presença de cinco flavonóides da classe das antocianinas: cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo, peonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-rutinosídeo (Figura 3) (SCHAUSS et al., 2006b).

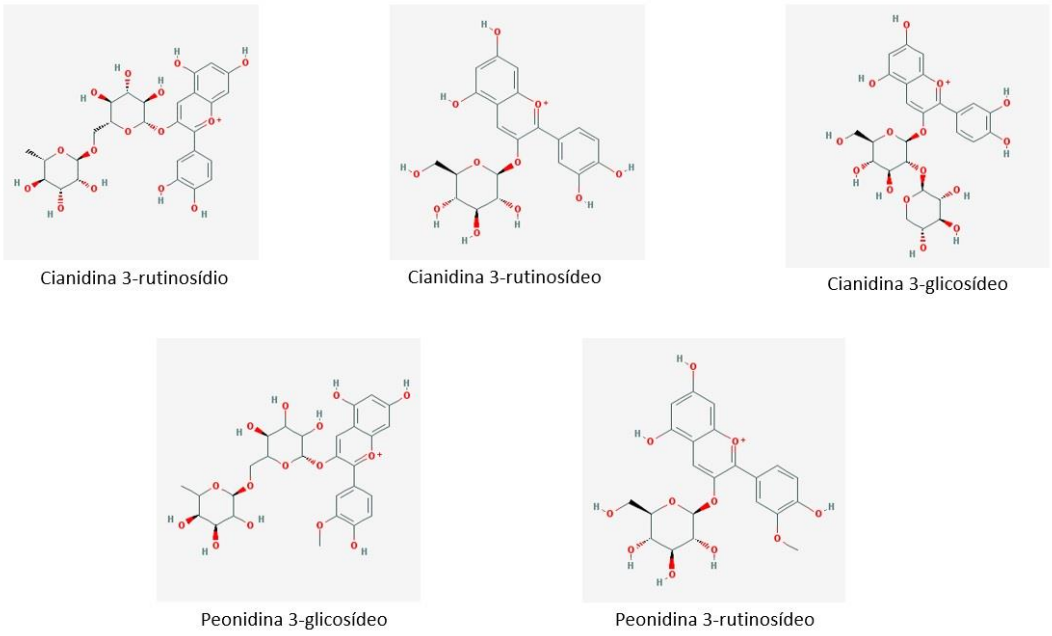


Figura 3: Antocianinas presentes no açaí (Euterpe oleracea Martius). Fonte: PubChem.

Além desses fitoquímicos, outros compostos fenólicos também são encontrados em concentrações mais baixas, como ácido ferúlico, epicatequina, ácido p-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido elágico, ácido vanílico, ácido p-cumárico e lignanas. epicatequina, catequina, homoientina, orientina, isovitexina, taxifolina deoxihexose, pró-antocianidinas, luteolina, vitexina, quercetina, diidrocanferol; ácidos fenólicos: ácido gálico e ácido ferúlico; resveratrol da classe de estilbeno (concentrações muito mais baixas); e lignanas (DEL POZO-INSFRAN, BRENES, TALCOTT, 2004; SCHAUSS et al., 2006b; CHIN et al., 2008). Embora o açaí tenha uma composição fitoquímica bastante interessante, ainda não se sabe como esses compostos são absorvidos e metabolizados no corpo humano.

Através da quantificação e identificação dos compostos fenólicos presentes no açaí, vários ensaios *in vitro* avaliaram o seu potencial efeito antioxidante (SCHAUSS et al., 2006a; PACHECO-PALENCIA, MERTENS-TALCOTT, TALCOTT, 2008; PACHECO-

PALENCIA et al., 2008; MACHADO et al., 2016). A maioria dos estudos avaliou a capacidade do açaí em neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Alguns estudos utilizaram testes específicos para avaliar a capacidade do açaí em absorver radicais de oxigênio e nitrogênio. Além disso, estudos que avaliam o efeito antioxidante do açaí em várias linhagens celulares também são descritos (WONG et al., 2013; DA SILVA SANTOS et al., 2014).

2.4.1.2. Lipídeos

Os lipídeos representam aproximadamente 90% da caloria do açaí, fornecendo 15,5 a 27,5% da ingestão diária recomendada (IDR) em uma porção de 200 ml de bebida de açaí. O perfil de ácidos graxos do açaí apresenta o ácido oleico (49,72%), palmítico (25,31%) e linoleico (13,51%) com as maiores proporções (Tabela 1). O teor de ácidos graxos ômega-3 é pobre (aproximadamente 1%) (SCHAUSS et al., 2006b). A alta proporção de ácidos graxos insaturados (>70%) presentes na fração lipídica do açaí, pode afetar positivamente o metabolismo lipídico no fígado.

A importância do consumo de ácidos graxos insaturados tem aumentado significativamente na última década, devido ao número de publicações que mostram uma relação positiva entre o consumo dessas gorduras e a saúde (LUNN, THEOBALD, 2006). Os ácidos graxos presentes na dieta podem alterar o perfil das lipoproteínas plasmáticas e, consequentemente, o risco de desenvolver doenças metabólicas. Estudos como *Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor* e *"The Nurses' Health Study"* mostram que as dietas que propõem a substituição de gorduras saturadas por ácidos graxos monoinsaturados ou poliinsaturados proporcionam uma redução nos níveis séricos de colesterol e triacilglicerol (LAAKSONEN et al., 2005).

O mecanismo proposto para explicar o efeito hipocolesterolêmico dos ácidos graxos insaturados refere-se à capacidade dessas gorduras promoverem aumento da expressão e atividade do receptor de LDL no fígado (FERNANDEZ, WEST, 2005). Além disso, sabe-se que as gorduras insaturadas exercem ações que proporcionam uma supressão na síntese de ácidos graxos, bem como um aumento na oxidação desses ácidos (MADSEN, PETERSEN, KRISTIANSEN, 2005).

Estudos mostram também que os ácidos graxos poliinsaturados podem modular a expressão gênica, atuando como ativadores potentes na família de receptores nucleares, os

receptores ativados por PPARs (KLIEWER et al., 1997). Existem três isotipos de PPARs (PPARα, PPARγ e PPARδ) que apresentam distintas funções fisiológicas, distribuição tecidual e especificidade do ligante. A ativação do PPARα leva a uma redução nos níveis séricos de lipídios, uma vez que aumentam a expressão dos genes responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos, o PPARγ promove um aumento na sensibilidade à ação da insulina e o PPARδ regula os níveis séricos de colesterol e glicose (KLIEWER et al., 1997).

Em relação à redução dos níveis plasmáticos de TAG pelas gorduras insaturadas, a literatura mostra que esse efeito é devido à redução na produção ou taxa de secreção de VLDL no fígado (BLASIOLE, DAVIS, ATTIE, 2007). Outro mecanismo sugerido para a redução de TAG seria a ação de ácidos graxos insaturados na síntese de triacilgliceróis, levando a uma redução na atividade da enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT). Esta enzima catalisa a conversão de diacilglicerol em triacilglicerol (BLASIOLE, DAVIS, ATTIE, 2007).

Tabela 1: Composição de ácidos graxos presentes no açaí.

Ácidos graxos (g)	**100g de matéria seca**	**200g de suco de açaí (1 porção)**
Palmítico	24,1	5,784
Palmitoléico	4,3	1,032
Esteárico	1,6	0,384
Oléico	56,2	13,488
Linoleico	12,5	3
Linolênico	0,8	0,192
Saturado	26,1	6,264
Insaturado	73,9	17,736
MUFA	60,6	14,544
PUFA	13,3	3,192
ω6:ω3	12,5:0,8	4:1

Fonte: Bichara e Rogez (2011)

2.4.1.3. Fibras

Fibras dietéticas são a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos, que são resistentes à ação de enzimas do trato gastrointestinal e absorção no intestino delgado de humanos, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso (CUMMINGS,

STEPHEN, 2007). De acordo com a sua solubilidade em água, a fibra dietética pode ser classificada como solúvel ou insolúvel. As fibras solúveis são representadas pela pectina (frutas), gomas (aveia, cevada) e leguminosas (feijão, grão-de-bico, lentilha e ervilha), enquanto a celulose (trigo), hemicelulose (grãos) e lignina (vegetais) representam fibras insolúveis.

A concentração de fibra dietética presente no açaí é alta, com valores entre 20,9 e 21,8% de matérias seca, isto faz com que as fibras sejam o segundo maior constituinte do açaí. A razão de fibra solúvel e insolúvel no açaí é 1:3, enquanto a recomendação é 1:2. O açaí contribui com 20% da recomendação diária de fibra em apenas uma porção. Sendo assim, o açaí pode ser considerado uma boa fonte de fibra dietética.

Fibras alimentares, especialmente as solúveis, podem atuar no nível intestinal, a fim de ligar os ácidos biliares durante a formação de micelas, causando um aumento na excreção fecal desses ácidos. Além disso, essas fibras podem atuar como barreiras fisiológicas no lúmen intestinal, formando uma matriz viscosa que aumenta a espessura da barreira de difusão entre o lúmen e a borda em escova. Assim, a difusão e a absorção de gorduras e ácidos biliares são difíceis e, consequentemente, há maior excreção fecal desses componentes (FUKUSHIMA et al., 2000).

A fibra dietética também tem efeito sobre a regulação das funções intestinais, promovendo uma melhora nas situações de constipação e episódios de diarréia, além de casos de colite ulcerativa e alguns tipos de câncer. Em paralelo, as fibras podem atuar como prebióticos promovendo mudanças na flora bacteriana e no ambiente intestinal. Quando as fibras solúveis atingem o intestino grosso, elas podem sofrer o processo de fermentação pelas bactérias no cólon humano. Este processo bioquímico resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato. O butirato é geralmente usado como fonte primária de energia pelas células do cólon, enquanto o acetato e o propionato são rapidamente absorvidos. A literatura tem mostrado que a produção desses ácidos graxos de cadeia curta e as principais alterações na relação propionato/acetato podem influenciar o metabolismo lipídico, inibindo, por exemplo, a lipogênese no fígado (KOH et al., 2016).

2.4.1.4. Vitaminas e Minerais

A quantidade total de a-tocoferol encontrada no açaí é alta, variando de 37 a 52 mg 100 g/l de matéria seca, o que torna o suco dessa fruta uma excelente fonte dessa forma de

vitamina E. Cada porção de açaí fornece mais de 100% do consumo recomendado pela FAO/OMS (2001) para homens e mulheres adultos.

Outros minerais e vitaminas foram relatados por estarem presentes no açaí, entretanto os estudos ainda divergem muito em relação a sua quantidade (Tabela 2).

Tabela 2: Minerais e vitaminas presentes no açaí.

Minerais	**100g de matéria seca**	**200g de suco de açaí (1 porção)**	**Recomendação diária**	**Contribuição (%) por porção**
Ca (g)	0,309	0,074	1000	7,42
P (g)	0,147	0,035	0,7	5,04
Mg (g)	0,178	0,043	0,280	15,26
K (g)	0,990	0,238	4700	5,06
Na (g)	0,076	0,018	1500	1,22
Zn (g)	1,73	0,415	8-11	4,0-5,2
B (mg)	1,584	0,380	20	1,9
Fe (mg)	2,059	0,494	14-29	1,7-3,52
Se (mg)	1,321	0,317	0,055	>100
Mn (mg)	32,300	7,752	1,8-2,3	>100
Cu (mg)	1,376	0,330	0,900	36,69
Ni (mg)	0,203	0,049	0,350	13,92
Cr (mg)	0,531	0,127	0,035	>100
Cd (mg)	0,046	0,011	0,070	15,77
Pb (mg)	0,408	0,098	0,250	39,18
Sr (mg)	4,466	1,072	-	-
Vitaminas				
Vitamina A	1002			
Vitamina C	<0,1	-	-	-
Vitamina E (mg)	45,00	10,8	7,5-10	>1001

Fonte: Bichara e Rogez (2011)

2.4.2. Efeitos benéficos do açaí – Estudos da literatura

O açaí, por sua composição nutricional e fitoquímica, apresenta importância dietética e possível efeito na terapia antioxidante. Estudos vêm sendo publicados avaliando o potencial do açaí sobre a saúde, mostrando que este fruto pode atuar a nível de sinalização celular, contribuindo na prevenção e atenuação de muitas doenças crônicas.

2.4.2.1. Capacidade Antioxidante

As investigações sobre os efeitos do açaí começaram com a avaliação de sua capacidade antioxidante. Del Pozo-Insfran e colaboradores em 2004, demonstraram através de um ensaio *in vitro* que a polpa de açaí apresenta alta capacidade antioxidante (48,6 µmol equivalentes de trolox/ml), apresentando valores superiores aos relatados para outras frutas também ricas em polifenóis como morangos, framboesas, amoras e suco de uva (DEL POZO-INSFRAN, BRENES, TALCOTT, 2004). Outros estudos usando diferentes ensaios químicos confirmaram a alta atividade antioxidante do açaí contra o ânion superóxido, o radical peroxil e atividade moderada para eliminar os radicais peroxinitrito e hidroxila (LICHTENTHALER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a; SPADA et al., 2008). A polpa de açaí apresenta uma capacidade de eliminar ERO semelhante às enzimas superóxido dismutase e catalase (SPADA et al., 2009).

Jensen et al. (2008) investigaram as propriedades antioxidantes *in vitro* de uma bebida feita a partir de uma mistura de várias frutas, mas com o açaí como ingrediente principal (JENSEN et al., 2008). Esta bebida, tem cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo provenientes do açaí, como as antocianinas mais predominantes. A bebida foi capaz de reduzir significativamente a produção de ERO em células polimorfonucleares incubadas com H_2O_2, demonstrando que os antioxidantes presentes nessa bebida, especialmente as antocianinas do açaí, podem atravessar a membrana plasmática e proteger a célula dos danos oxidativos.

A capacidade antioxidante do açaí também foi avaliada em neutrófilos de ratos alimentados com dieta suplementada com 2% de polpa de açaí; foi observada uma redução na produção de ERO em relação aos de ratos alimentados com dieta controle (GUERRA et al., 2011).

Adicionalmente, o efeito protetor antioxidante do açaí foi investigado no dano tecidual. Tecidos isolados do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos, quando tratados com polpa de açaí (40% p/v), mostram uma redução do dano oxidativo induzido por H_2O_2 em lipídeos e proteínas (SPADA et al., 2009). A administração prévia de extratos de açaí melhorou as alterações histopatológicas da insuficiência renal aguda em ratos, sendo este resultado associado à melhora do estado oxidativo do animal (UNIS, 2015). Esta melhora no estado oxidativo também mostrou proteger contra danos pulmonares induzidos pela fumaça do cigarro em camundongos tratados com extrato de semente de açaí (DE MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2012).

O consumo de açaí exerce efeito antioxidante sistêmico quando avaliado em diferentes modelos experimentais. A suplementação dietética com polpa de açaí a 2% melhorou o estado oxidativo em ratos hipercolesterolêmicos. Após seis semanas de consumo da polpa de açaí, os animais hipercolesterolêmicos apresentaram redução na concentração de proteína carbonilada, aumento dos níveis de grupos sulfidrila e aumento da atividade da enzima paraoxonase (DE SOUZA et al., 2010). A suplementação dietética com polpa de açaí a 2% também foi avaliada no balanço redox de ratos diabéticos; a suplementação reduziu a peroxidação lipídica e aumentou o conteúdo total de glutationa no fígado (GUERRA et al., 2011).

Sun et al. (2010) demonstraram que a suplementação dietética com polpa de açaí aumenta a longevidade de moscas alimentadas com dieta hiperlipídica por meio da ativação transcricional de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, como a glutationa-S transferase (SUN et al., 2010). Além disso, o estudo de Laslo et al. (2013) encontraram uma redução do dano oxidativo em moscas deficientes para a enzima superóxido dismutase 1, estando isso relacionado ao envelhecimento saudável dos animais (LASLO et al., 2013).

Parte dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antioxidante do açaí foi elucidada em um estudo que utilizou *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Foi demonstrado que o açaí reduziu o estresse oxidativo por mecanismo direto, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio e por um mecanismo indireto, devido à ativação e translocação nuclear do fator de transcrição DAF16, envolvido na resposta ao estresse oxidativo nesse verme (BONOMO et al., 2014). É importante destacar a relação positiva entre a capacidade antioxidante do açaí e sua composição em compostos fenólicos totais,

sendo a cianidina 3-glicosídeo o principal contribuinte para este efeito (DEL POZO-INSFRAN, BRENES, TALCOTT, 2004).

Estudos do nosso grupo de pesquisa avaliando os efeitos do consumo dietético da polpa de açaí por mulheres saudáveis, encontrou resultados promissores na regulação do metabolismo redox. A ingestão diária de 200g de polpa de açaí durante quatro semanas, promoveu aumento da capacidade antioxidante total e da enzima catalase associado a diminuição de ERO em células porlimofonuclares de mulheres saudáveis. Em adição, houve redução dos níveis séricos de proteína carbonilada e aumento dos grupos sulfidrilas, sugerindo melhora do estado oxidativo (BARBOSA et al., 2016). Além disso, a introdução de polpa de açaí na dieta foi capaz de diminuir as concentrações séricas da LDL oxidada e do dialdeído malônico, ambos produtos do estresse oxidativo. Em contrapartida, houve aumento sérico na atividade da enzima paraoxonase, na capacidade antioxidante total e na transferência de ésteres de colesterol para HDL, ressaltando além do efeito no metabolismo redox, ação do açaí sobre o metabolismo de lipídeos (PALA et al., 2018).

2.4.2.2. Efeitos no metabolismo lipídico

A partir dos estudos publicados na comunidade cientifica, o açaí também é capaz de exercer efeitos importantes sobre o perfil lipídico, contribuindo para reduzir os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Níveis séricos elevados de colesterol total e colesterol não-HDL, bem como o índice aterogênico de ratos hipercolesterolêmicos, foram significativamente reduzidos após suplementação dietética com polpa de açaí a 2% por seis semanas (DE SOUZA et al., 2010).

A administração a longo prazo (12 semanas) de extrato de sementes de açaí impediu o aparecimento de características fenotípicas e bioquímicas da síndrome metabólica em camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em gordura (DE OLIVEIRA et al., 2010). Os animais que receberam açaí tiveram reduções significativas nos triglicerídeos e colesterol séricos. Outro estudo realizado por Xie et al. (2011) também mostrou um efeito protetor do açaí no desenvolvimento da aterosclerose (XIE et al., 2011). Camundongos hiperlipidêmicos deficientes em ApoE, quando tratados com suco de açaí, mostraram um aumento na concentração sérica de HDL e uma redução na área lesada da aorta. Um efeito semelhante no perfil lipídico sérico, especificamente no colesterol, também foi observado em

coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol, em que o açaí exerceu um efeito hipocolesterolêmico significativo (FEIO et al., 2012).

Souza et al. (2012) demonstraram que esse efeito hipocolesterolêmico do açaí parece ser mediado pelo aumento da expressão dos transportadores hepáticos ABCG5 e ABCG8 envolvidos na liberação de colesterol na bile e por exercer um aumento na excreção fecal desse esterol (DE SOUZA et al., 2012).

2.4.2.3. Efeitos hepatoprotetores

O açaí também tem sido associado a efeitos benéficos em relação ao metabolismo hepático; no entanto, estudos ainda são controversos.

Heyman et al. (2014) avaliaram o efeito de oito espécies de frutos ricos em polifenóis com a capacidade de prevenir a obesidade e distúrbios metabólicos associados à diabetes tipo 2 e esteatose hepática (HEYMAN et al., 2014). Camundongos C57BL / 6J receberam uma dieta de 13 semanas rica em gordura ou uma dieta rica em gordura suplementada com 20% com as seguintes frutas: mirtilo, groselha, framboesa, polpa de açaí, ameixa ou amora. Os grupos de animais que receberam dieta hiperlipídica suplementada com açaí apresentaram maiores níveis de glicose e insulina em jejum do que os grupos que receberam *lingoberry*, groselha, framboesa ou mirtilo. Além disso, camundongos que receberam açaí apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de colesterol, EGF e PAI-1.

Contrariando esses dados, um estudo mais recente avaliando o efeito do açaí na indução da DHGNA demonstrou a ação hepatoprotetora dessa fruta (GUERRA et al., 2015). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com extrato aquoso de açaí (3 g/kg) apresentaram melhora na atividade da ALT e diminuição do conteúdo de TAG hepático. Esses achados foram confirmados por análise histológica mostrando atenuação da esteatose hepática, diminuição acentuada das gotículas lipídicas e também redução do processo inflamatório. Além disso, a administração do extrato aquoso de açaí foi capaz de modular a expressão de genes envolvidos na sinalização da adiponectina, lipogênese e oxidação de ácidos graxos. Animais com alto teor de gordura tratados com açaí apresentaram menores níveis de RNAm de ACC1 e FAS quando comparados aos animais que não receberam suplementação. Os pesquisadores também observaram que os níveis de expressão de mRNA para PPARα e seu gene alvo CPT-1 foram maiores no grupo suplementado com

açaí do que no grupo de dieta somente gordura. Este estudo sugere que o açaí tem um efeito protetor contra a DHGNA.

Um estudo recente envolvendo o consumo de uma dieta rica em gordura (25% de óleo de soja e 1% de colesterol) e a administração de polpa de açaí mostrou que a polpa de açaí foi capaz de prevenir a oxidação da LDL e atividade hepática de PON1 e aumentar a expressão de PON1 e ApoA-I no fígado (PEREIRA et al., 2016). Além disso, o grupo com dieta hiperlipídica que recebeu tratamento com polpa de açaí apresentou atenuação das lesões hepáticas com redução do infiltrado gorduroso e do conteúdo de TAG. Esse resultado reforça o potencial terapêutico do açaí na atenuação de lesões hepáticas causadas por uma dieta hiperlipídica.

Reconhecendo os efeitos hepatoprotetores do açaí, outro estudo em animais também relacionou o consumo dessa fruta a uma dieta rica em gordura, demonstrou efeito benéfico da suplementação com extrato de semente de açaí sobre a adiposidade e esteatose hepática (DE OLIVEIRA et al., 2010). Os mecanismos subjacentes a esses resultados envolveram a redução da lipogênese hepática pela redução da expressão de SREBP-1c e aumento da expressão de AMPK, que modula negativamente a ACC e HMG-CoA redutase.

Um estudo atual que deu continuidade aos efeitos dos polifenóis buscou investigar os mecanismos que permeiam os efeitos dos frutos de mirtilo, mirtilo, groselha preta e açaí na modulação do genoma de camundongos C57BL/6J (HEYMAN-LINDEN et al., 2016). Neste estudo de acompanhamento, o perfil de expressão do genoma sugere que os efeitos protetores de *lingoberry* e mirtilo são modulados pela expressão reduzida de vários genes da via inflamatória, tais como *Saa*, *Cxcl1* e *Lcn2*. Em contraste, animais alimentados com açaí (20%) mostraram um aumento na regulação de genes associados à biossíntese de lipídios e colesterol, como *Cidea*, *Cidec* e *Anxa2*. Os resultados encontrados neste estudo, com a adição de açaí, mostraram uma exacerbação do fígado gorduroso por esse fruto.

2.4.2.4. Propriedades inflamatórias, proapoptóticas e antiproliferativas

Além do seu efeito antioxidante, um estudo de Schauss et al. (2006) mostraram que o açaí pode apresentar propriedades anti-inflamatórias que exercem forte ação inibitória sobre a atividade das ciclooxigenases (COX 1 e COX 2) em culturas celulares.

O potencial anti-inflamatório do açaí foi posteriormente confirmado em outros estudos, onde foi avaliado o efeito desse fruto sobre as citocinas inflamatórias. Noratto et al. (2011) demonstraram que o extrato de açaí protege as células endoteliais da veia do cordão umbilical humano contra a inflamação mediada pela glicose, reduzindo a expressão das interleucinas 6 e 8. A velutina, uma flavona isolada da polpa do açaí, reduziu a produção de TNF-α e interleucina-6 em macrófagos periféricos de camundongos. Neste mesmo estudo, velutin mostrou um efeito inibitório na ativação do fator nuclear NF-kB. (NORATTO et al., 2011) Deve-se enfatizar que as quinases avaliadas participam de importantes vias de sinalização envolvidas na produção de TNF-α e IL-6.

O açaí também tem potenciais efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos. Del Pozo-Insfran et al., (2006) estudaram os efeitos dos polifenóis presentes na polpa do açaí sob células leucêmicas humanas (HL-60), investigando os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL, TALCOTT, 2006). Eles demonstraram que os polifenóis presentes no açaí induzem a mortalidade das células HL-60 através de mecanismos pró-apoptóticos, como a ativação da caspase-3. Os efeitos antiproliferativos dos extratos obtidos da polpa do açaí também foram avaliados na cultura de células de adenocarcinoma humano HT-29, onde mostraram um efeito inibitório de até 90,7% na proliferação celular (PACHECO-PALENCIA, MERTENS-TALCOTT, TALCOTT, 2008). Além disso, a atividade antiproliferativa do açaí também foi evidenciada in vivo em um estudo mostrando que o consumo de açaí liofilizado pode reduzir o desenvolvimento da carcinogênese do cólon de rato quimicamente induzida (FRAGOSO et al., 2013).

Estudos sobre o açaí realizados em humanos reforçam o papel desta fruta na promoção de benefícios para a saúde. O primeiro estudo envolvendo efeitos antioxidantes em humanos avaliou o efeito de uma mistura de suco contendo açaí como ingrediente predominante. Doze voluntários (6 mulheres e 6 homens) foram selecionados para participar em dois momentos diferentes, com um intervalo de uma semana entre os dois encontros (JENSEN et al., 2008). Os resultados indicaram aumento da capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica sérica após consumo do suco. Esses achados sugerem que a ingestão do suco, composto principalmente pelo açaí, foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante e proteger as células do dano oxidativo (JENSEN et al., 2008).

No mesmo ano, um estudo utilizando três diferentes bebidas: 100% de polpa de açaí, 100% de polpa de açaí clarificada e 100% de suco de maçã, avaliou o efeito de 7 ml de

suco/kg de peso corporal no perfil antioxidante de 11 voluntários saudáveis (MERTENS-TALCOTT et al., 2008). Os resultados mostraram que houve aumento da capacidade antioxidante do plasma em até 3 vezes para a polpa de açaí e até 2,3 vezes para o suco de açaí clarificado. Esses dados demonstram a biodisponibilidade das antocianinas do açaí em voluntários humanos, confirmada pelo aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma. Um estudo piloto em humanos procurou avaliar o efeito de uma bebida de açaí na dor articular crônica. Quatorze participantes foram monitorados no início do estudo e após 2, 4, 8 e 12 semanas para identificar o curso do tempo de mudanças nos sintomas de dor e redução da amplitude de movimento depois de beber. Os voluntários foram instruídos a consumir 120 mL da bebida por dia. Os dados de dor coletados através do questionário mostraram melhorias estatisticamente significativas apenas após 12 semanas de consumo, mas os relatos de melhora foram observados após 4 semanas. A proteção celular antioxidante medida em eritrócitos (CAP-e) também foi quantificada para avaliar a atividade antioxidante sérica. O consumo de suco à base de açaí foi capaz de aumentar os níveis de CAP-e a partir de 2 semanas, com melhoria contínua da dor ao longo do estudo e significância alta após 12 semanas de consumo. Os dados deste estudo reafirmaram o potencial antioxidante do açaí e apresentaram efeitos positivos do consumo de açaí no estado inflamatório em humanos, observando a inibição da via da COX-2 por essa fruta (JENSEN et al., 2011).

Outro estudo piloto foi desenhado para avaliar os efeitos da polpa do açaí em voluntários com excesso de peso em risco de desenvolver a síndrome metabólica. Dez participantes (5 homens e 5 mulheres) foram instruídos a consumir 200g de polpa de açaí por dia por 30 dias (UDANI et al., 2011). Nos parâmetros analisados, houve redução significativa dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e colesterol total, após 30 dias de ingestão de polpa de açaí. Além disso, o efeito das cápsulas de açaí sobre os parâmetros hemodinâmicos e eletrocardiográficos em indivíduos saudáveis foi avaliado (GALE, KAUR, BAKER, 2014). Vinte participantes, masculinos e femininos, foram selecionados. De todos os parâmetros analisados, a pressão arterial sistólica foi significativamente menor após 6 horas de consumo da cápsula de açaí quando comparada ao placebo.

Os resultados controversos acerca dos efeitos do consumo de açaí sobre e a falta de estudos que avaliam a modulação epigenética deste fruto na patogênese da DHGNA, demonstram a necessidade de mais estudos para melhor compreender o mecanismo de ação dos compostos bioativos do açaí na prevenção e no tratamento da DHGNA.

3. Justificativa

Tendo em vista que o excesso de lipídeos da dieta materna pode alterar vias do metabolismo de lipídeos, do estresse oxidativo e programar o fígado fetal para predispor o desenvolvimento de DHGNA, a investigação de abordagens que possam atenuar ou modular estes efeitos devem ser enfatizados. A exploração do potencial quimiopreventivo dos produtos naturais ricos em compostos bioativos como os polifenóis, é uma estratégia emergente para a modulação dos mecanismos transgeracionais. Nesse sentindo, o estudo de frutos nacionais com altas concentrações de polifenóis, como o açaí e o seu papel na modulação da programação da DHGNA, também deve ser investigado.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Estudar o efeito do consumo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) sobre a programação metabólica e mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DHGNA induzida pela dieta materna hiperlipídica.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição química, o conteúdo de fenólicos totais e o teor de antocianinas da polpa de açaí utilizada no presente trabalho;
- Avaliar a atividade antioxidante da polpa de açaí *in vitro*;
- Estabelecer em ratas e na prole, modelo de DHGNA induzida por dieta materna hiperlipídica;

Hipótese 1: O consumo de polpa de açaí associado a uma dieta materna hiperlipídica é capaz de prevenir ou atenuar o acúmulo de gordura no fígado, através de alterações no metabolismo lipídico. Para investigar essa hipótese, foi avaliado nos diferentes grupos experimentais de matrizes e prole:

- Peso corporal, peso do fígado e ingestão alimentar;
- Níveis séricos de colesterol total e triglicérides;
- Conteúdo de gordura, colesterol e triglicérides no fígado;
- Expressão gênica de *Sirt1, Srebpf1, Fasn e Ucp2*;
- Expressão proteica de SIRT1 e SREBP1.

Hipótese 2: O consumo de polpa de açaí associado a uma dieta materna hiperlipídica é capaz de prevenir ou atenuar o acúmulo de gordura no fígado, através de alterações no metabolismo redox. Para investigar essa hipótese, foi avaliado nos diferentes grupos experimentais de matrizes e prole:

- Atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante (catalase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase);
- Biomarcadores do estado oxidativo: dialdeído malônico e proteína carbonilada.
- Expressão gênica de *Sirt3, GPx1, GPx4, Sod1, Sod2.*

5. Metodologia

5.1. Polpa de açaí

Toda a quantidade de polpa de açaí necessária para o desenvolvimento do presente trabalho foi adquirida em um único lote (07/2016) do mesmo fornecedor, a fim de garantir a homogeneidade da polpa para formulação das dietas experimentais durante todo o experimento.

5.1.1. Determinação da composição centesimal

A determinação da composição química da polpa de açaí foi realizada utilizando metodologias propostas pelo Método Físico-químico para Análise de Alimentos – IV, do Instituto Adolf Lutz (2008). Foram quantificados os valores de umidade, cinzas, lipídeos totais, proteínas, fibra solúvel e insolúvel e carboidratos. Além disso, foi determinado o teor de acidez da polpa para avaliação do padrão de identidade e qualidade.

O teor de umidade foi determinado por diferença de massa através de secagem da polpa em estufa a 105° C. A determinação dos valores de cinzas foi feita através de incineração em forno mufla. A quantificação do conteúdo de lipídeos totais foi realizada pelo método de extração de Soxhlet. O teor de proteína foi determinado utilizando o método clássico de Kjeldahl. A metodologia para a determinação do teor de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi determinado através do método enzimático-gravimétrico. A quantificação do teor de carboidratos foi feita através da diferença da soma dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos totais e fibras (solúvel e insolúvel). O método para determinação da acidez foi realizado através de titulação com indicador. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados encontrados para a composição química bem como as características físicas, foram avaliados com base na normativa do Ministério da Agricultura no 01, de 07 de janeiro de 2000 que fixa padrões de identidade e qualidade para a polpa de açaí.

5.1.2. Obtenção do extrato

Primeiramente preparou-se um extrato da polpa para maior obtenção dos compostos fitoquímicos presentes. 5g de amostra de polpa de açaí foi obtida após secagem em estufa. O açaí foi adicionado em um béquer com 40 ml de uma mistura de metanol/acetona (50:50, v/v). A mistura foi homogeneizada por agitação magnética em temperatura ambiente durante

1 h. A mistura foi transferida para tubos tipo *falcon* e centrifugados a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi recuperado. Em seguida, 40 ml de uma mistura de acetona/água (70:30, v/v) foi adicionado ao resíduo presente no tubo e misturado à temperatura ambiente por 1 h como descrito anteriormente e centrifugado. Os extratos de metanol e acetona foram combinados, e o volume foi acertado até 100 ml com água destilada. Os extratos foram aliquotados e usados para determinação do conteúdo de polifenóis, antocianinas e capacidade antioxidante total.

5.1.3. Determinação do conteúdo de polifenóis

A quantificação de polifenóis totais da polpa de açaí usada na formulação das dietas foi determinada de acordo com a metodologia propostos por George et al. (2005) (GEORGE et al., 2005). Este método utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura dos ácidos fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), e se baseia na redução desses ácidos em solução alcalina. Essa redução produz uma coloração azulada, que é medida através de espectrofotometria com leitura a 760nm.

A curva padrão para quantificação dos polifenóis totais foi determinada utilizando diferentes concentrações de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg/L). O teor de polifenóis totais foi expresso em mg equivalente de ácido Gálico (EAG) em 100g de polpa de açaí.

5.1.4. Determinação do conteúdo de antocianinas

A quantificação do teor de antocianinas foi realizada através do método do pH diferencial (GIUSTI, WROLSTAD, 2001). Esta metodologia permite a quantificação das antocianinas totais e monoméricas em função do comportamento espectral diferenciado das monoméricas em relação às poliméricas em condições de pH distintas (pH=1,0 e pH=4,5). O extrato foi adicionado ao tampão cloreto de potássio (0,025 M, pH 1,0) e tampão acetato de sódio (4,0 M, pH 4,5). Após incubação no escuro durante 30 min à temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas, simultaneamente, como máximo de absorção para o espectro da luz visível (510 nm) e a 700 nm.

O teor de antocianinas foi calculado de acordo com a equação:

$$[(A_{\lambda vis\text{-}max} - A_{\lambda 700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda vis\text{-}max} - A_{\lambda 700nm})_{pH\ 4.5}] \times PM \times 1000 \times \varepsilon^{-1}$$

Onde:

A = absorbância pH=1,0 e pH=4,5;

PM = peso molecular da cianidina 3-O-glicosídeo = 449,2 g/mol

ε = absortividade molar de cianidina 3-glicosídeo = 26.900 $M^{-1}cm^{-1}$;

Os resultados foram expressos como mg de cianidina 3-O-glicosídeo/100 g de polpa de açaí.

5.1.5. Determinação da atividade antioxidante

5.1.5.1. DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com o método radical DPPH previamente descrito por Brand-Williams e cols. (1995) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH• (2,2-difenil-1- picril-hidrazil) em solução de metanol. Quando este radical é misturado com um antioxidante, sua cor muda de púrpura para amarelo do correspondente hidrazina. A habilidade da amostra em reduzir a absorbância do DPPH é indicativa de sua capacidade de neutralizar radicais livres. Este é um dos métodos químicos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de um composto por ser considerado prático, rápido e estável.

Preparou-se uma solução de metanol contendo 0,06 mM de DPPH. Uma alíquota de 100 µl de extrato de polpa foi adicionado a 3,9 ml desta solução. A diminuição da absorbância a 515 nm foi medida em intervalos de 1 minuto nos primeiros 10 minutos e depois em intervalos de 5 minutos até estabilização (120 minutos). A capacidade antioxidante foi expressa como EC_{50} (amostra mínima concentração necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH • em 50%) e os valores expressos em g de polpa de açaí/g de DPPH.

O cálculo da atividade antioxidante foi determinado de acordo com os valores de absorbância transformados em % Inibição através da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{branco} - A_{extrato})/A_{branco}] \times 100$$

Em seguida, plotou-se um gráfico (% de Inibição x [µg/ml do extrato]) para realização do cálculo de IC_{50}, que corresponde a concentração necessária para inibir a solução inicial de DPPH em 50%.

Posteriormente, com bases nos valores de IC_{50}, calculou-se o índice de atividade antioxidante (IAA), proposto por Scherer & Godoy (2009) para padronizar a classificação da atividade antioxidante de diversos alimentos e frutas (SCHERER, GODOY, 2009). Sendo assim, considerou-se IAA < 0,5 como pobre atividade antioxidante, IAA entre 0,5 e 1 como moderada atividade antioxidante, IAA entre 1 e 2 como forte atividade antioxidante e IAA > 2 como muito forte atividade antioxidante.

5.1.5.2. ABTS

A capacidade antioxidante da polpa de açaí foi determinada pela metodologia de captura do radical 2,2´- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – ABTS, como descrito por Rufino et al., 2007. Essa reação de captura do ABTS promove uma modificação na cor da reação, passando de verde escuro a verde claro. Através dessa metodologia é possível medir a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos.

Inicialmente, adicionou-se 5 mL da solução aquosa de ABTS (7mM) e 88µl de persulfato de potássio (140mM) em tubos de ensaio. A mistura permaneceu em repouso por 16h antes da análise, no escuro, para geração do cátion radical cromóforo ABTS+. Em seguida, diluiu-se 1 ml desta mistura em etanol até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Para determinação da atividade antioxidante da polpa de açaí, adicionou-se 30 µl de amostra ou série de padrões em 3 mL da solução ABTS+, e após 6 minutos foi realizada a leitura das absorbâncias. O etanol foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro. O trolox foi utilizada como padrão de referência para determinação da capacidade antioxidante da polpa, em diferentes concentrações (10, 25, 50, 100, 150 e 200 g/L). Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao trolox (µM TEAC/g de polpa de açaí).

5.2. Delineamento Experimental

5.2.1. Dietas

Os animais foram alimentados com dieta padrão AIN-93G (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993), ou dieta hiperlipídica com 40% de banha de porco e 1% de colesterol,

suplementadas ou não com polpa de açaí. A composição das dietas experimentais se encontra na Tabela 3. Os valores de banha de porco e colesterol foram definidos a partir de trabalhos previamente publicados (BURGUENO et al., 2013; GUERRA et al., 2015). A suplementação com 2% de polpa de açaí (20g) foi baseada em trabalhos experimentais prévios (DE SOUZA et al., 2010).

Tabela 3: Composição das dietas experimentais utilizadas no trabalho

Nutrientes (g)	**Dietas**			
	C	**HF**	**CA**	**HFA**
Caseína	200	260	200	260
Amido Milho	530,7	170,7	510,7	150,7
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de Soja*	70	40	70	40
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mist. Minerais[1]	35	35	35	35
Mist. Vitaminas[2]	10	10	10	10
Celulose	50	50	50	50
Metionina	1,8	1,8	1,8	1,8
Colesterol	0	10	0	10
Banha de Porco	0	320	0	320
Açaí	0	20	0	20
Valor Calórico (kcal)¥	3960	5370	3880	5290
Carboidrato	2522,8 (63,7%)	1082,8 (20,2%)	2442,8 (63%)	1002,8 (19%)
Proteína	807,2 (20,4%)	1047,2 (19,5%)	807,2 (20,8%)	1047,2 (19,8%)
Lipídeos	630 (15,9%)	3240 (60,3%)	630 (16,2%)	3240 (61,2%)

C, dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; H, dieta hiperlipídica; A, dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HA, dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí.
¥ Fatores de conversão: proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g, açúcares 4 kcal/g.

5.2.2. Animais

Um total de 32 ratas Fischer, albinas, com aproximadamente 90 dias de idade, foram obtidas do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto e lá permaneceram durante todo o procedimento para geração do modelo experimental.

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a dieta recebida: controle (C), hiperlipídica (HF), controle + açaí (CA) e hiperlipídica + açaí (HFA). Após um período de duas semanas para adaptação às respectivas dietas, as ratas foram acasaladas a fim de obter a prole a ser utilizada neste trabalho. No acasalamento duas fêmeas e um macho foram alocados em gaiola plástica por um período de cinco dias. Findado este período, os machos foram retirados e as fêmeas foram transferidas para gaiolas individuais, onde continuaram a receber água e as respectivas dietas *ad libtum*, durante todo o período de gestação (~21 dias) e de lactação (~21 dias). Ao nascimento, parte da ninhada foi eutanasiada. O restante dos animais foi mantido em até seis filhotes por mãe, com o objetivo de garantir crescimento homogêneo das ninhadas. Ao desmame, ocorreu a eutanásia das mães

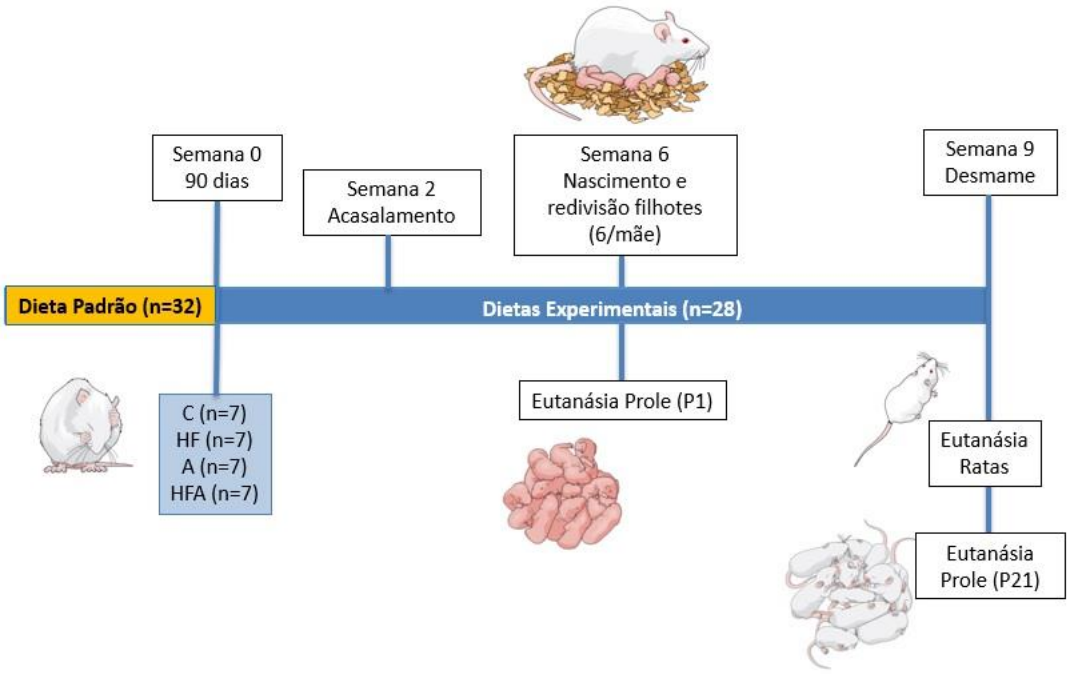


Figura 4: Delineamento experimental.

e dos filhotes restantes.

Todos os procedimentos contidos nesse projeto foram submetidos à apreciação da Câmara de Experimentação Animal do Comitê de Ética e Pesquisa da UFOP e aprovado protocolo CEUA 2015/15 (Anexo 1).

5.2.2.1. Fase I – Gestação e Lactação

Foram utilizadas 28 ratas fêmeas primíparas, espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Fisher, com 90 dias de idade. Inicialmente as ratas foram divididas aleatoriamente em quatro

grupos (n=7), de acordo com a dieta recebida. Os animais foram submetidos a um período de adaptação à dieta de duas semanas e durante esse tempo foram mantidas em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP, em ambiente com controle de fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e temperatura a 21° C ± 2°. Passado este período as ratas foram submetidas a acasalamento aleatório poligâmico, de duas fêmeas para um macho, em caixa de polipropileno. Os machos foram retirados da caixa após um período de cinco dias.

Durante o período de gestação e lactação, as ratas continuaram a receber suas respectivas dietas e água *ad libitum*. Logo após o nascimento, uma parte dos filhotes foi eutanasiada e a outra redistribuída aleatoriamente de modo que foram mantidos até seis filhotes por matriz para garantir o crescimento homogêneo das ninhadas.

Findado o período de lactação as matrizes foram anestesiadas via inalação de isoflurano, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para coleta de sangue no plexo braquial. A eutanásia das ratas foi feita através de exsanguinação e o sangue e tecido hepático foi coletado para posteriores análises.

5.2.2.2. Fase II – Prole

Uma parte dos filhotes logo após o nascimento foi eutanasiada e tiveram o peso corporal e do fígado aferidos. O fígado foi coletado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Foram utilizados 14 animais machos da prole pós-natal 1 (P1).

O restante dos animais foi redistribuído de modo a manter até 6 filhotes por rata com o objetivo de garantir crescimento homogêneo da ninhada. Os filhotes permaneceram em gaiolas junto com as ratas durante todo o período lactacional. Ao final do período de lactação (aproximadamente 21 dias), a prole pós-desmame (P21) foi eutanasiada. Foram utilizados 28 filhotes machos, sendo 7 animais provenientes de cada grupo (C, HF, CA e HFA). No momento da eutanásia foram aferidos o peso corporal e peso do fígado. O sangue e o tecido hepático foram armazenados a -80°C para posteriores análises.

A escolha do gênero macho para o desenvolvimento do trabalho vai de encontro a artigos analisados na literatura que apontam para maiores prevalências de DHGNA em meninos do que em meninas (PADILHA et al., 2010).

Todos os animais foram anestesiados via inalação de isoflurano, de acordo com o CONCEA. Dos filhotes P1 foram retirados apenas o fígado enquanto da P21 foi realizado a coleta de sangue no plexo braquial. A eutanásia dos animais P1 foi realizada por decapitação e a P21 foi realizada através de exsanguinação.

5.3. Amostra de sangue e fígado

A obtenção de amostras sanguíneas foi realizada após 12 horas de jejum, a partir do rompimento dos vasos do plexo braquial. De cada rata foram retirados 2 ml, enquanto da P21 obteve-se aproximadamente 1 ml. Os microtubos contendo o sangue total foram centrifugados a temperatura ambiente a 3.500 rpm, durante 15 minutos (Modelo 5810R, Eppendorff). Após a centrifugação o soro foi recolhido e acondicionado em novos microtubos devidamente identificados e armazenados a -80° C para posterior análise.

O fígado das matrizes e da prole foi coletado logo após eutanásia. Depois da retirada do órgão, ele foi lavado em solução salina gelada (0,9%), pesado, identificado e armazenado a -80° C até a realização das análises subsequentes.

5.4. Análises Morfohistológicas

Após a pesagem do órgão, o menor lobo do fígado dos animais foi cortado e fixado em formol tamponado a 4%. Após a fixação, os lobos transversalmente cortados e processados em concentrações decrescentes de álcool e selados em parafina. Através de um micrótomo semi-automático, as secções parafinadas foram laminadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para verificar o acúmulo de lipídeos.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio acoplado à câmera digital. O grau de esteatose hepática foi avaliada de acordo com escores definidos em estudos anteriores (BRUNT, 2016). O grau de esteatose se baseia no percentual de hepatócitos que apresentam acúmulo de gordura, sendo Grau 1: < 33% dos hepatócitos afetados; Grau 2: entre 33% e 66% dos hepatócitos afetados; Grau 3 > 66% dos hepatócitos afetados. Foram analisados quinze campos aleatórios por lâmina.

5.5. Dosagens Bioquímicas

A avaliação dos níveis séricos de triglicérides e colesterol total dos animais, foram determinados por métodos enzimáticos utilizando-se kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A função hepática foi avaliada pela determinação sérica da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST). As análises foram realizadas utilizando técnica cinética-enzimática através de kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil), sendo o procedimento realizado de acordo com as instruções do fabricante.

5.6. Determinação de lipídeos totais no fígado

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método previamente descrito (FOLCH, LEES, SLOANE STANLEY, 1957). Aproximadamente 100 mg de fígado de cada animal foram pesados e transferidos para tubos de vidro previamente identificados. Foi adicionado 1,9 ml de solução contendo clorofórmio:metanol (2:1) e o tecido foi triturado usando-se homogeneizador do tipo *Potter*. Após homogeneização do tecido, foram adicionados 400 µl de metanol e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos de vidro com peso conhecido e identificados. Em seguida, foi acrescentado 800 µl de clorofórmio e 640 µl de solução de NaCl a 0,73%, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo desprezada a fase superior após a centrifugação. A parede interior de cada tubo então foi lavada três vezes com 600 µl de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%). Após esse processo, esperou-se a separação das fases e então foi descartada a fase superior (aquosa). O solvente foi evaporado *overnight* em estufa semiaberta a 60°C. Na manhã seguinte, os tubos foram resfriados em dessecador, pesados e a quantidade de lipídeos extraída foi calculada pela diferença dos tubos antes e depois do processo de secagem em estufa.

Para a determinação do conteúdo de colesterol total e triglicerídeo hepáticos, as amostras foram ressuspendidas em 500 µl de isopropanol e homogeneizadas até a completa solubilização dos lipídeos.

5.7. Enzimas Antioxidantes

5.7.1. Preparo das amostras

A determinação da atividade de enzimas antioxidantes foi realizada em sobrenadante de um homogenato preparado a partir do fígado dos animais. O protocolo para o preparo do homogenato foi baseado em um estudo prévio (RAMOS-VASCONCELOS, HERMES-LIMA, 2003). De cada animal pesou-se aproximadamente 100 mg de fígado e adicionou 1 ml de tampão gelado (fosfato de potássio 50 mM e EDTA 0,5 mM, pH=7,2). Na hora da homogeneização 10 µmol de PMSF (solução estoque a 1mM) foi incorporado ao microtubo, afim de evitar a degradação das enzimas. As amostras foram então homogeneizadas durante 1 minuto e colocadas no gelo por 30 segundos. Esse procedimento foi repetido três vezes. Logo após esse processo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C em 10000 RPM. O sobrenadante foi então coletado e armazenado para a dosagem de proteínas totais, atividade da CAT, GPx e SOD.

5.7.2. Proteínas totais

As proteínas totais do homogenato de fígado foram quantificadas segundo o método de Bradford (1976) (BRADFORD, 1976). Este ensaio tem como base o reagente *Coomassie Blue G-250* e utiliza a albumina bovina sérica como padrão. A ligação das proteínas ao reagente altera a coloração do ensaio, passando de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração de proteínas. Primeiramente, foi preparado o reagente *Coomassie Blue G-250* (0,01%) em 4,7% de etanol (p/v) e 85% ácido ortofósforico (p/v). Após dissolução completa do corante, foi adicionado quantidade suficiente para 1 L de solução com água destilada. A solução foi filtrada e armazenada em vidro âmbar. A albumina bovina sérica (BSA) utilizada como padrão, foi preparada inicialmente a 2,0 mg/ml. A partir dessa solução, diferentes diluições foram realizadas com concentrações variando entre 0,2 e 1,4 mg/ml de BSA. As amostras precisaram ser diluídas em água destilada (1:20). Em uma microplaca foram pipetados 10 µl de amostra diluída ou série de padrões e 190 µl do reagente *Coomassie Blue*. A microplaca foi incubada a 3 min e então foi realizado a leitura a 595nm. O branco da reação continha apenas *Coomassie Blue*. Todas os ensaios foram realizados em duplicata.

Os valores de proteínas foram determinados a partir da construção de uma curva padrão utilizando os valores de absorbância dos padrões e as concentrações de BSA. Os valores foram expressos em mg/ml.

5.7.3. Atividade da Catalase

A atividade da enzima CAT foi determinada baseando-se no método proposto por Aebi (AEBI, 1984). Em resumo, a capacidade antioxidante da enzima é avaliada de maneira cinética em espectrofotometria, através do monitoramento da decomposição do H_2O_2 durante 2 minutos a 240nm.

Primeiramente, foi preparada uma solução de H_2O_2 300mM em água destilada. Em um tubo de ensaio foi adicionado 955 µl do tampão e 10 µl da amostra diluída (1:20). Logo em seguida, adicionou-se 35 µl da solução de H_2O_2 300mM. O conteúdo foi transferido imediatamente para uma cubeta de quartzo e realizou-se a leitura a 240 nm durante 2 minutos, medindo a absorbância a cada 30 segundos. O delta foi obtido pela média da subtração do valor de absorbância inicial pelo final, e o resultado foi obtido através da fórmula:

$$\text{Atividade (U/L)} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \; x \; \frac{1}{\varepsilon H2O2} \; x \; \frac{VT}{VA} \; x \; 1000 \; x \; 20$$

Sendo:

ΔAbs = Variação da absorbância por 1 minuto de cinética enzimática linear

Δt = 1 minuto

εH_2O_2 (240 nm) = 40 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

VT = Volume total de reação

VA = Volume de amostra

1000 = Conversão de mmol para µmol (de acordo com a definição de atividade enzimática)

20 = Fator de diluição da amostra no procedimento

Os resultados foram expressos em U de CAT por mg de proteínas totais.

5.7.4. Atividade da Glutationa Peroxidase

A GPx tem uma ação não específica sobre o peróxido de hidrogênio, atuando também sobre vários substratos, como os hidroperóxidos orgânicos. A GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutationa reduzida (GSH) para formar glutationa oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido. Fisiologicamente, a GPx atua acoplada à enzima glutationa redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG, usando NADPH como coenzima. A atividade da GPx pode ser medida pela taxa de oxidação de NADPH na presença de GSH e GR. A azida sódica (N_3Na) é adicionada para inibir a catalase.

Em tubos de ensaio foi adicionado 82,5 µl de tampão fosfato 143 mM pH 7,5 EDTA 1mM, 125 µl de NADPH (0,29 mM), 5 µl azida sódica (100 mM), 12,5 µl de GSH (20 mM, diluída em ácido ortofosfórico 5%), 2,5 µl de GR (10 U/mL), 2,5 µl de KCN (9 mM) e 12,5 µl de hidroperóxido de tert-butil (10 mM). O conteúdo foi homogeneizado e adicionou-se em seguida, 5 µl de amostra diluída (1:20). A leitura foi realizada rapidamente em espectrofotômetro a 340 nm. Os valores de absorbância inicial e após 1 minuto, foram anotados para cálculo da atividade de GPx.

$$\text{Atividade (U/L)} = \frac{\Delta\, Abs}{\Delta\, t} \; x \; \frac{1}{\varepsilon NADPH} \; x \; \frac{VT}{VA} \; x \; 1000 \; x \; 20$$

Sendo:

Δ Abs = Variação DA absorbância por 1 minuto de cinética enzimática linear

Δt = 1 minuto

ε_{NADPH} = 6,22 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

VT = Volume total de reação (µL)

VA = Volume de amostra (µL)

10^3 = Conversão de mmol para µmol (conforme definição de $U.L^{-1}$)

20 = fator de diluição

Os resultados foram expressos em U de GPx por mg de proteínas totais.

5.7.5. Atividade da Superóxido Dismutase

O ensaio para determinação da atividade da enzima SOD foi realizado a partir do método proposto por Madesh e Balasubramanian (MADESH, BALASUBRAMANIAN, 1998). A metodologia tem como base a capacidade da enzima em neutralizar o ânion superóxido (O 2•-) produzido pela oxidação do pirogalol. O corante MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio brometo] é reduzido a cristais de formazan em reação dependente de O2 •- produzindo um composto de cor arroxeada medido através de espectrofotometria. Por meio da quantificação em unidades relativas, é possível determinar a capacidade de uma unidade de atividade enzimática (1U) da SOD em inibir a redução do MTT, é igual a 50%.

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 30 µl das amostras diluídas (1:20) e 99 µl do tampão fosfato de potássio 50 mM e EDTA 0,5 mM (descrito anteriormente). Para os poços contendo o branco e o padrão, o volume do tampão foi calculado para obtenção de um volume final de 150 µl por poço. Por conseguinte, acrescentou-se em todos os poços 6 µl de MTT (1,2 mM diluído no tampão), seguido de 15µl de pirogalol (15 mM diluído no tampão), em todos os poços, exceto no branco. Após esses procedimentos, a placa foi incubada em estufa com temperatura de 37°C durante 5 minutos. Logo em seguida foi adicionado 150 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) P.A. em todos os poços para promover a parada das reações e solubilização dos cristais formados. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas a 570nm. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteínas totais.

5.8. Marcadores do Estresse oxidativo

5.8.1. Proteina Carbonilada

A oxidação de proteína por ERO leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente.

Para determinar a concentração sérica dos níveis de proteína carbonílica foi realizado um ensaio conforme descrito previamente (LEVINE et al., 1990). Resumidamente, 100 µL de homogenato foram transferidos para um eppendorf e adicionados 600 µL de DNPH

(Sigma®). A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por um período de 60 minutos e a cada 10 minutos eram homogeneizados no vórtex. Após esse tempo, foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético (20%) e novamente homogeneizado no vórtex. Logo após, a mistura foi centrifugada a 10.000 RPM durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 800 µL de etanol-acetato de etila (proporção 1:1) a cada microtubo. O precipitado foi homogeneizado no vórtex até sua dissolução completa e novamente centrifugados a 10.000g a 4°C, durante 10 minutos. Este último passo foi repetido mais duas vezes. Ao final das repetições, o sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se 900 µL de guanidina. Os microtubos foram então colocados em banho-maria durante 60 minutos a 37° C. Após esse tempo, o sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Epoch, Biotek®) a 360 nm. A guanidina foi utilizada para zerar o aparelho. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de absorção molar do DNPH 22000 M^{-1} cm^{-1}. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmoles/mg de proteína.

5.8.2. Dialdeído Malônico

A concentração sérica dos níveis de peroxidação lipídica foi realizada conforme procedimento descrito previamente (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990). Basicamente, foram adicionados em um tubo tipo Falcon 50 µl de hidroxitolueno butilado (10 mM), 500 µl de ácido tricloroacético (20%), 500 µl de ácido tiobarbitúrico (1%), 250 µl do homogenato sem diluição (ou água para o branco ou série de padrões). A mistura foi homogeneizada e incubada a 100 °C durante 60 minutos. Após esse tempo, a mistura foi resfriada em água com gelo e adicionou-se 1,5 ml de butanol. A mistura foi novamente homogeneizada centrifugada a 1000g durante 5 mim. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Epoch, Biotek®) a 532 nm, acertando o zero com o branco da reação.

Como padrão de MDA foi utilizado o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMTP) (Sigma®) previamente diluído em água deionizada nas concentrações de 125 µM, 62,5 µM, 31,2 µM, 15,6 µM, 7,8 µM, 3,9 µM e 1,9 µM. Os resultados foram expressos em [nmol de MDA/mg de proteínas totais].

5.9. Expressão gênica

5.9.1. Isolamento do RNA total

A extração de RNA total foi realizada através de homogeneização de 10-20 mg de fígado congelado com 1ml do reagente TRI® (Invitrogen), uma solução que ajuda na lise celular e no isolamento do RNA. Posteriormente foi adicionado 100µL de mercaptoetanol, os tubos foram vigorosamente agitados e a mistura incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. Findado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 15 minutos a 12000RPM e o sobrenadante transferido para novos tubos livre de RNAse. Foi adicionado 500 µl de isopropanol às amostras, e então a mistura foi incubadas novamente a temperatura ambiente por 10 minutos. Logo após, as amostras foram novamente centrifugadas a 4°C durante 8 minutos a 12000RPM. O sobrenadante agora foi descartado e um precipitado de RNA pode ser visto no fundo do tubo. Este precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 75% e então centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 7500RPM. Após essa última centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. As amostras contendo o precipitado de RNA secaram a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Uma vez seco, o RNA foi ressuspenso em 50 µl de água DEPC para prevenir possíveis contaminações. As amostras ficaram em O/N a -20°C para quantificação de RNA no dia seguinte.

A quantificação do RNA foi realizada usando espectrofotômetro UV/VIS (*Thermo Spectronic, Helios γ).* A pureza do RNA foi determinada pela razão A=260/A=280.

5.9.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, 1 µl do RNA total (100 ng/µl) foi usado como molde e as reações calculadas para um volume final de 15 µl contendo: a) Supertranscriptase kit (Superscript Reverse transcriptase kit, Invitrogen, UK), b) 10-20 U de RNaOUT (Invitrogen, UK), c) mix de dexosinucleotidos fosfatados (10 mM, dNTPs, Promega, UK), d) 1 mg/ml de albumina bovina sérica (BSA, BioLabs, UK), e) 500 ng/µl de oligonucleotídeos randômicos (Random Hexamers, Promega, UK), f) água DEPC (Fisher Scientific, UK) e g) RNA total. O cDNA foi retrotranscrito através de um termociclador (iCycler, Biorad) utilizando o seguinte ciclo: 1) 10 minutos a 25°C, 2) 52 minutos a 42°C e 3) 10 minutos a 72°C.

5.9.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os níveis de expressão de mRNA foram avaliados pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os cDNAs obtidos por RT-PCR foram usados como moldes nas reações de qRT-PCR, utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendações do fabricante. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores se encontram na tabela 4 e foram desenhadas com base nas sequências disponíveis no banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Foram avaliadas as expressões dos genes *Fasn*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Sod1*, *Sod2*, *Sirt1*, *Sirt3*, *Ucp2* e *Srebpf1*. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência β-2 microglobulina.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (CT comparativo ou ΔΔCT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre diferentes amostras.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos

Gene	Sequência Iniciadores	Tamanho do Amplicon	ID
β-2 microglobulina	F- TGACCGTGATCTTTCTGGTG R- ATTTGAGGTGGGTGGAACTG	151 bp	
Fasn	F- CTTGGGTGCCGATTACAACC R- GCCCTCCCGTACACTCACTC	163 bp	
Gpx1	F - CACCGAAATGAATGATCTGC R - TGTATCTGCGCACTGGAAC	370 bp	
Gpx4	F - ATGCACGAATTCGCAGCC R - CTAGAGATAGCACGGCAGGTC	463 bp	
Sirt1	F- CTGTTTCCTGTGGGATACCTGACT R- ATCGAACATGGCTTGAGGATCT	105 bp	
Sirt3	F- GGCACTACAGGCCCAATGTC R- TCTCTCAAGCCCGTCGATGT	100 bp	
Sod1	F - GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC R - TAGCAGGACAGCAGATGAGT	447 bp	
Sod2	F - CTGAGGAGAGCAGCGGTCGT R - CTTGGCCAGCGCCTCGTGGT	258 bp	
Srebpf1	F- CCCAGGGCAGCTCTGTACTCC R- AAGCTGTCCCGCAGGTA	121 bp	
Ucp2	F- GGTAAAGGTCCGCTTCCAGG R- GCAAGGGAGGTCGTCTGTCA	230 bp	

F- Iniciador direto, R- Iniciador reverso

5.10. Western Blot

5.10.1. Extração proteica

A extração proteíca do fígado dos animais foi realizada através de homogeneização de aproximadamente 50 mg de tecido em 500 µl de tampão de lise celular (40 mM TRIS-HCl, pH=7,5; 300 mM NaCl; 2 mM Na_2EDTA; 2 mM EGTA; 2% Triton; 5 mM pirofosfato de sódio; 2 mM β-glicerofosfato; 2 mM Na_3VO_4; 2 µg/ml leupeptina, (*Cell Signaling, UK*) contendo 1mM de PMSF (Sigma, Aldrich, UK) e coquetel inibidor de proteína (1:100, Sigma

Aldrich, UK). Após a homogeneização, o conteúdo foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 14000 RPM. O sobrenadante foi coletado em novos tubos e armazenado a -20°C para posterior utilização.

5.10.2. Proteínas totais

O conteúdo de proteínas no homogenato do fígado foi determinado utilizando *kit* comercial da Bio-Rad (DC™ Protein Assay, Bio-Rad, UK) seguindo recomendações do fabricante. Primeiramente, foi preparada uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina bovina sérica nas primeiras cinco colunas de uma placa de 96 poços (0 µg/µl; 0,5 µg/µl; 1,0 µg/µl; 1,25 µg/µl). Cada amostra foi determinada em duplicata utilizando 5 µl de amostra diluída em água (1:25, v/v). Em cada poço foi adicionado 25 µl do reagente A e 200 µl do reagente B. Após adição dos dois reagentes, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 15miutos. A leitura foi realizada através da absorbância medida em espectrofotômetro a 690 nm. O valor correspondente das absorbâncias foi extrapolado a partir de uma curva de concentração de proteína (mg/µl)

5.10.3. Expressão proteica de SIRT1 e SREBP1

O volume de amostra correspondente a 30µg de proteína foi diluída com o *loading buffer*, as proteínas foram desnaturadas (95°C, 5 min) e o conteúdo transferido diferentes poços em um gel 12% SDS-Page. As diferentes proteínas foram separadas a 150V durante 60 minutos usando sistema da Bio-Rad. Após a migração completa das amostras, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, usando uma voltagem constante de 360mA durante 45 minutos. Finalizado esse processo, as membranas foram lavadas durante 5 minutos com tampão TBS e imersas em tampão bloqueador durante 1 hora em temperatura ambiente. Simultaneamente, o gel foi corado com *comassie blue* com o objetivo de verificar se a transferência das amostras ocorreu perfeitamente. Uma vez completo o tempo de incubação, as membranas foram lavadas com tampão TRIS Tween-20 (TBST) durante 15, com troca da solução a cada 5 minutos. Então, as membranas foram incubadas *overnight* com os respectivos anticorpos primários anti-SIRT1, anti-SREBP e anti-actina, todos obtidos da Abcam (Cambridge, UK; 1:2000 ou 1:10000, diluído em 5% de albumina bovina sérica em TBST), a 4°C e misturados continuamente. No outro dia, as membranas foram lavadas novamente como descrito acima, e logo em seguida incubadas com anticorpo secundário (1:5000 em tampão bloqueador) durante 1 hora em temperatura ambiente e misturados

constantemente. Logo após esse período, as amostras foram lavadas novamente com TBST como mencionando anteriormente. A detecção das proteínas foi realizada utilizando ECL Pro System (Thermo Scientific™), usando o sistema PeqLab (Fusion Fx7, Vilber). A intensidade das bandas obtidas foi quantificada utilizando o programa Image J e o resultados foram expressos como unidades arbitrárias relativas a expressão da proteína de referência actina.

5.11. Análises Estatísticas

Todos os dados foram testados seguindo a normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição gaussiana. Os dados dos quatros grupos foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para detectar diferenças entre os grupos e expresso como média ± desvio padrão (DP). Os dados de dois grupos, usados para análises de expressão gênica, foram comparados através do teste *t*-Student. Os dados de histologia e expressão proteica representam análises semi-quantitativas, portanto, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e os valore estão apresentados como mediana e intervalo (valores mínimo e máximo). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 6 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) e foi considerada estatisticamente significativa para valores de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Polpa de açaí

6.1.1. Composição físico-química

Os resultados para a composição física da polpa de açaí incluem os dados de acidez titulável de 0,36 ± 0,06 g de ácido cítrico em 100 g de polpa, e pH de 4,72. A composição química da polpa de açaí congelada incluem os macronutrientes, fibra solúvel e insolúvel e cinzas. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Composição química da polpa de açaí utilizada no estudo

	Polpa de açaí (100g)
Umidade (%)	90,18 ± 0,17
Proteína (g)	0,89 ± 0,01
Lipídeos (g)	3,95 ± 0,28
Carboidrato (g)	2,31
Fibra Solúvel (g)	0,37 ± 0,2
Fibra Insolúvel (g)	1,9 ± 1,03
Cinzas (g)	0,4 ± 0,01

6.1.2. Teor de polifenóis e antocianinas

Os resultados do conteúdo de polifenóis totais e antocianinas da polpa congelada de açaí analisada encontra-se apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Teores de polifenóis totais e antocianinas na polpa congelada de açaí

	Polifenóis Totais (EAG)	**Antocianinas (mg antocianina)**
Polpa de Açaí (100g)	549,51 ± 60,97	6,47 ± 1,21

EAG: equivalente de ácido gálico

6.1.3. Capacidade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante da polpa de açaí pelos métodos ABTS •+ e DPPH• estão apresentados na Tabela 7. Pelo método do ABTS •+ a polpa de açaí apresentou uma atividade antioxidante de 9,4 ± 0,05 µM de trolox/g de polpa. A polpa de açaí apresentou uma capacidade de sequestrar o radical DPPH• de 4458,34 ± 333,92 g de polpa de açaí⁄g de DPPH•.

Tabela 7: Atividade antioxidante pelos métodos do radical $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ para polpa congelada de açaí.

	ABTS (µM de trolox/g)	EC_{50}[a] (g de polpa de açaí/g de DPPH)	IC_{50}	Índice de Atividade Antioxidante
Polpa de Açaí	31,15 ± 0,05	0,5	88%	2,4

6.2. Caracterização da DHGNA

Esta seção dos resultados apresenta a caracterização da DHGNA nas ratas e vista entender de que forma o excesso de lipídeos da dieta materna é capaz de alterar o metabolismo do fígado da prole pós-parto e pós-desmame de forma macroscópica, microscópica e também através da avaliação de marcadores bioquímicos de dano hepático.

A Tabela 8 inclui os resultados de ingestão alimentar, peso corporal, peso absoluto e relativo do fígado. Podemos observar que a ingestão alimentar das ratas que receberam dieta rica em gordura suplementada ou não com polpa de açaí, foi menor que os grupos alimentados com dieta C e CA, e a suplementação com 2% de polpa de açaí não afetou a ingestão alimentar das ratas. Em relação ao peso corporal, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas no período inicial e pré-gestacional. No entanto, ao final do estudo, as ratas que receberam dieta HFA tiveram peso corporal significativamente maior (19%) do que o grupo C ($p < 0,05$, Tabela 8). O peso do fígado também foi medido ao final do experimento: o grupo HF apresentou aumento significativo no tamanho total do órgão comparado aos grupos C (46%, $p < 0,005$) e CA (73%, $p < 0,001$), enquanto o grupo HFA apresentou aumento (42%) apenas em relação ao grupo CA ($p < 0,01$). No entanto, ao avaliar o peso relativo do órgão em relação do peso corporal, observou-se redução estatisticamente significante (25%) no grupo HFA em comparação com HF ($p < 0,05$).

O aumento no peso absoluto do fígado pode estar relacionado com a deposição de gordura, característica clínica do modelo proposto. Entretanto, é preciso realizar análises específicas para definir o desenvolvimento da DHGNA.

Tabela 8: Ingestão alimentar, peso corporal e peso do fígado das ratas

	C	HF	CA	HFA
Ingestão alimentar (g/dia)	13,82 ± 1,36	9,66 ± 1,15$^{\#*}$	14,73 ± 1,14	10,91 ± 0,67$^{\#*}$
Peso corporal inicial (g)	210,1 ± 8,83	210,4 ± 10,48	205,4 ± 8,35	218,9 ± 12,84
Peso corporal pré-gestacional (g)	215,4 ± 11,16	220,7 ± 13,62	212,1 ± 8,49	226,5 ± 15,06
Peso corporal final (g)	213,1 ± 20,78	230,9 ± 12,61	237,7 ± 27,63	255,6 ± 29,68$^{\#}$
Peso absoluto do fígado (g)	7 ± 1,17	10,23 ± 2,89$^{\#*}$	5,90 ± 0,52	8,39 ± 0,99*
Peso relativo do fígado (%)	3,33 ± 0,73	4,45 ± 1,03$^{\#*}$	2,53 ±0,55	3,30 ± 0,34§

C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí.Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 filhotes por grupo). One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.
$^{\#}$ p < 0,05 versus C
* p < 0,05 versus A
§ p < 0,05 versus HF

O efeito de uma dieta hiperlipídica suplementada ou não com açaí durante a gravidez na prole foi investigado em filhotes eutanasiados 1 dia após o nascimento (P1). O peso corporal não se alterou entre os grupos (Tabela 9), enquanto que, quando considerado o peso absoluto e relativo do fígado, HFA-P1 apresentou uma diminuição de 27% no tamanho do órgão e 33% no peso relativo (p <0,05 e p <0,001, respectivamente) em comparação com o grupo HF-P1.

Da mesma forma, o efeito das diferentes dietas durante a gestação e lactação foi avaliado em filhotes eutanasiados ao final do período de lactação (P21). Um aumento no peso corporal dos filhotes de HF-P21 (40%, p <0,01 versus CA-P21) e HFA-P21 (25%, p <0,05 versus C-P21; 60%, p <0,001 versus CA-P21) foi observado (dados mostrados na Tabela 9). O peso absoluto do fígado também foi determinado ao final do experimento, e o grupo HF-21 mostrou um aumento em comparação com o grupo C-P21 (47%, p <0,005) e grupo CA-P21 (59%, p <0,001). Também foi observado um aumento no grupo HFA-P21 (40%, p <0,01 versus C-P21; 51%, p <0,001 versus CA-P21). Ao considerar o peso relativo do fígado, a suplementação de polpa de açaí à dieta HF das ratas preveniu o aumento do peso do fígado (17%) quando comparado com a HF-P21, enquanto a alimentação das ratas durante a

gestação e lactação induziu um aumento (35%) no peso relativo do fígado em relação a prole proveniente de dieta controle (p <0,005, Tabela 9).

Assim como o encontrado para as ratas, a prole HF-P1 e HF-P21 apresentaram aumento no peso do fígado. Estes dados sugerem que a dieta empregada neste estudo, pode ser capaz de alterar o metabolismo da prole através do aumento da entrega de nutrientes via cordão umbilical, refletida no aumento do peso do órgão. Além disso, os estudos em modelos experimentais mostram que se a prole é desmamada em um ambiente adverso, as desordens metabólicas tendem a piorar (WILLIAMS et al., 2014).

Tabela 9: Peso corporal e peso do fígado da prole P1e P21.

	Prole-P1		**Prole-P21**			
	HF-P1	**HFA-P1**	**C-P21**	**HF-P21**	**CA-P21**	**HFA-P21**
Peso corporal (g)	5,43 ± 1,07	5,93 ± 0,59	30,49 ± 3	33,67 ± 5,8*	23,96 ± 4,43	38,36 ± 7,46$^{*\#}$
Peso absoluto do fígado (g)	0,296 ± 0,02	0,217 ± 0,06§	1,11 ± 0,14	1,64 ± 0,26$^{\#*}$	1,03 ± 0,21	1,56 ± 0,23$^{\#*}$
Peso relativo do fígado (%)	5,65 ± 1,14	3,75 ± 1,28§	3,67 ± 0,54	4,96 ± 0,89$^{\#}$	4,32 ± 0,38	4,1 ± 0,25§

HF-P1: prole pós-parto proveniente de dieta materna hiperlipídica; HFA-P21: prole pós-parto proveniente de dieta materna hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 filhotes por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste *t*-student ou One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.
$^{\#}$ p < 0,05 versus C-P21
* p < 0,05 versus CA-P21
§ p < 0,05 versus HF-P21

O desenvolvimento da DHGNA está associado ao acúmulo intra-hepático de gordura. Sendo assim, foram avaliadas as características histológicas e definido o grau de esteatose seções de fígado (Figura 4 e Figura 5). A análise histológica revelou que o grupo HF apresentou maior grau de esteatose (moderada e acentuada), enquanto o grupo HFA apresentou atenuação da esteatose quando comparado com a HF (Figura 5B e 5D; Figura 6). Além disso, o acúmulo de gotículas lipídicas no fígado é acompanhado por presença de infiltrado inflamatório celular.

Os achados histológicos, corroboram com o desenvolvimento da DHGNA em modelos experimentais utilizando dieta materna hiperlipídica (WILLIAMS et al., 2014).

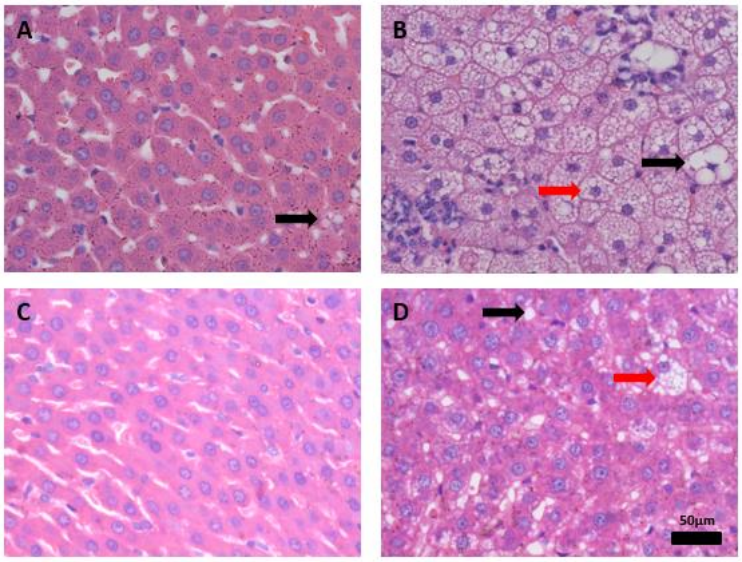


Figura 5: Cortes histológicos representativos do fígado das ratas alimentadas com dieta controle (A), hiperlipídica (B), açaí (C) e hiperlipídica suplementada com açaí (D), corados com hematoxilina e eosina. A seta preta indica macroesteatose e a seta vermelha mostra microestaose. As imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400 ×. Escala de Barra = 50 µm.

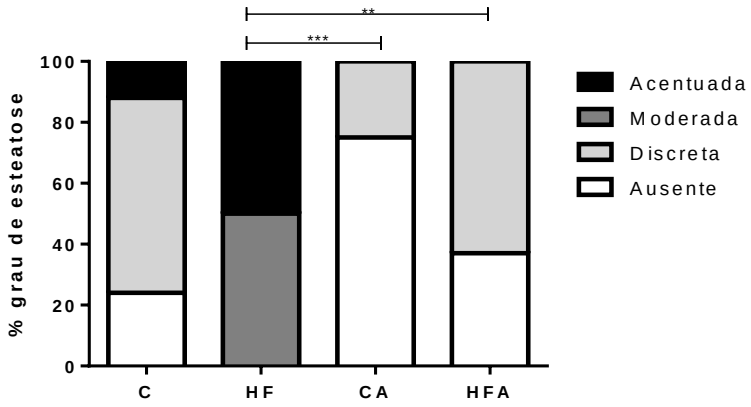


Figura 6: Grau de esteatose hepática das ratas. C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. (n = 7 ratas por grupo). Valor de p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo para o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. ** <0,01, *** <0,005.

Objetivando investigar o efeito da dieta materna sobre o fígado da prole, foram realizadas fotografias de tecido previamente tratado e corado. As fotos representativas de

cada grupo experimental se encontram na Figura 7 e análise o grau de esteatose pode ser observado na Figura 8.

Através da histologia e do grau de esteatose dos fígados P21 (Figura 7A), foi possível observar que os filhotes HF-P21 tinham mais gotículas lipídicas em comparação com os filhotes do grupo CA-P21 e HFA-P21. A prole HF-P21 apresentaram um grau de esteatose (leve a moderado, Figura 7B) mais pronunciado que o grupo CA-P21 e HFA-P21 (ausente a leve). O grupo HFA-P21 apresentou menor grau de esteatose (Figura 8), sugerindo um efeito protetor do açaí em relação ao acúmulo de lipídios hepáticos.

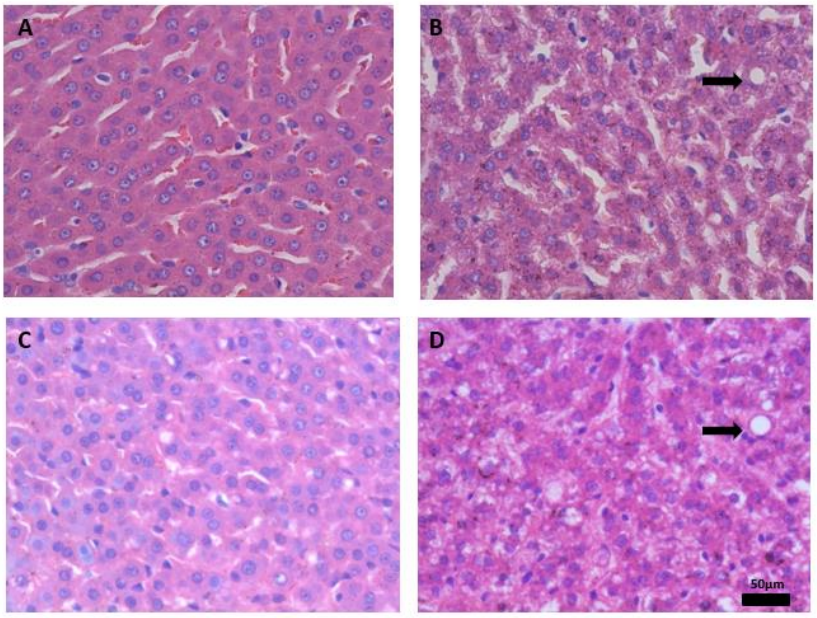


Figura 7: Cortes histológicos representativos do fígado da prole P21 proveniente de dieta materna controle (A), dieta materna hiperlipídica (B), dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí (C) e dieta materna hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí (D), corados com hematoxilina e eosina. A seta preta indica macroesteatose. As imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400 ×. Escala de Barra = 50 µm.

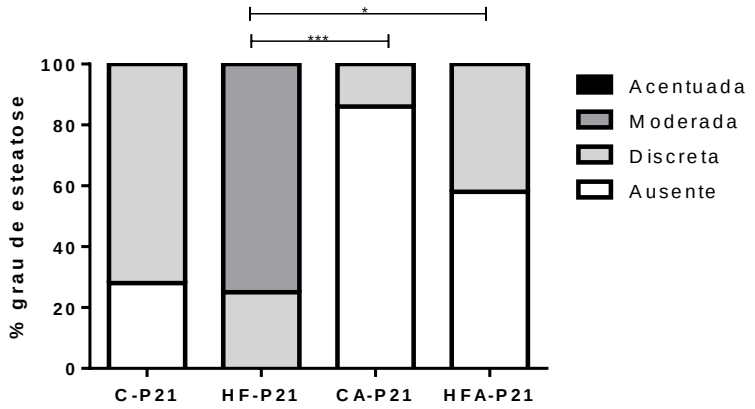


Figura 8: Grau de esteatose hepática da prole P21. C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. (n = 7 filhotes por grupo). Valor de p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo para o Kruskal-Wallis. * <0,05, *** <0,005

As atividades de AST e ALT foram determinadas no soro como biomarcadores da extensão do dano hepático (Figura 9). As ratas do grupo HF e HFA apresentaram um aumento significativo (48% e 51%, respectivamente) na AST quando comparado ao grupo C (p <0,01 para ambos), enquanto a atividade da ALT foi significativamente aumentada no grupo HF (168% versus o grupo C; 152%, versus grupo CA) e grupo HFA (161%, versus grupo C; 146%, versus grupo CA).

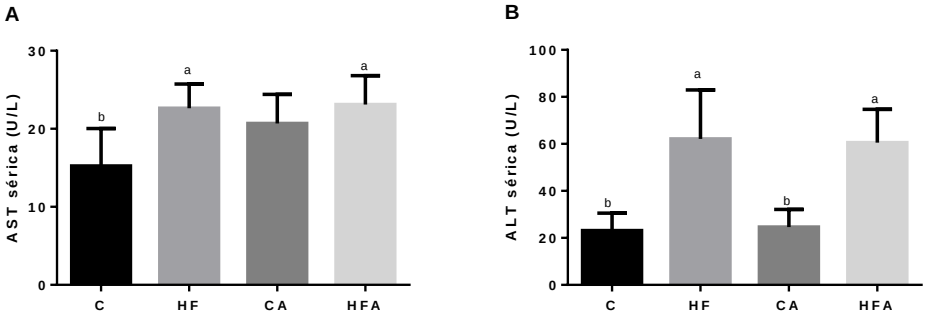


Figura 9: Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) das ratas. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 ratas por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

Com o objetivo de avaliar o dano hepático de uma dieta materna rica em gordura sobre a prole, as atividades das enzimas ALT e AST também foram determinadas no soro dos

filhotes pós-desmame, entretanto os valores de ALT e AST não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 10).

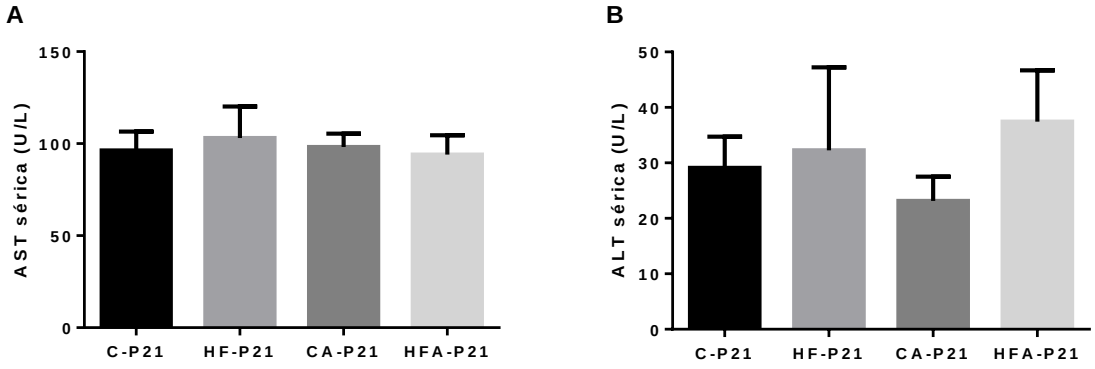


Figura 10: Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) da P21. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 filhotes por grupo). Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

6.3. Metabolismo lipídico

O processo de desenvolvimento de DHGNA está associado com perturbação do metabolismo de lipídeos e consequente esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de gordura intra-hepática, principalmente TAG. Portanto, foi avaliado nas ratas e na prole, o perfil lipídico sérico. Primeiramente, foi verificado os níveis séricos de colesterol total, triglicérides, colesterol HDL e colesterol não-HDL. Os dados podem ser observados na Figura 11.

Ratas alimentadas com dieta HFA apresentaram aumento significativo no colesterol total quando comparado a C (86%, p <0,01), HF (53%, p <0,05) e CA (147%, p < 0,005) (Figura 11A), enquanto que nenhuma alteração foi observada nos níveis séricos de triglicerídeos (Figura 11B). Os valores de colesterol HDL apresentaram aumento no grupo HFA (43%, p< 0,01) (Figura 11C) em relação ao grupo HF, indicando que o aumento do colesterol total pode estar relacionado com o aumento das moléculas de HDL no soro. Os níveis séricos de colesterol não HDL, que incluem as frações LDL, VLDL e IDL, foram maiores no grupo HFA comparado ao grupo C (117%, p<0,05) e CA (206%, p<0,01).

Embora o aumento do colesterol não HDL represente um risco aterogênico, acredita-se que este aumento seja uma forma de aumentar a retirada de ácidos graxos do fígado, através da liberação de TAG via lipoproteínas. Entretanto são necessários mais estudos para avaliar qual o direcionamento dessas TAG. Com base no aumento do peso dos animais do grupo HFA em relação ao grupo C e CA, é provável que esteja ocorrendo um *crosstalk* entre o tecido adiposo e o fígado.

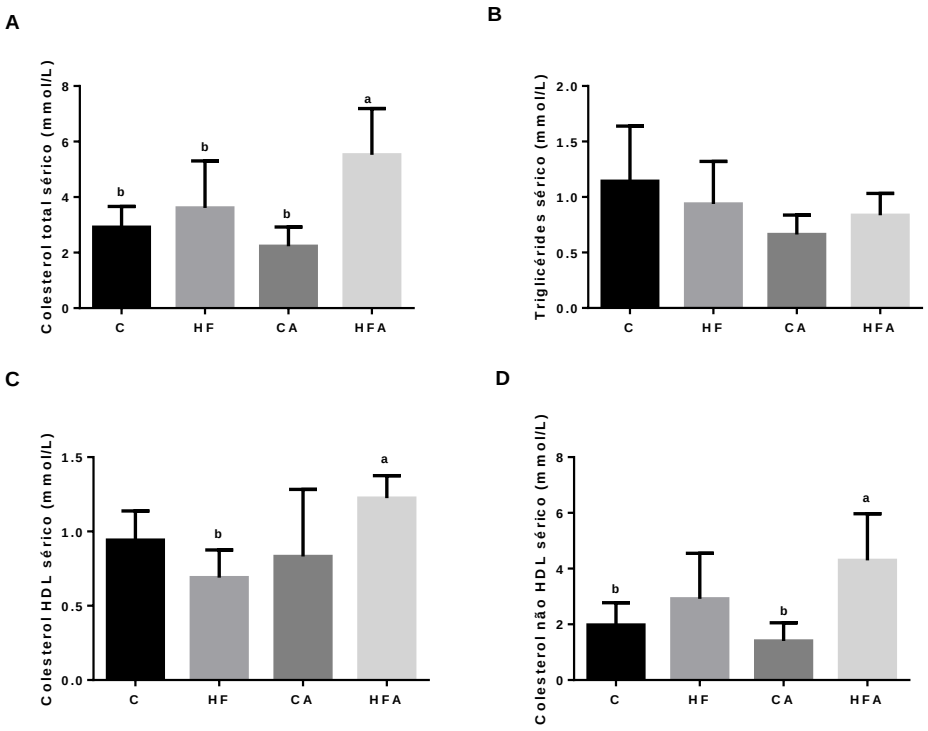


Figura 11: Níveis séricos de colesterol total (A), triglicérides (B), colesterol HDL (C) e colesterol não-HDL (D) das ratas. C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 ratas por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

Para avaliar o metabolismo de lipídeo e se a dieta materna HF é capaz de promover alterações precoces na dinâmica do fígado, nós avaliamos o perfil lipídico sérico da prole P21. Os dados se encontram na Figura 12. A prole HF-P21 apresentou um aumento significativo no colesterol sérico em relação ao grupo C-P21 (58%, p <0,005) e CA-P21 (48%, p <0,01), enquanto a suplementação com polpa de açaí no grupo HF preveniu aumento nos níveis de colesterol (57%, p<0,001) quando comparado ao grupo HF-P21. Não foram observadas diferenças nas concentrações de triglicérides e colesterol HDL entre os grupos. Entretanto, observa-se um aumento nas concentrações séricas da fração de colesterol não

HDL em relação ao grupo C-P21 (72%, p<0,005), CA-P21 (58%, p<0,01) e HFA-P21 (91%, p<0,001).

Alterações no metabolismo de lipídeos são conhecidos por desencadear mudanças na dinâmica do fígado. Uma vez que a alimentação fetal é diretamente via cordão umbilical, o influxo de lipídeos a partir da placenta é intrinsicamente ligado a alterações metabólicas envolvidas na programação da DHGNA. Estes dados suportam a ideia que a suplementação com polpa de açaí é capaz de proteger o fígado fetal contra insultos causados pelo excesso de lipídeos.

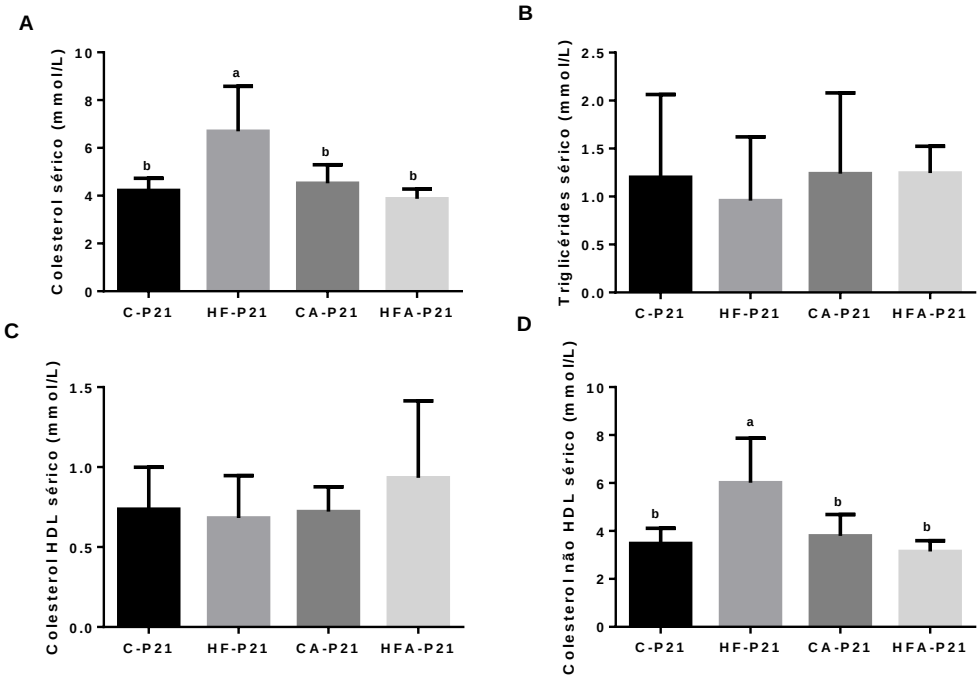


Figura 12: Níveis séricos de colesterol total (A), triglicérides (B), colesterol HDL (C) e colesterol não-HDL (D) da P21. C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n=7 filhotes por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

O conteúdo de gordura total, colesterol e triglicérides no fígado foram verificados para avaliar a extensão da DHGNA; os resultados estão apresentados na Figura 13. Observou-se um aumento significativo no conteúdo total de gordura no grupo HF em relação ao C (117%, p <0,005), CA (278%, p <0,001) e HFA (82%, p <0,01) (Figura 13A). Os níveis de colesterol hepático foram maiores nas ratas alimentadas com dieta HF (654%, p <0,001 versus C; 742%, p <0,001 versus CA) e HFA (358%, p <0,001 versus C; 412%, p <0,001

versus CA), mas o grupo HFA apresentou valores mais baixos (36%) em relação ao grupo HF (p <0,005). O conteúdo de triglicérides hepáticos no grupo HF também foi significativamente maior do que o observado no grupo CA (61%, p <0,05). Além disso, a suplementação com polpa de açaí preveniu o aumento do conteúdo de triglicérides para os níveis observados nos grupos C e CA. Estes dados reforçam o efeito protetor do açaí em prevenir acúmulo de lipídeos intra-hepáticos em ratas alimentadas com dieta rica em gordura.

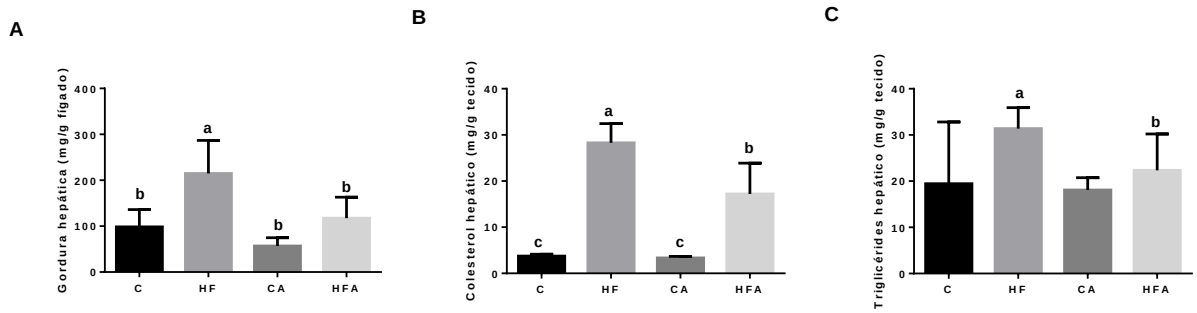


Figura 13: Níveis hepáticos de gordura total (A), colesterol total (B) e triglicérides (C) das ratas. C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 ratas por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

Os níveis de lipídeos hepáticos também foram verificados na P21, a fim de determinar o efeito da dieta materna na promoção de alterações precoces na dinâmica hepática (Figura 14). Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de gordura hepática entre os grupos. A dieta HF-P21 e HFA-P21 induziu um aumento na concentração de colesterol total quando comparada à prole C-P21 (134%, p <0,001) e CA-P21 (123%, p <0,001). Observamos que a introdução de açaí na dieta controle (CA-P21) preveniu o aumento de triglicérides no fígado que foi observado nos grupos HF-P21 e HFA-P21 (níveis reduzidos em 87%, p <0,01 e 90%, p <0,01, respectivamente).

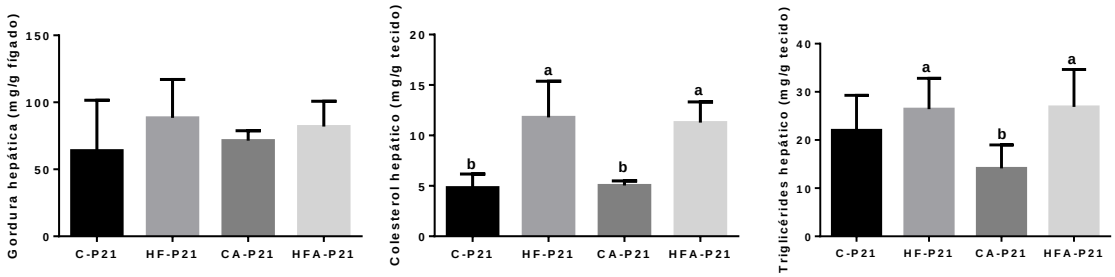


Figura 14: Níveis hepáticos de gordura total (A), colesterol total (B) e triglicérides (C) da P21. C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 filhotes por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

A fim de determinar as possíveis vias metabólicas pelas quais o açaí poderia melhorar o acúmulo de gordura hepática, a expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico foi avaliada nos grupos HF e HFA (Figura 15). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de mRNA para *Sirt1*. Surpreendentemente, o grupo HFA mostrou um aumento na expressão relativa dos genes *Srebf1* (3-vezes, p <0,005) e *Fasn* (4-vezes, p <0,005) e redução na expressão de *Ucp2* (0,8-vezes, p <0,05) quando comparado ao grupo HF.

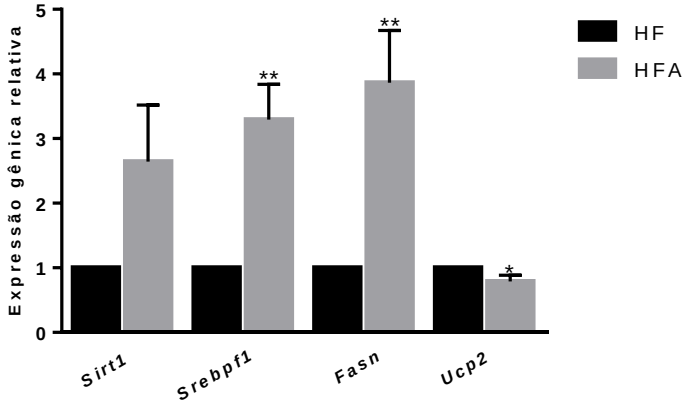


Figura 15: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado das ratas em relação à beta-2-microglobulina. HF: dieta hiperlipídica; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; Sirt1: sirtuin 1; Srebf1: fator de transcrição de ligação ao elemento regulador do esterol 1; Fasn: ácido graxo sintase; Ucp2: proteína desacopladora 2. Os resultados são apresentados como a média ± DP (n = 7 ratas por grupo). Análises pelo teste t de Student. * p <0,05; ** p <0,01

Com o objetivo de avaliar as potenciais vias moleculares envolvidas no metabolismo lipídico e afetadas por uma dieta materna suplementada com açaí durante o processo de gestação e lactação, a expressão gênica foi avaliada nos filhotes P1 e P21, (Figura 16A e 16B,

respectivamente). Uma redução significativa na expressão gênica do fator de transcrição *Srebf1* (0,7-vezes, p <0,0001) foi observada no grupo HFA-P1, enquanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão dos genes *Sirt1*, *Fasn* e *Ucp2* (Figura 16A).

Da mesma forma, a expressão dos genes do metabolismo lipídico foi avaliada no fígado da P21 (Figura 16B). Expressão de *Sirt1* (0,5-vezes, p <0,0001), *Srebf1* (4-vezes, p <0,005) e *Fasn* (5-vezes, p <0,005) aumentou no fígado dos filhotes HFA-P21 quando comparados com os filhotes HF-P21.

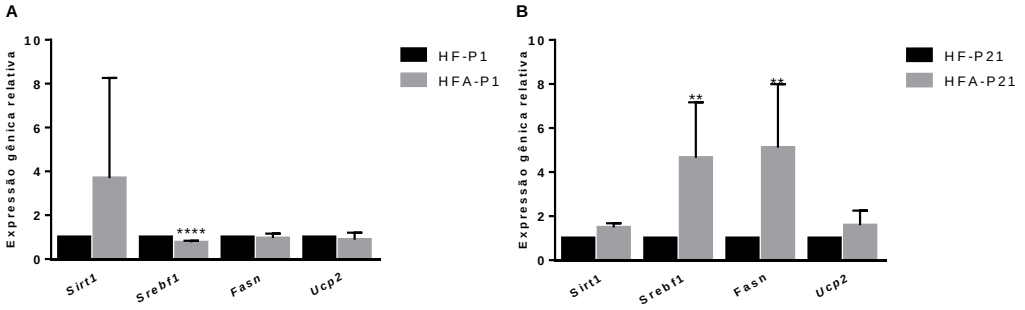


Figura 16: Expressão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado da prole P1 (A) e da prole P21 (B) em relação à beta-2-microglobulina. HF-P1: prole pós-parto proveniente de dieta hiperlipídica; HFA-P1: prole pós-parto proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica; HFA-P1: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; *Sirt1*: sirtuin 1; *Srebf1*: fator de transcrição de ligação do elemento regulador do esterol; *Fasn*: ácido graxo sintase; *Ucp2*: proteína desacopladora 2. Os resultados são apresentados como média ± DP (n = 7 filhotes por grupo). Análises pelo teste t de Student. * p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,001

A análise de Western blot não mostrou diferenças significativas nos níveis de proteína SIRT1 (Figura 17A). Embora a expressão gênica tenha mostrado um aumento de Srebpf1 no fígado das ratas alimentadas com dieta HFA, o nível de proteína não apresentou significância em comparação com os níveis no grupo alimentado com HF (Figura 17B).

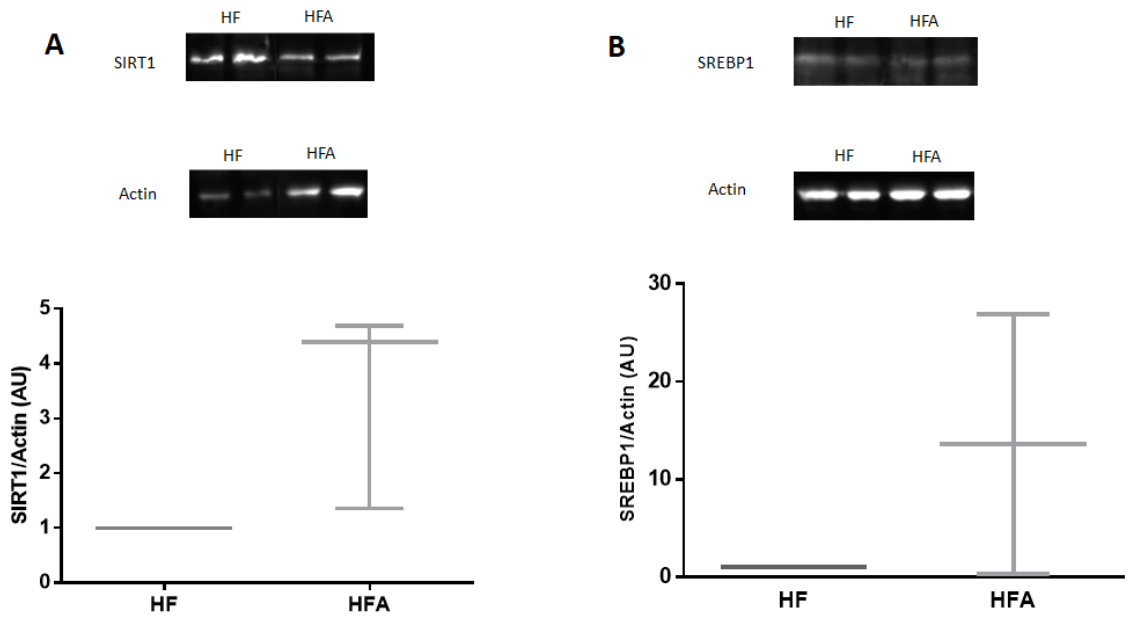


Figura 17: Western blotting para SIRT1 (A) e SREBP1 (B) das ratas. Os gráficos representam dados da quantificação da intensidade da banda para as proteínas SIRT1 e SREBP1 em relação à proteína de controle actina. HF: dieta hiperlipídica; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os dados são apresentados como mediana e valor mínimo e máximo, (n = 7 ratas por grupo). O valor de p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo para o Kruskal-Wallis.

A expressão das proteínas SIRT1 e SREBP1 foi analisada na prole P1 (Figura 18A e 18B) e P21 (Figura 18C e 18D) das dietas maternas HF e HFA. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Da mesma forma como foi visto na prole, a superexpressão de *Sirt1* e *Srebf1* não mostrou aumento na expressão das respectivas proteínas

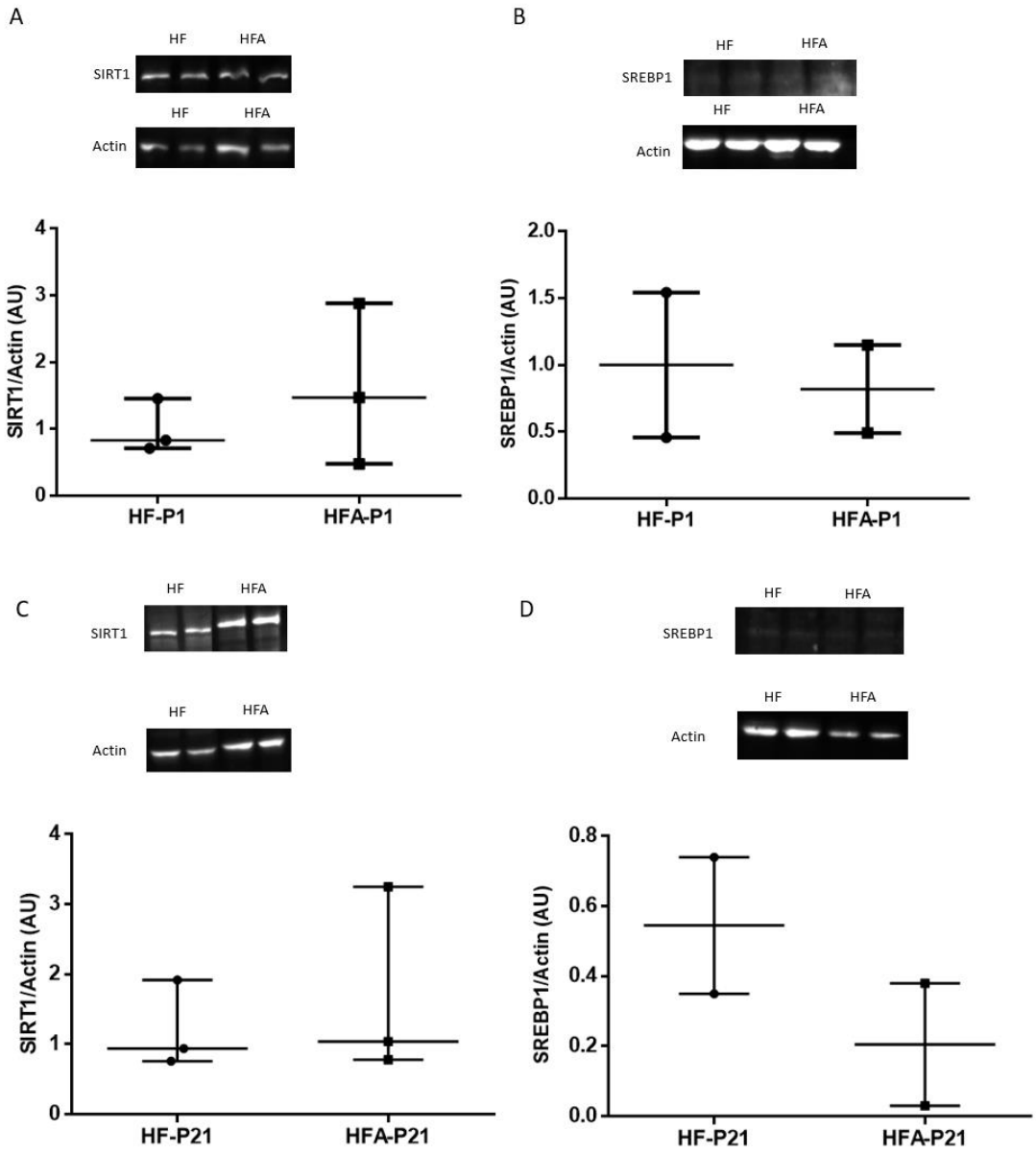


Figura 18: Western blotting para SIRT1 e SREBP1 para a prole P1 (A e B) e P21 (C e D). Os gráficos representam dados da quantificação da intensidade da banda para as proteínas SIRT1 e SREBP1 em relação a proteína de controle actina. HF: dieta hiperlipídica; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os dados são apresentados como mediana e valor mínimo e máximo, (n = 7 filhotes por grupo). O valor de p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo para o Kruskal-Wallis.

6.4. Metabolismo redox

Sabendo que o açaí é uma fruta com alto teor de antioxidantes que pode exercer um efeito sobre a neutralização de ERO, foram determinadas concentrações hepáticas de biomarcadores do estrese oxidativo, MDA como marcador de dano lipídico e proteína carbonilada como marcador de dano proteico (Figura 19A e 19B). Os dados apresentados mostram que houve maior dano lipídico no grupo de ratas HF em comparação com os demais grupos (138%, p<0,005 versus C; 253%, p<0,001 versus CA; 52%, p<0,01 versus HFA)

(Figura 19A). A suplementação com polpa de açaí foi capaz de proteger o grupo de ratas que recebeu dieta HF reduzindo os níveis de oxidação lipídica e, consequentemente, o estresse oxidativo.

Em relação ao dano proteico, o grupo HF apresentou maiores níveis hepáticos de oxidação proteína quando comparado com o grupo C (41%, p<0,01), CA (34%, p<0,01) e HFA (30%, 0,05). Esse dado reforça o papel da suplementação com polpa de açaí em proteger o fígado das ratas conta o estresse oxidativo.

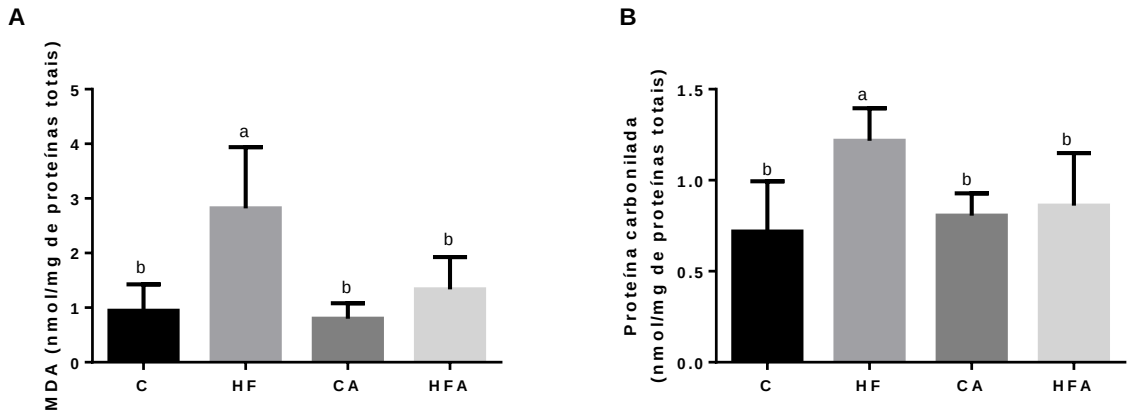


Figura 19: Níveis hepáticos de MDA (A) e proteína carbonilada (B) das ratas. MDA: dialdeído malônico; C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 ratas por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

De modo a avaliar o estresse oxidativo da prole recém-desmamada, também foram dosadas as concentrações de MDA e proteína carbonilada no fígado (Figura 20A e 20B). Não foi encontrado diferença significativa nos valores de ambos os marcadores de oxidação lipídica e proteica entre os grupos.

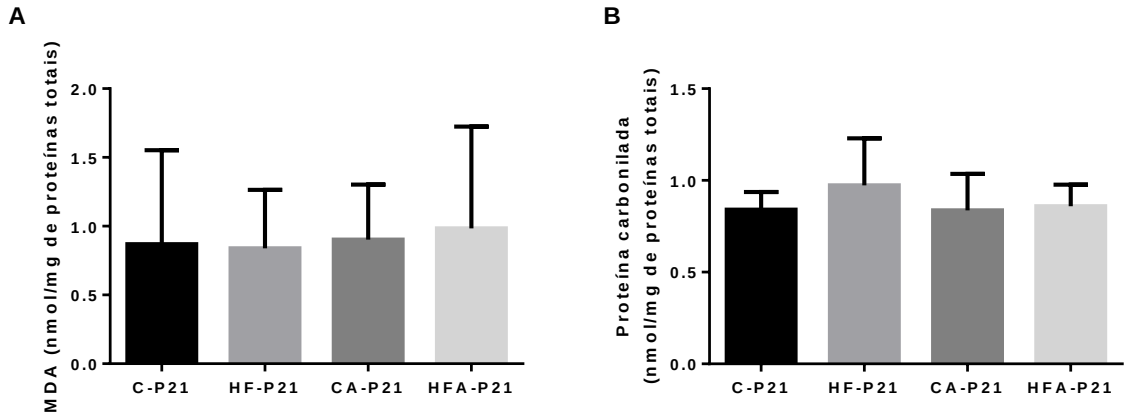


Figura 20: Níveis hepáticos de MDA (A) e proteína carbonilada (B) da P21. MDA: dialdeído malônico; C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 filhotes por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

As defesas antioxidantes enzimáticas do organismo desempenham um papel fundamental no controle do balanço oxidativo, mantendo a homeostase e garantindo a integridade de vários tecidos. A SOD age na primeira linha de defesa das ERO, realizando a conversação do ânion $O^{\cdot -}$ em H_2O_2, que posteriormente é neutralizado pelas enzimas GPx ou CAT.

Acreditando que os compostos bioativos do açaí podem atuar sobre o metabolismo redox, foi avaliada a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no fígado dos animais (Figura 21A, 21B e 21C, respectivamente). Pode-se observar um aumento da atividade da SOD nas ratas alimentadas com dieta HF e HFA em comparação com as ratas do grupo C (90%, p<0,001 versus HF; 57%, p<0,005 versus HFA) e CA (91%, p<0,001 versus HF; 57%, p<0,005 versus HFA). Entretanto, o grupo HFA apresentou uma redução de 18% em relação ao grupo HF (p<0,05). Em relação a GPx, foi encontrado um aumento na atividade dessa enzima nas ratas do grupo HF em comparação com os demais grupos C (31%, p<0,01), A (45%, p<0,001) e HFA (29%, p<0,01). A CAT também teve sua atividade alterada nos animais HF, apresentando aumento de 60% em comparação com C (p<0,001) e, 52% em comparação com o grupo CA (p<0,001). As ratas que receberam dieta HFA apresentaram aumento na atividade da CAT apenas em relação ao grupo C (39%, p<0,01), enquanto, foi observado uma diminuição de 30% em comparação com as ratas do grupo HF

(p<0,01). Os valores para atividade de CAT nas ratas do grupo HFA foram estatisticamente iguais aos valores das ratas do grupo recebendo apenas dieta A.

Tomados em conjunto, estes dados podem indicar uma ação direta do açaí sobre a neutralização de ERO, dessa forma, não seria necessário o aumento da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante para controlar a progressão do dano hepático provocado pelo estresse oxidativo em decorrência do excesso de lipídeos hepáticos.

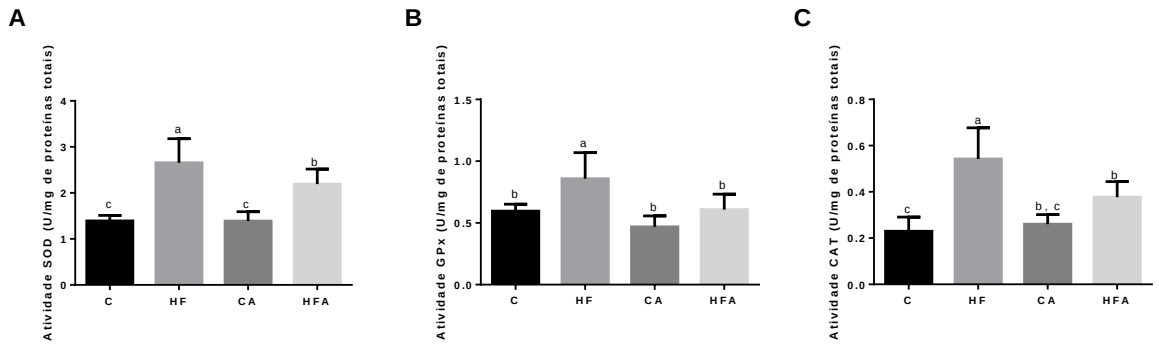


Figura 21: Atividade das enzimas SOD (A), GPx (B) e CAT (C) no fígado das ratas. SOD: superóxido dismutase; GPx: glutationa peroxidase; CAT: catalase; C: dieta controle baseada na dieta AIN-93G para ratas gestantes; HF: dieta hiperlipídica; CA: dieta controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 ratas por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

Com o intuito de verificar se a dieta materna hiperlipídica ou a suplementação com açaí é capaz de promover alterações metabólicas no sistema enzimático, também foi avaliada a atividade das enzimas SOD, GPx e CAT, no fígado da prole pós-desmame (Figura 22A, 22B e 22C). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as enzimas estudadas.

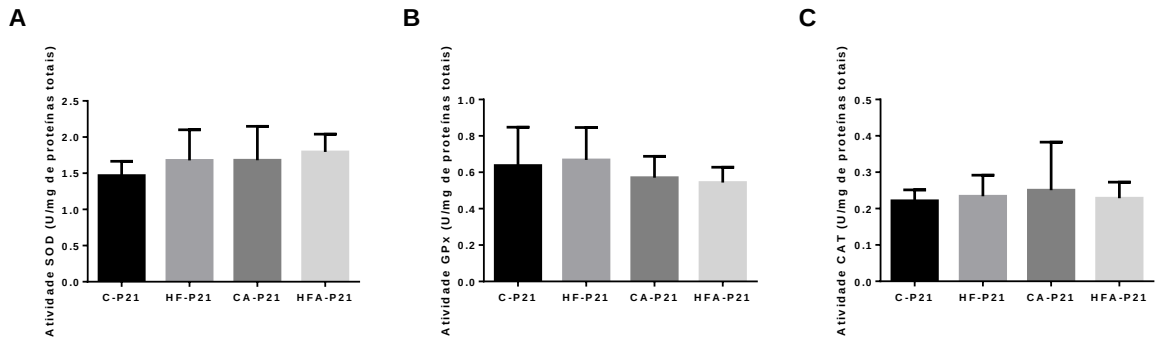


Figura 22: Atividade das enzimas SOD (A), GPx (B) e CAT (C) no fígado da P21. SOD: superóxido dismutase; GPx: glutationa peroxidase; CAT: catalase; C-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna hiperlipídica; CA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta materna controle suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HFA-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são mostrados como média ± DP (n= 7 filhotes por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística. Valor de p <0,05 foi considerado significativo para o teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

A fim de determinar se existe um mecanismo molecular envolvido na regulação da atividade das enzimas antioxidantes, decidiu-se avaliar a expressão das enzimas *Gpx1, Gpx4, Sod1* e *Sod2* no fígado das ratas alimentadas com dieta HF e HFA (Figura 23). Não foram observadas diferenças significativas em nenhum gene selecionado.

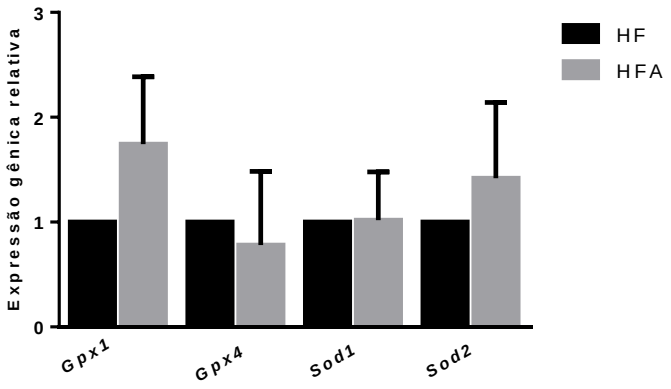


Figura 23: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo redox no fígado das ratas em relação à beta-2-microglobulina. *Gpx1:* glutationa peroxidase 1; *Gpx4:* glutationa peroxidase 4; *Sod1*: superóxido dismutase 1; *Sod2:* superóxido dismutase 2; HF: dieta hiperlipídica; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são apresentados como a média ± DP (n = 7 ratas por grupo). Análises pelo teste t de Student.

Também verificamos os níveis de mRNA dos genes do sistema de defesa antioxidante nas proles P1 e P21 (Figura 24A e 24B, respectivamente). Em relação aos dados da P1, não foram encontradas diferenças significativamente estatísticas em nenhum dos genes avaliados (Figura 24A). Os dados da P21 (Figura 24B), mostram um aumento na expressão dos genes

Gpx1 (5-vezes, p<0,0001), *Gpx4* (2-vezes, p=0,021) e *Sod1* (4,5-vezes, p=0,032). Nenhuma diferença significativa foi encontrada para *Sod2* (p=0,1564).

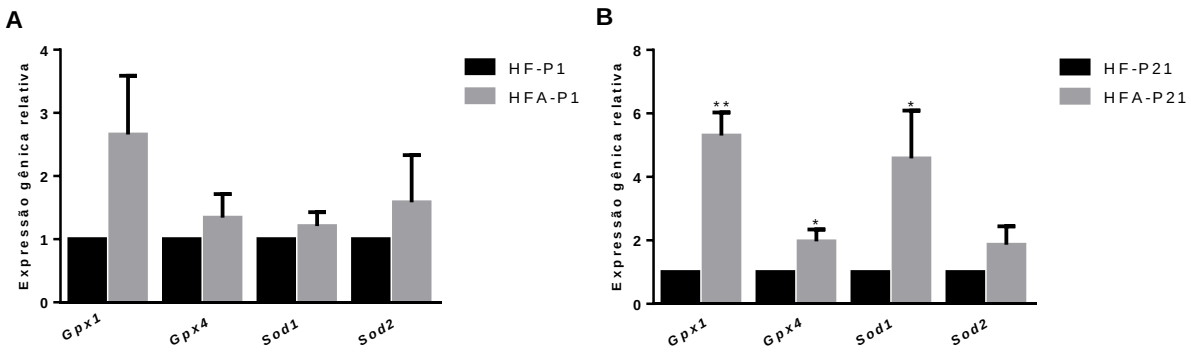


Figura 24: Expessão gênica relativa de mRNA para genes relacionados ao metabolismo redox no fígado da P1 (A) e P21 (B) em relação à beta-2-microglobulina. Gpx1: glutationa peroxidase 1; Gpx4: glutationa peroxidase 4; Sod1: superóxido dismutase 1; Sod2: superóxido dismutase 2; HF-P1: prole pós-parto proveniente de dieta hiperlipídica; HFA-P1: prole pós-parto proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí; HF-P21: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica; HFA-P1: prole pós-desmame proveniente de dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são apresentados como a média ± DP (n = 7 ratas por grupo). Análises pelo teste t de Student.

Com base na regulação pós-transcricional de SIRT3 sobre enzimas do sistema de defesa antioxidante, decidimos avaliar se a esta proteína estaria envolvida com a superexpressão das enzimas antioxidantes. Não foram encontradas diferenças significativamente estatísticas na exprssão gênica de Sirt3 no fígado das ratas e das proles P1 e P21 (Figura 25).

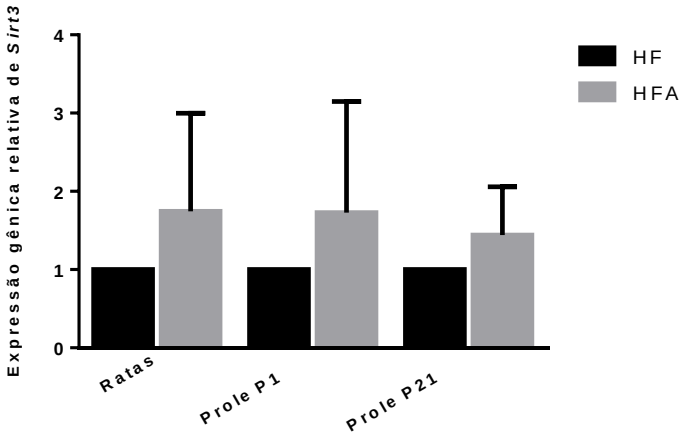


Figura 25: Expessão gênica relativa de mRNA de Sirt3 em relação à beta-2-microglobulina. Sirt3: sirtuina 3 HF: dieta hiperlipídica; HFA: dieta hiperlipídica suplementada com 2% (p/p) de polpa de açaí. Os resultados são apresentados como a média ± DP (n = 7 animais por grupo). Análises pelo teste t de Student.

7. Discussão

Primeiramente realizamos a caracterização físico-química, bem como a presença de polifenóis, antocianinas e a capacidade antioxidante da polpa de açaí comercial utilizada neste estudo. A polpa de açaí estudada possui as propriedades físicas, acidez titulável e pH, em conformidade com a legislação vigente (Instrução Normativa Nº 01, de 7 de janeiro de 2000, Brasil, 2000). A composição nutricional da polpa apresentou valores de 3,95 g de lipídeos, 0,89 g de proteínas, 2,31 g de carboidratos, 0,37 g de fibra solúvel, 1,9 g de fibra insolúvel e 0,4 g de cinzas em 100g de polpa de açaí, reafirmando os altos teores de lipídeos e fibras descritos em outros estudos (SCHAUSS et al., 2006b; GUERRA et al., 2015; BARBOSA et al., 2016).

O açaí apresenta uma coloração arroxeada, característica de frutas com altos teores de compostos fenólicos, principalmente da classe das antocianinas. Em relação as quantidades de polifenóis e antocianinas, os valores encontrados no nosso estudo foram 549,51 ± 60,97 mg de EAG/g de polpa de açaí e 6,47 ± 1,21 mg de antocianinas/g de polpa de açaí, respectivamente. Os valores de polifenóis são superiores aos encontrados no trabalho de Rufino e cols. (2010), que encontraram 4,53 mg EAG/g de polpa de açaí e 1,11 mg de antocianas/g de polpa de açaí.

Nós verificamos a atividade antioxidante da polpa de açaí através da captura do radical ABTS+ e da porcentagem de inibição do radical DPPH. Em relação à atividade antioxidante pelo método do radical ABTS+, a polpa utilizada no presente estudo apresentou valor de 9,4 µM de trolox/g de polpa de açaí, inferior ao encontrado na polpa de acerola (1,605 mM de trolox/g), de goiaba (0,198 mM de trolox/g), cajá (0,140 mM de trolox/g) e caju (0,212 mM de trolox/g) (Vieira et al., 2011). A principal vantagem do teste ABTS consiste na sua relativa simplicidade, porém divergências nos resultados podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação do radical ABTS+ com a amostra ou na estratégia de obtenção do cromóforo (Borges et al., 2011). Em relação ao radical DPPH, os valores encontrados na polpa de açaí utilizada no estudo foi 4458,34 g de polpa/g de DPPH.

Existem dois períodos de produção de açaí que se caracterizam por produzir frutos de diferentes qualidades. A estação chuvosa ocorre no primeiro semestre do ano, quando os cachos têm frutos de maturação não uniforme e com sabor diferente do normal. A época mais seca é aquela cuja produção gira em torno do segundo semestre e se caracteriza por

apresentar frutos com maturação uniforme e um sabor melhor. É quando a bebida se apresenta com melhor qualidade e rendimento (BICHARA, ROGEZ, 2011). Vale ressaltar que as épocas de colheita do fruto podem influenciar na composição centesimal e de compostos bioativos, bem como o estágio de maturação das frutas e a adição de água no processo de extração da polpa. Os compostos fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos, porém, outros compostos também podem estar presentes e contribuir para o potencial. Em posse desses dados, confirmamos o potencial antioxidante do açaí e sua composição dietética rica em lipídeos e fibras. Estes compostos podem atuar de forma sinérgica no metabolismo lipídico e oxidativo, promovendo uma melhora do desenvolvimento e progressão de doenças metabólicas, como a DHGNA.

No presente estudo, avaliamos o efeito da dieta materna hiperlipídica suplementada com 2% de polpa de açaí no desenvolvimento da DHGNA em ratas durante a gestação e a lactação. O efeito da intervenção foi estudado também em filhotes pós-natais (1 dia) e pós-desmame (21 dias de idade). Nossos resultados revelaram que nas ratas alimentadas com dieta HF, houve aumento do peso absoluto do fígado, da atividade das enzimas ALT e AST séricas, e do grau de esteatose hepática: mudanças consistentes com o desenvolvimento da DHGNA. A adição de açaí na dieta materna foi capaz de prevenir algumas características da DHGNA, incluindo o peso relativo do fígado e o grau de esteatose hepática, em concordância com estudos prévios realizados com dieta hiperlipidêmica e hipercolesterolêmica em ratos e camundongos suplementados com açaí (GUERRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Observamos que as ratas alimentadas com dieta HFA apresentaram um peso corporal ao final do experimento superior aos animais dos outros grupos. No estudo realizado por Guerra e cols (2015), os camundongos HF e HFA exibiram um aumento no peso corporal, mas o tratamento com extrato aquoso de açaí não alterou o peso corporal nos animais HFA. Acreditamos que o efeito do açaí sobre o tecido adiposo durante a gestação e lactação devem ser investigados.

Os efeitos da dieta materna sobre a prole mostram que a dieta HF suplementada ou não com polpa de açaí, foi capaz de aumentar o peso corporal, o peso absoluto e relativo dos filhotes P21. A introdução de açaí na dieta materna foi capaz de reduzir o peso relativo do fígado da P1 e P21, sugerindo que o consumo de açaí durante a gestação e lactação é capaz de modificar o metabolismo hepático da prole. A hepatomegalia se apresenta em torno de 75% dos pacientes com DHGNA, sendo uma característica marcante do processo de acúmulo

de lipídeos (EL-KADER, EL-DEN ASHMAWY, 2015). A redução no peso do órgão, pode ser considerada um efeito benéfico da adição da polpa de açaí na dieta HF. Este resultado foi confirmado pela histologia hepática, onde o grupo de filhotes HFA-P21 apresentou redução no grau de esteatose em comparação com o grupo HF-P21. Corroborando com nosso achado, um estudo avaliando o uso da terapia com resveratrol, mostrou que este polifenol foi eficiente na redução dos lipídeos hepáticos na prole proveniente de uma dieta materna HF durante a gestação e lactação (TIAO et al., 2018). Embora não tenha sido observada diferença entre o grau de esteatose entre o grupo C-P21 e HF-P21, nossos dados indicam que há um acúmulo moderado de lipídeos no grupo HF-P21. Este fenótipo pode variar dependendo do tempo de exposição de dieta, quanto mais cedo a iniciação da dieta, mais marcantes são as características que vão ser vistas na prole. Um estudo recente avaliando o efeito da obesidade materna sobre o desenvolvimento de desordens metabólicas na prole, mostraram que há um aumento no grau de esteatose, mas não há um desenvolvimento de EHNA, nos filhotes que começaram a receber uma dieta obesogênica logo após o desmame até a fase adulta (LOMAS-SORIA et al., 2018). Não foram encontradas diferenças entre os marcadores de dano hepático ALT e AST no grupo HF-P21 ou HFA-P21. Embora estas duas enzimas sejam usadas constantemente como marcador de esteatose hepática em situações clínicas, um estudo na prole ratas alimentados com uma dieta *junk food* mostraram que não houve diferença nos níveis séricos de ALT e AST, porém, a expressão do genes responsáveis pela transcrição dessas enzimas apresentou uma redução nos níveis hepáticos de mRNA (BAYOL et al., 2010). Isto sinaliza que alterações subjacentes relacionadas ao genoma e ao epigenoma, estejam modificadas nesses animais.

Realizamos a análise do perfil lipídico e hepático das ratas e observamos um aumento no colesterol sérico total do grupo HFA em comparação com os demais grupos. Através da análise do colesterol frações, pode-se notar que o aumento do colesterol total no grupo HFA estava relacionado com o aumento das frações HDL e não-HDL. Em relação a deposição de gordura no fígado, observamos um aumento na deposição de gordura total hepática, colesterol e triglicérides hepático nas ratas alimentadas com dieta HF. Entretanto, a adição de polpa de açaí neste tipo de dieta, foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de gordura hepática, colesterol e triglicérides. Estes dados reforçam o efeito hepatoprotetor do açaí sobre as ratas, promovendo melhora do acúmulo de lipídeos, corroborando com os dados da literatura (GUERRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Embora tenha sido visto um aumento da fração sérica não-HDL nas ratas alimentadas com dieta HFA, é possível que este

resultado seja em decorrência do aumento na síntese e secreção de VLDL, restaurando um sistema que é prejudicado em resposta ao excesso de lipídeos. A maioria dos estudos relatam efeitos do açaí devido ao seu conteúdo fenólico, mas há outros nutrientes presentes na polpa que também podem desempenhar um papel importante no metabolismo lipídico. A ingestão de ácidos graxos insaturados leva a níveis reduzidos de colesterol total e LDL na circulação, aumentando a expressão ou atividade do receptor de LDL no fígado (FERNANDEZ, WEST, 2005). As fibras dietéticas sequestram e promovem a excreção dos sais biliares e, em resposta, o fígado produz mais ácidos biliares e mais colesterol é retirado do sangue (BROWN et al., 1999), e os fitoesteróis têm similaridade com a estrutura química do colesterol e competem pela absorção intestinal (OSTLUND, 2002).

Em nosso estudo, o grupo HFA-P21 apresentou níveis séricos menores de colesterol total e da fração não-HDL em relação ao grupo HF-P21. É possível que o grau de dano causado pela dieta HF na prole seja menor do que nas ratas, portanto, a suplementação de açaí na dieta materna foi mais efetiva na atenuação dos efeitos da prole a nível plasmático. Além do mais, a menor acumulação de lipídeos hepáticos nas ratas HFA pode ter proporcionado uma melhora da homeostase no perfil lipídico das suas respectivas proles. De fato, um estudo recente avaliando a introdução de jussara (uma espécie diferente de açaí) em uma dieta materna enriquecida com gordura vegetal hidrogenada, relatou uma redução nos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos na prole que receberam suplementação com jussara na dieta materna hiperlipídica (ALMEIDA et al., 2014). Diferentemente do que foi encontrado nas ratas, o açaí não foi capaz de alterar o peso e/ou conteúdo de gordura no fígado no grupo HFA-P21.

Por sua participação no desenvolvimento e progressão da DHGNA, SIRT1 tem sido alvo de pesquisas que buscam regular sua expressão e atividade (BAI et al., 2018). O resveratrol é conhecido por induzir SIRT1, e esta por sua vez modifica a sinalização do AMPK, o que pode talvez contribuir para a modificação de vários outros fatores de transcrição e moléculas que estão envolvidas com a lipogênese e sinalização da insulina (PAN et al., 2014). Um estudo com ratas Wistar mostrou a ingestão materna de resveratrol durante a lactação aumenta os níveis de proteína em AMPK-fosforilada nos resíduos de tirosina 172, SIRT1 e NAMPT (nicotinamida fosforribosiltransferase) na prole de adultos machos (TANAKA et al., 2017). No presente trabalho, não foram observadas alterações na expressão de mRNA para *Sirt1* nas ratas HF e no grupo HF-P1 após a adição de açaí. No

entanto, o grupo HFA-P21 proveniente apresentou um aumento na expressão de *Sirt1*, embora não tenham sido notadas mudanças significativas nos níveis da proteína. O açaí é um alimento que apresenta alta concentração de compostos fenólicos, principalmente da classe das antocianidinas. Nós acreditávamos que talvez fosse possível haver uma regulação destes compostos na ativação de SIRT1 e subsequentemente, na melhora da DHGNA. Vale ressaltar que não utilizamos neste estudo isolados de compostos antioxidantes, mas a polpa de açaí como um alimento que apresenta em sua composição outros compostos dietéticos que podem afetar positivamente o metabolismo lipídico no fígado através da regulação de outras vias. A alta proporção de ácidos graxos insaturados (>70%) presentes na fração lipídica do açaí, pode promover uma melhora do metabolismo lipídico através de outros mecanismos, uma vez que ácidos graxos PUFA e MUFA têm demonstrado regular a expressão de genes *Srebf1* e lipogênicos, reduzindo o acúmulo hepático gordura na prole de camundongos (GREGORIO et al., 2010)

Em estudos com animais, a lipogênese pode ser aumentada durante o início da idade adulta, como resultado de uma dieta materna obesogênica (GREGORIO et al., 2010; KJAERGAARD et al., 2014; PRUIS et al., 2014; THORN et al., 2014). Estes vários estudos relataram aumento da expressão de *Srebp1c* e seus coativadores e alvos lipogênicos a jusante: PPARs, FASN, estearoil-CoA dessaturase-1 (SCD1) e ACC1 na prole exposta a uma dieta obesogênica no útero. Embora o SREBP1 contribua para o acúmulo de gordura no fígado em modelos animais, a deficiência de SREBP1 apenas melhora parcialmente a esteatose, o que reforça o envolvimento de outros fatores no desenvolvimento e progressão da DHGNA (ARAGNO et al., 2009; VALLIM, SALTER, 2010). Isto evidencia os eventos que abrangem a teoria dos múltiplos *"hits"*, onde o segundo *"hit"* desencadeia cascatas de sinalização que envolvem inflamação, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial, que contribuem para uma exacerbação dos danos causados ao fígado em virtude do excesso de ácidos graxos (SHIMANO, SATO, 2017).

As ratas HFA e a prole HFA-P21 apresentaram aumento no RNAm de *Srebf1* e *Fasn* comparado ao grupo HF e HF-P21, respectivamente. Embora os resultados mostrem níveis mais elevados de RNAm para *Srebf1* no grupo suplementado com polpa de açaí, parece haver regulação pós-traducional, uma vez que não foram observadas alterações na expressão da proteína SREBP1 nas ratas HFA e na prole HFA-P21. Tais dados refletem a complexidade da regulação do metabolismo lipídico pelos componentes da dieta. Como exemplo, um estudo

realizado em camundongos para investigar o efeito de diferentes frutas, incluindo açaí, sobre obesidade e distúrbios metabólicos, mostrou que os grupos de animais que receberam dieta hiperlipídica suplementada com açaí apresentaram maiores níveis de glicose e insulina em jejum comparados. para grupos que receberam outras frutas (HEYMAN et al., 2014). Além disso, animais alimentados com açaí mostraram maior regulação de genes associados à biossíntese de lipídios e colesterol, como *Cidea*, *Cidec* e *Anxa2* (HEYMAN-LINDEN et al., 2016). Em geral, os resultados mostraram uma exacerbação da doença hepática gordurosa pelo açaí. No entanto, é importante notar que a quantidade de açaí utilizada nesse estudo foi de 20%, diferente do nosso estudo que avaliou o efeito da suplementação com 2% de polpa de açaí. Além disso, em outro estudo, o açaí demonstrou ter efeitos benéficos sobre a concentração de colesterol aumentando sua eliminação pela bile via alteração da expressão gênica para os transportadores Abcg5 e Abcg8, bem como aumento do mRNA de *Srebf2* (DE SOUZA et al., 2012). Essa observação intrigante levanta outra questão sobre como o açaí é capaz de melhorar o acúmulo de gordura no fígado. O presente estudo não fornece dados para responder diretamente a esta questão, mas acreditamos que outras vias podem ser alteradas.

A fim de verificar outras vias que podem estar sendo reguladas pela adição de açaí, avaliamos os níveis hepáticos de mRNA da *Ucp*2. Uma redução na expressão de *Ucp2* no fígado de ratas alimentadas com dieta HFA em comparação com HF foi observada em nosso estudo. Em relação à prole, não foram observadas diferenças no fígado da HFA-P1, no entanto, o grupo HFA-P21 apresentou um aumento significativo em relação ao grupo HF-P21. A UCP2 é uma enzima expressa em vários tecidos, e sua participação em diferentes processos metabólicos, por exemplo na regulação da ingestão de alimentos, tem sido estudos UCP2 de participar de vários UCP2 pode ter diversas funções, como o controle do cálcio na mitocôndria, controle do estresse oxidativo, entre outros (DIANO, HORVATH, 2012). Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual a UCP2 modula esses processos, continua a ser debatido. A superexpressão de *Ucp2* sugere um aumento na oxidação beta de ácidos graxos em P21. De fato, um estudo que avaliou o efeito do extrato aquoso de açaí sobre a esteatose hepática em camundongos, mostrou um aumento na carnitina-palmitoil transferase (CPT-I), uma enzima chave na entrada de ácidos graxos na β-oxidação (GUERRA et al., 2015). Em adição, o papel das proteínas desacopladoras sobre o estresse oxidativo parece ser um mecanismo utilizado para aliviar o excesso de lipídeos, atuando contra a lipotoxicidade hepatocelular (BAFFY, 2005).

Foi observado em nosso estudo uma melhora do acúmulo de lipídeos nas ratas e na prole que receberam dieta materna hiperlipídica suplementada com açaí. Portanto, uma outra hipótese para esse resultado, considerou a presença de compostos bioativos no açaí sendo capaz de conferir efeito benéfico no acúmulo hepático de gordura através da redução do estresse oxidativo. O açaí é um fruto rico em polifenóis e antocianinas, e a regulação da produção de ERO poderia aliviar o acúmulo de gotículas de gordura no fígado, com melhora do conteúdo hepático de gordura e grau de esteatose. Sendo assim, avaliamos o efeito da suplementação de açaí na dieta materna em biomarcadores do estresse oxidativo, atividade e expressão de enzimas antioxidantes.

O estresse oxidativo promove um impacto deletério na lesão hepática com ativação do estresse oxidativo e de vias inflamatórias que intensificam a progressão da DHGNA a EHNA (YOUNOSSI et al., 2018). Controlar os danos causados por ERO no fígado parece ser uma abordagem eficaz no tratamento da DHGNA. De fato, estudos mostram que efeitos de componentes dietéticos antioxidantes, como a vitamina E, podem reduzir marcadores de estresse oxidativo, a ativação de células estreladas hepáticas e o desenvolvimento de fibrose em camundongos (NAN et al., 2009; PHUNG et al., 2009). O resveratrol é um forte candidato na prevenção e tratamento da DHGNA, com efeitos sobre estresse oxidativo (GOMEZ-ZORITA et al., 2012). A silibina também tem sido relatada com efeito na melhora da acumulação lipídica hepática através da diminuição do estresse oxidativo e melhora do dano hepático (CACCIAPUOTI et al., 2013). Embora a utilização de antioxidantes seja uma abordagem terapêutica interessante, poucos são os estudos que avaliam a combinação de uma dieta materna com antioxidantes, e nenhum sobre biomarcadores hepáticos na prole. O estudo de Sem & Simmons (2010), relataram uma melhora do estresse oxidativo no soro da prole através da suplementação antioxidante em combinação com uma dieta materna HF.

O MDA é um produto da peroxidação lipídica, que pode reagir com proteínas provocando modificações irreversíveis e com moléculas de DNA tornando-o altamente mutagênico (DEL RIO, STEWART, PELLEGRINI, 2005). No presente estudo foram observadas reduções nos níveis hepáticos de MDA nas ratas HFA, sugerindo que o açaí previne a oxidação lipídica. Jensen et al. (2008) observaram redução nos níveis séricos de TBARS após 2 horas de consumo de 120 mL de suco de açaí, reafirmando o efeito antioxidante do açaí sobre a peroxidação lipídica. Um estudo avaliando ratos diabéticos mostrou que a introdução de extrato de açaí também foi capaz de reduzir os níveis hepáticos

de TBARS (GUERRA et al., 2011). Outro biomarcador do estresse oxidativo inclui as proteínas, que podem ter grupos carbonila (C = O) adicionado a suas cadeias laterais de aminoácidos (DALLE-DONNE et al., 2006). No presente estudo, observamos uma redução significativa nos níveis hepáticos de proteína carbonilada no grupo de ratas alimentadas com dieta HFA em comparação com o grupo HF, com valores semelhantes aos encontrados para o grupo C e A. Não encontramos diferença entre a P21. Este dado enfatiza a importância da neutralização das ERO como forma de combater o dano oxidativo. Além disso, nossos resultados reforçam a hipótese que o aumento da peroxidação lipídica no grupo C pode ter ocorrido em virtude da composição lipídica da dieta.

Como forma de combater o dano causado pelo excesso ERO, o organismo conta com um sistema de defesa antioxidante, compostos por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende várias enzimas, mas no presente trabalho vamos focar em três enzimas que atuam de forma orquestrada para garantir a integridade dos tecidos: SOD, CAT e GPx. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem os antioxidantes exógeno, tais como polifenóis, ácido ascórbico, vitamina A, ácido alfa-lipóico, tiorredoxina, glutationa, melatonina, coenzima Q, beta-carotenóides, alfa-tocoferóis.

Em nosso estudo, observamos um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em ratas alimentadas com dieta HF, sugerindo uma adaptação do organismo como forma de garantir o combate dessas enzimas na neutralização do excesso de ERO. O grupo de ratas alimentadas com dieta HFA apresentaram uma redução na atividade dessas enzimas em comparação com o grupo HF. Estes dados sugerem que o açaí possa ter um efeito direto sobre o estresse oxidativo eliminando as ERO e evitando a necessidade de aumentar a atividade do sistema de defesa enzimático. Corroborando com essa hipótese, um estudo avaliando o efeito do consumo de chá verde durante a gestação e lactação, encontraram uma redução na atividade da CAT nas ratas e de SOD na prole (28 dias) (HACHUL et al., 2018). Assim como o açaí, o chá possui altos teores de compostos antioxidantes, com capacidade descrita na neutralização de ERO e produções de radiais mais estáveis. Da mesma forma, um estudo em ratos recebendo dieta hipercolesterolêmica mostrou que a adição de polpa de açaí reduziu a atividade de SOD em comparação com os animais que não receberam a suplementação (DE SOUZA et al., 2010).

Considerando o poder antioxidante do açaí, investigamos os efeitos da suplementação materna com o açaí sobre a expressão de diferentes isoformas das enzimas SOD (*Sod1* e

Sod2) e GPx (*Gpx1* e *Gpx4*). O controle do estresse oxidativo é um fator importante na progressão da DHGNA, pois parece haver um ciclo vicioso entre a capacidade oxidativa mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo, sendo considerada uma das bases para o desenvolvimento da esteato-hepatite. Um estudo realizado em ratas alimentadas com dieta materna HF, mostrou que a dieta materna é capaz de reduzir a capacidade de defesa antioxidante na prole, através da redução da expressão das enzimas GPx1 e SOD1 com importante participação no desencadeamento de doenças crônicas no fígado da prole, incluindo aumento da esteatose hepática (ZHANG et al., 2011). No presente estudo, encontramos um aumento significativo na expressão do mRNA de *Gpx1* e *Gpx4* no grupo HFA-P21 em comparação com o grupo HF-P21. Nossos dados sugerem que a adição de polpa de açaí na dieta materna possa envolver um mecanismo transgeracional indireto, promovendo melhora molecular no desenvolvimento de distúrbios metabólicos na prole antes do desenvolvimento de alterações bioquímicas.

SIRT3 pode estar relacionada com a ativação de enzimas do sistema de defesa antioxidante e pode ser um alvo de ativação de compostos fenólicos, em virtude disso, decidimos avaliar os efeitos do açaí sobre a expressão de *Sirt3* nos grupos de animais alimentados com dieta HF e HFA. Não observamos diferença significativa nas ratas, na P1 e P21. Os estudos avaliando a ativação de SIRT3 por componentes dietéticos envolvendo a alimentação materna ainda são escassos. Com o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a verificar a expressão de *Sirt3* por modificação de dieta materna suplementada com açaí.

É importante salientar que embora nosso estudo não tenha avaliado a produção de leite materno e os componentes dietéticos presentes no leite, não descartamos a hipótese de transferência de substâncias bioativas presentes no leite para a prole pós-desmame. Este fato poderia conferir uma proteção aos animais provenientes de dieta materna HFA, como observado através do aumento na expressão de enzimas *Gpx1* e *Gpx4* no grupo HFA-P21. De fato, estudos anteriores mostraram que compostos bioativos estão presentes no leite e contribuem para respostas metabólicas das crianças (NIKNIAZ et al., 2013; PONIEDZIALEK et al., 2018). Nós acreditamos que os polifenóis presentes no açaí poderiam mudar a composição do leite e sinalizar através do aleitamento materno, pelo menos em parte, o efeito protetor observado na prole. Entretanto, um estudo sobre a

composição do leite materno de ratas recebendo dieta suplementada com açaí pode ajudar a elucidar qual o papel, e o padrão, dos polifenóis presentes no leite.

A etiopatogênese da DHGNA na população pediátrica é provavelmente multifatorial, incluindo eventos adversos no útero, podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão dessa doença. Em virtude disso, vários estudos surgiram para entender como a dieta hiperlipídica materna é capaz de "programar" o fígado fetal e predispor o organismo a distúrbios metabólicos precoces. No entanto, estudos que relatam os efeitos da combinação de uma dieta rica em gordura e alimentos ou compostos bioativos para o desenvolvimento de NAFLD através de vias moleculares ainda são limitados.

Vale ressaltar que, no ambiente obesogênico materno, vários genes podem apresentar modificações epigenéticas que serão passadas a prole. Estudos epigenéticos são fundamentais em modelos de programação metabólica, uma vez que a epigenética tem papel fundamental no *imprinting* genômico, programação e reprogramação no início da vida e, consequentemente com o aumento na susceptibilidade às doenças na vida adulta. Várias são as marcas epigenéticas adquiridas durante o curso do desenvolvimento de uma célula ou de um embrião. Em se tratando de uma célula pluripotente, inicialmente várias vias estão disponíveis, no entanto, a escolha de uma rota de desenvolvimento pode ser influenciada pela exposição da mãe a um sinal ambiental, e é capaz de induzir uma mudança na trajetória do desenvolvimento da prole (HOCHBERG et al., 2011). Alguns mecanismos de controle de expressão de mRNA podem ocorrer via metilação de regiões promotoras e também pelo remodelamento das histonas (SUN, FAN, QIAO, 2015).

Nesse momento é importante lembrar que antes de apresentarem um mecanismo de desacetilação, as sirtuinas são histonas desacetilases, podendo exercer efeito sobre o empacotamento da cromatina. Em adição ao seu papel na modificação de proteínas não-histonas, as SIRT pertencem a classe das HDACs e possuem atividade sobre as histonas e remodelação da cromatina. Uma das histonas alvo da SIRT1 é a variante macroH2A1 que está envolvida no metabolismo hepático lipídico e pode ser encontrada no organismo em duas isoformas de processamento alternativo, macroH2A1.1 e macroH2A1.2 (RAPPA et al., 2013) (RAPPA et al., 2013). No estudo de Pazienza et al. (2014), a expressão aumentada de macroH2A1.1 foi capaz de reduzir a deposição de lipídeos em hepatócitos, melhorar o metabolismo de glicose e regular a expressão de genes lipogênicos. Este importante achado sugere que a regulação epigenética entre SIRT1/macroH2A1.1 possa exercer efeito sobre o

metabolismo lipídico e o desenvolvimento da DHGNA. SIRT1 também possui atividade deacetilase sobre H3K14 e H3K9 e estudos com dieta materna hiperlipídica mostraram uma diminuição na expressão de SIRT1 em fígados fetais concomitante a hiperacetilação da histona H3K14 (SUTER et al., 2012).

Mais estudos são necessários em humanos e modelos animais para melhor caracterizar o papel dos eventos antes do nascimento na programação da doença metabólica, bem como identificar possíveis intervenções terapêuticas. Melhorar as adaptações metabólicas maternas associadas à obesidade pré-gestacional, incluindo o acúmulo de lipídeos e o estresse oxidativo, pode ser um alvo terapêutico desejável durante a gravidez. No período pós-natal, são necessários métodos de triagem pediátrica aprimorados para melhor identificar as populações de risco e, em idade mais precoce, de modo que ações imediatas possam ser tomadas para minimizar a progressão da doença.

8. Conclusão

Podemos concluir que a ingestão de dieta hiperlipídica pelas ratas foi eficaz em desenvolver DHGNA. Além disso, o excesso de lipídeos durante o período de gestação e lactação parece promover alterações metabólicas na prole, predispondo os animais ao desenvolvimento de desordens precoces. Contudo, ainda é necessário estudos moleculares para melhor entendimento dessas desordens.

Os resultados mostraram ainda que a adição de açaí foi capaz de exercer um efeito benéfico sobre o metabolismo lipídico e oxidativo das mães, prevenindo o aumento de gordura hepática, os níveis hepáticos de colesterol total, o grau de esteatose, os níveis hepáticos de proteína carbonilada e malondialdeído. As melhoras observadas na prole foram discretas, sendo mais evidentes a nível plasmático.

9. Perspectivas

Os experimentos realizados nesta tese foram o primeiro passo para entender os efeitos do açaí sobre a programação metabólica da DHGNA em ratos. Contudo, nosso trabalho apresenta limitações, sendo necessário um maior esclarecimento sobre os mecanismos envolvidos na proteção do fígado contra o acúmulo de lipídeos nas ratas e na prole. Dentre as nossas principais limitações, torna-se especialmente importante a compreensão do mecanismo de regulação pós-traducional envolvendo SIRT1 e SREBP1.

A DHGNA é uma doença complexa que envolve, além do metabolismo lipídico, alterações na cascata de insulina, que não foram avaliadas neste estudo. Além disso, estudos epigenéticos tornam-se importantes em modelos de programação metabólica, já que modificações pós-tradução em mRNA como repressão ou degradação ocorrem via microRNAs. Além disso, o aumento ou redução da metilação em regiões promotoras de genes também estão relacionadas com expressão de mRNAs.

O microbioma disbiótico também tem sido relatado como possível desencadeador de alterações metabólicas. Diferentes dietas maternas podem influenciar a composição da microbiota intestinal na prole através da transferência da microbiota intestinal materna; por sua vez, essas alterações podem persistir até a idade adulta e exercer efeitos a longo prazo na saúde metabólica e desenvolvimento de doenças.

O acompanhamento da prole até a vida adulta é uma ferramenta fundamental para entender melhor os desdobramentos de alterações metabólicas induzidas por uma dieta materna hiperlipídica ao longo da vida. Esta é uma das limitações do nosso estudo, entretanto, os dados apresentados neste trabalho são de suma importância para começar a entender os efeitos transgeracionais da adição de compostos bioativos e alimentos durante períodos críticos do desenvolvimento.

10. Referências

AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology, Academic Press. **105:** 121-126.

AHMED, M. H.; BYRNE, C. D. (2007). "Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." Drug Discov Today **12**(17-18): 740-747.

AHN, B. H.; KIM, H. S.; SONG, S.; LEE, I. H.; LIU, J.; VASSILOPOULOS, A.; DENG, C. X.; FINKEL, T. (2008). "A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14447-14452.

ALBERDI, G.; RODRIGUEZ, V. M.; MACARULLA, M. T.; MIRANDA, J.; CHURRUCA, I.; PORTILLO, M. P. (2013). "Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet." Nutrition **29**(3): 562-567.

ALMEIDA, C. M.; OYAMA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. L.; CARVALHO, M. G.; DE ROSSO, V. V.; SOUSA, L. M. A.; DO NASCIMENTO, C. M.; PISANI, L. P. (2014). "Jussara (Euterpe edulis Mart.) supplementation during pregnancy and lactation modulates the gene and protein expression of inflammation biomarkers induced by trans-fatty acids in the colon of offspring." Mediators Inflamm **2014**: 987927.

ANDERSON, E. L.; HOWE, L. D.; JONES, H. E.; HIGGINS, J. P.; LAWLOR, D. A.; FRASER, A. (2015). "The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **10**(10): e0140908.

ARAGNO, M.; TOMASINELLI, C. E.; VERCELLINATTO, I.; CATALANO, M. G.; COLLINO, M.; FANTOZZI, R.; DANNI, O.; BOCCUZZI, G. (2009). "SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats." Free Radic Biol Med **47**(7): 1067-1074.

BAFFY, G. (2005). "Uncoupling protein-2 and non-alcoholic fatty liver disease." Front Biosci **10**: 2082-2096.

BAHCECIOGLU, I. H.; KUZU, N.; METIN, K.; OZERCAN, I. H.; USTUNDAG, B.; SAHIN, K.; KUCUK, O. (2010). "Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet." Vet Med Int **2010**.

BAI, X.; YAO, L.; MA, X.; XU, X. (2018). "Small Molecules as SIRT Modulators." Mini Rev Med Chem **18**(13): 1151-1157.

BAO, J.; SCOTT, I.; LU, Z.; PANG, L.; DIMOND, C. C.; GIUS, D.; SACK, M. N. (2010). "SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity." Free Radic Biol Med **49**(7): 1230-1237.

BARBOSA, P. O.; PALA, D.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; DO AMARAL, J. F.; VIEIRA, R. A.; FOLLY, G. A.; VOLP, A. C.; DE FREITAS, R. N. (2016). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women." Nutrition **32**(6): 674-680.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." Lancet **1**(8489): 1077-1081.

BARTLETT, K.; EATON, S. (2004). "Mitochondrial beta-oxidation." Eur J Biochem **271**(3): 462-469.

BAUSE, A. S.; HAIGIS, M. C. (2013). "SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress." Exp Gerontol **48**(7): 634-639.

BAYELE, H. K.; DEBNAM, E. S.; SRAI, K. S. (2016). "Nrf2 transcriptional derepression from Keap1 by dietary polyphenols." Biochem Biophys Res Commun **469**(3): 521-528.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; FOWKES, R. C.; STICKLAND, N. C. (2010). "A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring." Endocrinology **151**(4): 1451-1461.

BEGRICHE, K.; MASSART, J.; ROBIN, M. A.; BONNET, F.; FROMENTY, B. (2013). "Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **58**(4): 1497-1507.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. (2011). Açai (Euterpe oleracea Martius). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. E. M. Yahia, Woodhead Publishing**:** 1-27e.

BLASIOLE, D. A.; DAVIS, R. A.; ATTIE, A. D. (2007). "The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion." Mol Biosyst **3**(9): 608-619.

BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. (2000). "Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (Euterpe oleracea) Mart %J Food Science and Technology." Ciênc Tecnol Aliment **20**(3): 388-390.

BOLAND, M. L.; OLDHAM, S.; BOLAND, B. B.; WILL, S.; LAPOINTE, J. M.; GUIONAUD, S.; RHODES, C. J.; TREVASKIS, J. L. (2018). "Nonalcoholic steatohepatitis severity is defined by a failure in compensatory antioxidant capacity in the setting of mitochondrial dysfunction." World J Gastroenterol **24**(16): 1748-1765.

BONOMO, L. F.; SILVA, D. N.; BOASQUIVIS, P. F.; PAIVA, F. A.; GUERRA, J. F.; MARTINS, T. A.; DE JESUS TORRES, A. G.; DE PAULA, I. T.; CANESCHI, W. L.; JACOLOT, P.; GROSSIN, N.; TESSIER, F. J.; BOULANGER, E.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; OLIVEIRA RDE, P. (2014). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) modulates oxidative stress resistance in Caenorhabditis elegans by direct and indirect mechanisms." PLoS One **9**(3): e89933.

BORNIQUEL, S.; PELÁEZ, S. L.; MONSALVE, M.; VALLE, I. (2007). "Mitochondrial dysfunction in human pathologies." Frontiers in Bioscience **1153**: 1131-1153.

BRADFORD, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

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

BRASIL (2016). Censo Agropecuário. IBGE. Rio de Janeiro.

BROWN, L.; ROSNER, B.; WILLETT, W. W.; SACKS, F. M. (1999). "Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis." Am J Clin Nutr **69**(1): 30-42.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. (1997). "The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor." Cell **89**(3): 331-340.

BRUCE, K. D.; CAGAMPANG, F. R.; ARGENTON, M.; ZHANG, J.; ETHIRAJAN, P. L.; BURDGE, G. C.; BATEMAN, A. C.; CLOUGH, G. F.; POSTON, L.; HANSON, M. A.; MCCONNELL, J. M.; BYRNE, C. D. (2009). "Maternal high-fat feeding primes

steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression." Hepatology **50**(6): 1796-1808.

BRUNT, E. M. (2010). "Pathology of nonalcoholic fatty liver disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(4): 195-203.

BRUNT, E. M. (2016). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pros and Cons of Histologic Systems of Evaluation." Int J Mol Sci **17**(1).

BURGUENO, A. L.; CABRERIZO, R.; GONZALES MANSILLA, N.; SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. (2013). "Maternal high-fat intake during pregnancy programs metabolic-syndrome-related phenotypes through liver mitochondrial DNA copy number and transcriptional activity of liver PPARGC1A." J Nutr Biochem **24**(1): 6-13.

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

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. (2015). "NAFLD: a multisystem disease." J Hepatol **62**(1 Suppl): S47-64.

CACCIAPUOTI, F.; SCOGNAMIGLIO, A.; PALUMBO, R.; FORTE, R.; CACCIAPUOTI, F. (2013). "Silymarin in non alcoholic fatty liver disease." World J Hepatol **5**(3): 109-113.

CAPRA, L.; TEZZA, G.; MAZZEI, F.; BONER, A. L. (2013). "The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation." Ital J Pediatr **39**: 7.

CARDOZO, L. F.; PEDRUZZI, L. M.; STENVINKEL, P.; STOCKLER-PINTO, M. B.; DALEPRANE, J. B.; LEITE, M., JR.; MAFRA, D. (2013). "Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2." Biochimie **95**(8): 1525-1533.

CARVALHO, C. J. R.; ROMBOLD, J.; NEPSTAD, D. C.; SÁ, T. D. A. (1998). "Relações Hídricas Do Açaízeiro Em Mata De Várzea Do Estuário Do Amazonas." Rev Bras Fisiol Veg **10**: 213-218.

CHEN, L. W.; ARIS, I. M.; BERNARD, J. Y.; TINT, M. T.; COLEGA, M.; GLUCKMAN, P. D.; TAN, K. H.; SHEK, L. P.; CHONG, Y. S.; YAP, F.; GODFREY, K. M.; VAN DAM, R. M.; CHONG, M. F.; LEE, Y. S. (2017). "Associations of maternal macronutrient intake during pregnancy with infant BMI peak characteristics and childhood BMI." Am J Clin Nutr **105**(3): 705-713.

CHIN, Y. W.; CHAI, H. B.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. (2008). "Lignans and other constituents of the fruits of Euterpe oleracea (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities." J Agric Food Chem **56**(17): 7759-7764.

CIMEN, H.; HAN, M. J.; YANG, Y.; TONG, Q.; KOC, H.; KOC, E. C. (2010). "Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria." Biochemistry **49**(2): 304-311.

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

CUMMINGS, J. H.; STEPHEN, A. M. (2007). "Carbohydrate terminology and classification." Eur J Clin Nutr **61 Suppl 1**: S5-18.

CUSI, K. (2012). "Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications." Gastroenterology **142**(4): 711-725 e716.

DA SILVA SANTOS, V.; BISEN-HERSH, E.; YU, Y.; CABRAL, I. S.; NARDINI, V.; CULBRETH, M.; TEIXEIRA DA ROCHA, J. B.; BARBOSA, F., JR.; ASCHNER, M. (2014). "Anthocyanin-rich acai (Euterpe oleracea Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures." J Toxicol Environ Health A **77**(7): 390-404.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. (2006). "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression." J Cell Mol Med **10**(2): 389-406.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. (1998). "Steatohepatitis: A tale of two "hits"?" Gastroenterology **114**(4): 842-845.

DE MOURA, R. S.; PIRES, K. M.; SANTOS FERREIRA, T.; LOPES, A. A.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; SOUSA, P. J.; DA SILVA, A. J.; PORTO, L. C.; VALENCA, S. S. (2011). "Addition of acai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice." Food Chem Toxicol **49**(4): 855-863.

DE OLIVEIRA, P. R.; DA COSTA, C. A.; DE BEM, G. F.; DE CAVALHO, L. C.; DE SOUZA, M. A.; DE LEMOS NETO, M.; DA CUNHA SOUSA, P. J.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. (2010). "Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet." J Cardiovasc Pharmacol **56**(6): 619-626.

DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA RDE, P.; PEDROSA, M. L. (2010). "Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats." Nutrition **26**(7-8): 804-810.

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

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. (2004). "Phytochemical composition and pigment stability of Acai (Euterpe oleracea Mart.)." J Agric Food Chem **52**(6): 1539-1545.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. (2006). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells." J Agric Food Chem **54**(4): 1222-1229.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress." Nutr Metab Cardiovasc Dis **15**(4): 316-328.

DIANO, S.; HORVATH, T. L. (2012). "Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism." Trends Mol Med **18**(1): 52-58.

DIEHL, A. M. (2004). "Fatty liver, hypertension, and the metabolic syndrome." Gut **53**(7): 923.

DING, R. B.; BAO, J.; DENG, C. X. (2017). "Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases." Int J Biol Sci **13**(7): 852-867.

DODD, J. M.; BRILEY, A. L. (2017). "Managing obesity in pregnancy - An obstetric and midwifery perspective." Midwifery **49**: 7-12.

EATON, S.; BARTLETT, K.; POURFARZAM, M. (1996). "Mammalian mitochondrial beta-oxidation." Biochem J **320 (Pt 2)**: 345-357.

EBERLE, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-848.

EL-KADER, S. M. A.; EL-DEN ASHMAWY, E. M. (2015). "Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management." World J Hepatol **7**(6): 846-858.

ESCANDE, C.; CHINI, C. C.; NIN, V.; DYKHOUSE, K. M.; NOVAK, C. M.; LEVINE, J.; VAN DEURSEN, J.; GORES, G. J.; CHEN, J.; LOU, Z.; CHINI, E. N. (2010). "Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice." J Clin Invest **120**(2): 545-558.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-421.

FEIO, C. A.; IZAR, M. C.; IHARA, S. S.; KASMAS, S. H.; MARTINS, C. M.; FEIO, M. N.; MAUES, L. A.; BORGES, N. C.; MORENO, R. A.; POVOA, R. M.; FONSECA, F. A. (2012). "Euterpe oleracea (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis." J Atheroscler Thromb **19**(3): 237-245.

FERNANDEZ, M. L.; WEST, K. L. (2005). "Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids." J Nutr **135**(9): 2075-2078.

FINKEL, T.; DENG, C. X.; MOSTOSLAVSKY, R. (2009). "Recent progress in the biology and physiology of sirtuins." Nature **460**(7255): 587-591.

FINLEY, L. W.; HAAS, W.; DESQUIRET-DUMAS, V.; WALLACE, D. C.; PROCACCIO, V.; GYGI, S. P.; HAIGIS, M. C. (2011). "Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity." PLoS One **6**(8): e23295.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; RIBEIRO, D. A.; BARBISAN, L. F. (2013). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis." Food Chem Toxicol **58**: 68-76.

FRIEDRICH, M.; PETZKE, K. J.; RAEDERSTORFF, D.; WOLFRAM, S.; KLAUS, S. (2012). "Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dietary lipids in mice fed a high-fat diet." Int J Obes (Lond) **36**(5): 735-743.

FRYE, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 793-798.

FUJINO, T.; KONDO, J.; ISHIKAWA, M.; MORIKAWA, K.; YAMAMOTO, T. T. (2001). "Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate." J Biol Chem **276**(14): 11420-11426.

FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M.; MORII, Y.; OHASHI, T.; FUJIWARA, Y.; SONOYAMA, K. (2000). "Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (Agaricus bisporus) fiber and sugar beet fiber." J Nutr **130**(9): 2151-2156.

GALE, A. M.; KAUR, R.; BAKER, W. L. (2014). "Hemodynamic and electrocardiographic effects of açaí berry in healthy volunteers: A randomized controlled trial." International Journal of Cardiology **174**(2): 421-423.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. (2017). "Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones." J Endocrinol **234**(1): R1-R21.

GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. (2005). "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products." J Agric Food Chem **53**(5): 1370-1373.

GHOLAM, P. M.; FLANCBAUM, L.; MACHAN, J. T.; CHARNEY, D. A.; KOTLER, D. P. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects." Am J Gastroenterol **102**(2): 399-408.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. (2001). "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy." **00**(1): F1.2.1-F1.2.13.

GLUCKMAN, P. D.; BUKLIJAS, T.; HANSON, M. A. (2016). The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept: Past, Present, and Future. The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease. C. S. Rosenfeld. Boston, Academic Press**:** 1-15.

GOMEZ-ZORITA, S.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M. T.; AGUIRRE, L.; HIJONA, E.; BUJANDA, L.; MILAGRO, F.; MARTINEZ, J. A.; PORTILLO, M. P. (2012). "Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress." Br J Nutr **107**(2): 202-210.

GOYAL, N. P.; SCHWIMMER, J. B. (2016). "The Progression and Natural History of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Clin Liver Dis **20**(2): 325-338.

GRATTAGLIANO, I.; DE BARI, O.; BERNARDO, T. C.; OLIVEIRA, P. J.; WANG, D. Q. H.; PORTINCASA, P. (2012). "Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease-from origin to propagation." Clin Biochem **45**(9): 610-618.

GREGORIO, B. M.; SOUZA-MELLO, V.; CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. (2010). "Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring." Am J Obstet Gynecol **203**(5): 495 e491-498.

GUERRA, J. F.; MAGALHAES, C. L.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. (2011). "Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats." J Clin Biochem Nutr **49**(3): 188-194.

GUERRA, J. F. C.; MACIEL, P. S.; ABREU, I. C. M. E.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; CARDOSO, L. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. (2015). "Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice." J Funct Foods **14**: 192-202.

HACHUL, A. C. L.; BOLDARINE, V. T.; NETO, N. I. P.; MORENO, M. F.; RIBEIRO, E. B.; CM, O. D. N.; OYAMA, L. M. (2018). "Maternal consumption of green tea extract during pregnancy and lactation alters offspring's metabolism in rats." PLoS One **13**(7): e0199969.

HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. (2012). "Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants." Molecules **17**(2): 2140-2160.

HAOHAO, Z.; GUIJUN, Q.; JUAN, Z.; WEN, K.; LULU, C. (2015). "Resveratrol improves high-fat diet induced insulin resistance by rebalancing subsarcolemmal mitochondrial oxidation and antioxidantion." J Physiol Biochem **71**(1): 121-131.

HEBERT, A. S.; DITTENHAFER-REED, K. E.; YU, W.; BAILEY, D. J.; SELEN, E. S.; BOERSMA, M. D.; CARSON, J. J.; TONELLI, M.; BALLOON, A. J.; HIGBEE, A. J.;

WESTPHALL, M. S.; PAGLIARINI, D. J.; PROLLA, T. A.; ASSADI-PORTER, F.; ROY, S.; DENU, J. M.; COON, J. J. (2013). "Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome." Mol Cell **49**(1): 186-199.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. (2011). "Açai (Euterpe oleracea Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims." Phytochem Lett **4**(1): 10-21.

HEYMAN-LINDEN, L.; SEKI, Y.; STORM, P.; JONES, H. A.; CHARRON, M. J.; BERGER, K.; HOLM, C. (2016). "Berry intake changes hepatic gene expression and DNA methylation patterns associated with high-fat diet." J Nutr Biochem **27**: 79-95.

HEYMAN, L.; AXLING, U.; BLANCO, N.; STERNER, O.; HOLM, C.; BERGER, K. (2014). "Evaluation of Beneficial Metabolic Effects of Berries in High-Fat Fed C57BL/6J Mice " J Nutr Metab **2014**: 12.

HIRSCHEY, M. D.; SHIMAZU, T.; GOETZMAN, E.; JING, E.; SCHWER, B.; LOMBARD, D. B.; GRUETER, C. A.; HARRIS, C.; BIDDINGER, S.; ILKAYEVA, O. R.; STEVENS, R. D.; LI, Y.; SAHA, A. K.; RUDERMAN, N. B.; BAIN, J. R.; NEWGARD, C. B.; FARESE, R. V., JR.; ALT, F. W.; KAHN, C. R.; VERDIN, E. (2010). "SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation." Nature **464**(7285): 121-125.

HIRSCHEY, M. D.; SHIMAZU, T.; HUANG, J. Y.; SCHWER, B.; VERDIN, E. (2011a). "SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **76**: 267-277.

HIRSCHEY, M. D.; SHIMAZU, T.; JING, E.; GRUETER, C. A.; COLLINS, A. M.; AOUIZERAT, B.; STANCAKOVA, A.; GOETZMAN, E.; LAM, M. M.; SCHWER, B.; STEVENS, R. D.; MUEHLBAUER, M. J.; KAKAR, S.; BASS, N. M.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; ALT, F. W.; NEWGARD, C. B.; FARESE, R. V., JR.; KAHN, C. R.; VERDIN, E. (2011b). "SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome." Mol Cell **44**(2): 177-190.

HOCHBERG, Z.; FEIL, R.; CONSTANCIA, M.; FRAGA, M.; JUNIEN, C.; CAREL, J. C.; BOILEAU, P.; LE BOUC, Y.; DEAL, C. L.; LILLYCROP, K.; SCHARFMANN, R.; SHEPPARD, A.; SKINNER, M.; SZYF, M.; WATERLAND, R. A.; WAXMAN, D. J.; WHITELAW, E.; ONG, K.; ALBERTSSON-WIKLAND, K. (2011). "Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming." Endocr Rev **32**(2): 159-224.

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

HOUTKOOPER, R. H.; CANTO, C.; WANDERS, R. J.; AUWERX, J. (2010). "The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways." Endocr Rev **31**(2): 194-223.

HUGHES, A. N.; OXFORD, J. T. (2014). "A lipid-rich gestational diet predisposes offspring to nonalcoholic fatty liver disease: a potential sequence of events." Hepat Med **6**: 15-23.

JENSEN, G. S.; AGER, D. M.; REDMAN, K. A.; MITZNER, M. A.; BENSON, K. F.; SCHAUSS, A. G. (2011). "Pain reduction and improvement in range of motion after daily consumption of an açai (Euterpe oleracea Mart.) pulp-fortified polyphenolic-rich fruit and berry juice blend." Journal of medicinal food **14**(7-8): 702-711.

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

KASPRZAK, M. M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. (2015). "Properties and applications of flavonoid metal complexes." RSC Advances **5**(57): 45853-45877.

KEMPER, J. K.; CHOI, S. E.; KIM, D. H. (2013). "Sirtuin 1 deacetylase: a key regulator of hepatic lipid metabolism." Vitam Horm **91**: 385-404.

KJAERGAARD, M.; NILSSON, C.; ROSENDAL, A.; NIELSEN, M. O.; RAUN, K. (2014). "Maternal chocolate and sucrose soft drink intake induces hepatic steatosis in rat offspring associated with altered lipid gene expression profile." Acta Physiol (Oxf) **210**(1): 142-153.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J. (2005). "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **41**(6): 1313-1321.

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; WISELY, G. B.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4318-4323.

KOH, A.; DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BACKHED, F. (2016). "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." Cell **165**(6): 1332-1345.

KOHJIMA, M.; ENJOJI, M.; HIGUCHI, N.; KATO, M.; KOTOH, K.; YOSHIMOTO, T.; FUJINO, T.; YADA, M.; YADA, R.; HARADA, N.; TAKAYANAGI, R.; NAKAMUTA, M. (2007). "Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." Int J Mol Med **20**(3): 351-358.

KRISHAN, S. (2016). "Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dyslipidemia in type 2 diabetes." Diabetes Metab Syndr **10**(2 Suppl 1): S77-81.

KUSHNAREVA, Y.; MURPHY, A. N.; ANDREYEV, A. (2002). "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state." Biochem J **368**(Pt 2): 545-553.

LAAKSONEN, D. E.; NYYSSONEN, K.; NISKANEN, L.; RISSANEN, T. H.; SALONEN, J. T. (2005). "Prediction of cardiovascular mortality in middle-aged men by dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids." Arch Intern Med **165**(2): 193-199.

LASLO, M.; SUN, X.; HSIAO, C. T.; WU, W. W.; SHEN, R. F.; ZOU, S. (2013). "A botanical containing freeze dried acai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies." Age (Dordr) **35**(4): 1117-1132.

LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. (2013). "Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease." Prog Lipid Res **52**(1): 165-174.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-478.

LI, M.; GUO, K.; VANELLA, L.; TAKETANI, S.; ADACHI, Y.; IKEHARA, S. (2015). "Stem cell transplantation upregulates Sirt1 and antioxidant expression, ameliorating fatty liver in type 2 diabetic mice." Int J Biol Sci **11**(4): 472-481.

LI, M.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. (2011). "Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models." Exp Diabetes Res **2011**: 592408.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. (2005). "Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Acai) fruits." Int J Food Sci Nutr **56**(1): 53-64.

LOMAS-SORIA, C.; REYES-CASTRO, L. A.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L.; IBANEZ, C. A.; BAUTISTA, C. J.; COX, L. A.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. (2018). "Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring." J Physiol **596**(19): 4611-4628.

LOMBARD, D. B.; ALT, F. W.; CHENG, H. L.; BUNKENBORG, J.; STREEPER, R. S.; MOSTOSLAVSKY, R.; KIM, J.; YANCOPOULOS, G.; VALENZUELA, D.; MURPHY, A.; YANG, Y.; CHEN, Y.; HIRSCHEY, M. D.; BRONSON, R. T.; HAIGIS, M.; GUARENTE, L. P.; FARESE, R. V., JR.; WEISSMAN, S.; VERDIN, E.; SCHWER, B. (2007). "Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation." Mol Cell Biol **27**(24): 8807-8814.

LÓPEZ-BELTRÁN, C. (2007). The medical origins of heredity. Heredity Produced. At the Crossroads of Biology, Politics, and Culture, 1500-1870. S. Müller-Wille and H. J. Rheinberger. Cambridge, MA and London, Massachusetts Institute of Technology Press**:** 105-132.

LUCAS, A. (1991). "Programming by early nutrition in man." Ciba Found Symp **156**: 38-50; discussion 50-35.

LUNN, J.; THEOBALD, H. E. (2006). "The health effects of dietary unsaturated fatty acids." Nutr Bull **31**(3): 178-224.

MA, J.; ZHOU, Q.; LI, H. (2017). "Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy." Nutrients **9**(10).

MACHADO, A. K.; ANDREAZZA, A. C.; DA SILVA, T. M.; BOLIGON, A. A.; DO NASCIMENTO, V.; SCOLA, G.; DUONG, A.; CADONA, F. C.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B. (2016). "Neuroprotective Effects of Acai (Euterpe oleracea Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure." Oxid Med Cell Longev **2016**: 8940850.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. (1998). "Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide." Indian J Biochem Biophys **35**(3): 184-188.

MADSEN, L.; PETERSEN, R. K.; KRISTIANSEN, K. (2005). "Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids." Biochim Biophys Acta **1740**(2): 266-286.

MARZUILLO, P.; DEL GIUDICE, E. M.; SANTORO, N. (2014). "Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: New insights and future directions." World J Hepatol **6**(4): 217-225.

MCCARTHY, E. M.; RINELLA, M. E. (2012). "The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease." J Acad Nutr Diet **112**(3): 401-409.

MCCURDY, C. E.; BISHOP, J. M.; WILLIAMS, S. M.; GRAYSON, B. E.; SMITH, M. S.; FRIEDMAN, J. E.; GROVE, K. L. (2009). "Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates." J Clin Invest **119**(2): 323-335.

MCGILLICK, E. V.; LOCK, M. C.; ORGEIG, S.; MORRISON, J. L. (2017). "Maternal obesity mediated predisposition to respiratory complications at birth and in later life: understanding the implications of the obesogenic intrauterine environment." Paediatr Respir Rev **21**: 11-18.

MENEZES, F. S.; FALCÃO, D. Q.; DE MENDOÇA FILHO, R. F. W.; SILVEIRA, C. S.; RENNÓ, M. N.; RODRIGUES, V. P.; MINTO, A. B. M.; MOREIRA, D. L.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; KAPLAN, M. A. C. (2005). Chemical and Pharmacological Survey on Brazilian Medicinal Plants Using Ethnopharmacological Information as a Tool. III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants, International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

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

MICHISHITA, E.; PARK, J. Y.; BURNESKIS, J. M.; BARRETT, J. C.; HORIKAWA, I. (2005). "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins." Mol Biol Cell **16**(10): 4623-4635.

MOON, Y. A.; LIANG, G.; XIE, X.; FRANK-KAMENETSKY, M.; FITZGERALD, K.; KOTELIANSKY, V.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; HORTON, J. D. (2012). "The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals." Cell Metab **15**(2): 240-246.

MOURA, R. S.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; PIRES, K. M.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; SOUZA, P. J.; SILVA, A. J.; BORGES, R. M.; PORTO, L. C.; VALENCA, S. S. (2012). "Effects of Euterpe oleracea Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse." Phytomedicine **19**(3-4): 262-269.

NAN, Y. M.; WU, W. J.; FU, N.; LIANG, B. L.; WANG, R. Q.; LI, L. X.; ZHAO, S. X.; ZHAO, J. M.; YU, J. (2009). "Antioxidants vitamin E and 1-aminobenzotriazole prevent experimental non-alcoholic steatohepatitis in mice." Scand J Gastroenterol **44**(9): 1121-1131.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (2011). Carboidratos e Glicobiologia. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre, RS, ARTMED. **5th ed.:** 235-262.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E. C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S. F.; ABRAHAM, J. P.; ABU-RMEILEH, N. M. E.; ACHOKI, T.; ALBUHAIRAN, F. S.; ALEMU, Z. A.; ALFONSO, R.; ALI, M. K.; ALI, R.; GUZMAN, N. A.; AMMAR, W.; ANWARI, P.; BANERJEE, A.; BARQUERA, S.; BASU, S.; BENNETT, D. A.; BHUTTA, Z.; BLORE, J.; CABRAL, N.; NONATO, I. C.; CHANG, J.-C.; CHOWDHURY, R.; COURVILLE, K. J.; CRIQUI, M. H.; CUNDIFF, D. K.; DABHADKAR, K. C.; DANDONA, L.; DAVIS, A.; DAYAMA, A.; DHARMARATNE, S. D.; DING, E. L.; DURRANI, A. M.; ESTEGHAMATI, A.; FARZADFAR, F.; FAY, D. F. J.; FEIGIN, V. L.; FLAXMAN, A.; FOROUZANFAR, M. H.; GOTO, A.; GREEN, M. A.; GUPTA, R.; HAFEZI-NEJAD, N.;

HANKEY, G. J.; HAREWOOD, H. C.; HAVMOELLER, R.; HAY, S.; HERNANDEZ, L.; HUSSEINI, A.; IDRISOV, B. T.; IKEDA, N.; ISLAMI, F.; JAHANGIR, E.; JASSAL, S. K.; JEE, S. H.; JEFFREYS, M.; JONAS, J. B.; KABAGAMBE, E. K.; KHALIFA, S. E. A. H.; KENGNE, A. P.; KHADER, Y. S.; KHANG, Y.-H.; KIM, D.; KIMOKOTI, R. W.; KINGE, J. M.; KOKUBO, Y.; KOSEN, S.; KWAN, G.; LAI, T.; LEINSALU, M.; LI, Y.; LIANG, X.; LIU, S.; LOGROSCINO, G.; LOTUFO, P. A.; LU, Y.; MA, J.; MAINOO, N. K.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MOKDAD, A. H.; MOSCHANDREAS, J.; NAGHAVI, M.; NAHEED, A.; NAND, D.; NARAYAN, K. M. V.; NELSON, E. L.; NEUHOUSER, M. L.; NISAR, M. I.; OHKUBO, T.; OTI, S. O.; PEDROZA, A.; PRABHAKARAN, D.; ROY, N.; SAMPSON, U.; SEO, H.; SEPANLOU, S. G.; SHIBUYA, K.; SHIRI, R.; SHIUE, I.; SINGH, G. M.; SINGH, J. A.; SKIRBEKK, V.; STAPELBERG, N. J. C.; STURUA, L.; SYKES, B. L.; TOBIAS, M.; TRAN, B. X.; TRASANDE, L.; TOYOSHIMA, H.; VAN DE VIJVER, S.; VASANKARI, T. J.; VEERMAN, J. L.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; VLASSOV, V. V.; VOLLSET, S. E.; VOS, T.; WANG, C.; WANG, X.; WEIDERPASS, E.; WERDECKER, A.; WRIGHT, J. L.; YANG, Y. C.; YATSUYA, H.; YOON, J.; YOON, S.-J.; ZHAO, Y.; ZHOU, M.; ZHU, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; GAKIDOU, E. (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet (London, England) **384**(9945): 766-781.

NIKNIAZ, L.; MAHDAVI, R.; OSTADRAHIMI, A.; HEJAZI, M. A.; VATANKHAH, A. M. (2013). "Effects of synbiotic supplementation on total antioxidant capacity of human breastmilk." Breastfeed Med **8**: 217-222.

NORATTO, G. D.; ANGEL-MORALES, G.; TALCOTT, S. T.; MERTENS-TALCOTT, S. U. (2011). "Polyphenolics from Açaí (Euterpe oleracea Mart.) and red muscadine grape (Vitis rotundifolia) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(14): 7999-8012.

OLMOS, Y.; SANCHEZ-GOMEZ, F. J.; WILD, B.; GARCIA-QUINTANS, N.; CABEZUDO, S.; LAMAS, S.; MONSALVE, M. (2013). "SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1alpha complex." Antioxid Redox Signal **19**(13): 1507-1521.

OSTLUND, R. E., JR. (2002). "Phytosterols in human nutrition." Annu Rev Nutr **22**: 533-549.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. (2008). "Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (Euterpe oleracea Mart.)." J Agric Food Chem **56**(12): 4631-4636.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. (2008). "Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and oil in vitro." J Agric Food Chem **56**(10): 3593-3600.

PADILHA, P. C.; ROCHA, H. F.; ALVES, N.; PERES, W. A. F. (2010). "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents: a systematic review." Rev Paul Pediatr **28**(4): 387-393.

PALA, D.; BARBOSA, P. O.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; FREITAS, F. R.; VOLP, A. C. P.; MARANHAO, R. C.; FREITAS, R. N. (2018). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women." Clin Nutr **37**(2): 618-623.

PAN, M. H.; LAI, C. S.; TSAI, M. L.; HO, C. T. (2014). "Chemoprevention of nonalcoholic fatty liver disease by dietary natural compounds." Mol Nutr Food Res **58**(1): 147-171.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. (2016). "Flavonoids: an overview." J Nutr Sci **5**: e47.

PAPANDREOU, D.; ROUSSO, I.; MAVROMICHALIS, I. (2007). "Update on non-alcoholic fatty liver disease in children." Clin Nutr **26**(4): 409-415.

PARK, L. K.; FRISO, S.; CHOI, S. W. (2012). "Nutritional influences on epigenetics and age-related disease." Proc Nutr Soc **71**(1): 75-83.

PARKER, R. (2018). "The role of adipose tissue in fatty liver diseases." Liver Research **2**(1): 35-42.

PARRY, S. A.; HODSON, L. (2017). "Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism." J Investig Med **65**(8): 1102-1115.

PATTERSON, R. E.; KALAVALAPALLI, S.; WILLIAMS, C. M.; NAUTIYAL, M.; MATHEW, J. T.; MARTINEZ, J.; REINHARD, M. K.; MCDOUGALL, D. J.; ROCCA, J. R.; YOST, R. A.; CUSI, K.; GARRETT, T. J.; SUNNY, N. E. (2016). "Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **310**(7): E484-494.

PEREIRA, R. R.; DE ABREU, I. C.; GUERRA, J. F.; LAGE, N. N.; LOPES, J. M.; SILVA, M.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. (2016). "Acai (Euterpe oleracea Mart.) Upregulates Paraoxonase 1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats." Oxid Med Cell Longev **2016**: 8379105.

PERFIELD, J. W., 2ND; ORTINAU, L. C.; PICKERING, R. T.; RUEBEL, M. L.; MEERS, G. M.; RECTOR, R. S. (2013). "Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice." J Obes **2013**: 296537.

PHUNG, N.; PERA, N.; FARRELL, G.; LECLERCQ, I.; HOU, J. Y.; GEORGE, J. (2009). "Pro-oxidant-mediated hepatic fibrosis and effects of antioxidant intervention in murine dietary steatohepatitis." Int J Mol Med **24**(2): 171-180.

PONIEDZIALEK, B.; RZYMSKI, P.; PIET, M.; GASECKA, M.; STROINSKA, A.; NIEDZIELSKI, P.; MLECZEK, M.; RZYMSKI, P.; WILCZAK, M. (2018). "Relation between polyphenols, malondialdehyde, antioxidant capacity, lactate dehydrogenase and toxic elements in human colostrum milk." Chemosphere **191**: 548-554.

PONUGOTI, B.; KIM, D. H.; XIAO, Z.; SMITH, Z.; MIAO, J.; ZANG, M.; WU, S. Y.; CHIANG, C. M.; VEENSTRA, T. D.; KEMPER, J. K. (2010). "SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism." J Biol Chem **285**(44): 33959-33970.

PRUIS, M. G.; LENDVAI, A.; BLOKS, V. W.; ZWIER, M. V.; BALLER, J. F.; DE BRUIN, A.; GROEN, A. K.; PLOSCH, T. (2014). "Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring." Acta Physiol (Oxf) **210**(1): 215-227.

PURUSHOTHAM, A.; SCHUG, T. T.; XU, Q.; SURAPUREDDI, S.; GUO, X.; LI, X. (2009). "Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation." Cell Metab **9**(4): 327-338.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." Angew Chem Int Ed Engl **50**(3): 586-621.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; HERMES-LIMA, M. (2003). "Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail Helix aspersa." J Exp Biol **206**(Pt 4): 675-685.

RAPPA, F.; GRECO, A.; PODRINI, C.; CAPPELLO, F.; FOTI, M.; BOURGOIN, L.; PEYROU, M.; MARINO, A.; SCIBETTA, N.; WILLIAMS, R.; MAZZOCCOLI, G.; FEDERICI, M.; PAZIENZA, V.; VINCIGUERRA, M. (2013). "Immunopositivity for histone macroH2A1 isoforms marks steatosis-associated hepatocellular carcinoma." PLoS One **8**(1): e54458.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. (1976). "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy." N Engl J Med **295**(7): 349-353.

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

ROCHA, E. (2004). "Potencial ecológico para o manejo de frutos de açaizeiro (Euterpe precatoria Mart.) em áreas extrativistas no Acre, Brasil." Acta Amaz **34**: 237-250.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; GERHART-HINES, Z.; PUIGSERVER, P. (2008). "Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways." FEBS Lett **582**(1): 46-53.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; HAAS, W.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M.; PUIGSERVER, P. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.

ROGEZ, H. (2000). Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém, Brasil, EDUFPA.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. (2012). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Free Radic Biol Med **52**(1): 59-69.

RUSSO, G. L.; VASTOLO, V.; CICCARELLI, M.; ALBANO, L.; MACCHIA, P. E.; UNGARO, P. (2017). "Dietary polyphenols and chromatin remodeling." Crit Rev Food Sci Nutr **57**(12): 2589-2599.

SACCONNAY, L.; CARRUPT, P. A.; NURISSO, A. (2016). "Human sirtuins: Structures and flexibility." J Struct Biol **196**(3): 534-542.

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

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. (2006a). "Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleraceae mart. (acai)." J Agric Food Chem **54**(22): 8604-8610.

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

SCHERER, R.; GODOY, H. T. A. (2009). "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method." Food Chemistry **112**(3): 654-658.

SCHUG, T. T.; LI, X. (2011). "Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity." Ann Med **43**(3): 198-211.

SHANG, J.; CHEN, L. L.; XIAO, F. X.; SUN, H.; DING, H. C.; XIAO, H. (2008). "Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase." Acta Pharmacol Sin **29**(6): 698-706.

SHILDRICK, M. (2000). "Maternal Imagination: Reconceiving First Impressions." Rethinking History **4**(3): 243-260.

SHIMANO, H.; SATO, R. (2017). "SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology." Nat Rev Endocrinol **13**(12): 710-730.

SHIMAZU, T.; HIRSCHEY, M. D.; HUA, L.; DITTENHAFER-REED, K. E.; SCHWER, B.; LOMBARD, D. B.; LI, Y.; BUNKENBORG, J.; ALT, F. W.; DENU, J. M.; JACOBSON, M. P.; VERDIN, E. (2010). "SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production." Cell Metab **12**(6): 654-661.

SHIMOMURA, Y.; TAKAKI, A.; WADA, N.; YASUNAKA, T.; IKEDA, F.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, N.; UCHIDA, D.; ONISHI, H.; KUWAKI, K.; NAKAMURA, S.; NOUSO, K.; MIYAKE, Y.; KOIKE, K.; TOMOFUJI, T.; MORITA, M.; YAMAMOTO, K.; OKADA, H. (2017). "The Serum Oxidative/Anti-oxidative Stress Balance Becomes Dysregulated in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis Associated with Hepatocellular Carcinoma." Intern Med **56**(3): 243-251.

SOMEYA, S.; YU, W.; HALLOWS, W. C.; XU, J.; VANN, J. M.; LEEUWENBURGH, C.; TANOKURA, M.; DENU, J. M.; PROLLA, T. A. (2010). "Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction." Cell **143**(5): 802-812.

SPADA, P. D.; DANI, C.; BORTOLINI, G. V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. (2009). "Frozen fruit pulp of Euterpe oleraceae Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats." J Med Food **12**(5): 1084-1088.

SPADA, P. D.; DE SOUZA, G. G.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. (2008). "Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits." J Med Food **11**(1): 144-151.

SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KROL, E. (2008). "The contribution of animal models to the study of obesity." Lab Anim **42**(4): 413-432.

STEWART, M. S.; HEERWAGEN, M. J.; FRIEDMAN, J. E. (2013). "Developmental programming of pediatric nonalcoholic fatty liver disease: redefining the"first hit"." Clin Obstet Gynecol **56**(3): 577-590.

SUN, C.; FAN, J. G.; QIAO, L. (2015). "Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease." Int J Mol Sci **16**(3): 5161-5179.

SUN, X.; SEEBERGER, J.; ALBERICO, T.; WANG, C.; WHEELER, C. T.; SCHAUSS, A. G.; ZOU, S. (2010). "Acai palm fruit (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet." Exp Gerontol **45**(3): 243-251.

SUTER, M. A.; CHEN, A.; BURDINE, M. S.; CHOUDHURY, M.; HARRIS, R. A.; LANE, R. H.; FRIEDMAN, J. E.; GROVE, K. L.; TACKETT, A. J.; AAGAARD, K. M. (2012). "A

maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates." FASEB J **26**(12): 5106-5114.

TACER, K. F.; ROZMAN, D. (2011). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation " J Lipids **2011**.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. (2013). "Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)." Int J Mol Sci **14**(10): 20704-20728.

TANAKA, M.; KITA, T.; YAMASAKI, S.; KAWAHARA, T.; UENO, Y.; YAMADA, M.; MUKAI, Y.; SATO, S.; KURASAKI, M.; SAITO, T. (2017). "Maternal resveratrol intake during lactation attenuates hepatic triglyceride and fatty acid synthesis in adult male rat offspring." Biochem Biophys Rep **9**: 173-179.

TAO, R.; COLEMAN, M. C.; PENNINGTON, J. D.; OZDEN, O.; PARK, S. H.; JIANG, H.; KIM, H. S.; FLYNN, C. R.; HILL, S.; HAYES MCDONALD, W.; OLIVIER, A. K.; SPITZ, D. R.; GIUS, D. (2010). "Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress." Mol Cell **40**(6): 893-904.

TEMPLE, J. L.; CORDERO, P.; LI, J.; NGUYEN, V.; OBEN, J. A. (2016). "A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence." Int J Mol Sci **17**(6).

THORN, S. R.; BAQUERO, K. C.; NEWSOM, S. A.; EL KASMI, K. C.; BERGMAN, B. C.; SHULMAN, G. I.; GROVE, K. L.; FRIEDMAN, J. E. (2014). "Early life exposure to maternal insulin resistance has persistent effects on hepatic NAFLD in juvenile nonhuman primates." Diabetes **63**(8): 2702-2713.

TIAO, M. M.; LIN, Y. J.; YU, H. R.; SHEEN, J. M.; LIN, I. C.; LAI, Y. J.; TAIN, Y. L.; HUANG, L. T.; TSAI, C. C. (2018). "Resveratrol ameliorates maternal and post-weaning high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease via renin-angiotensin system." Lipids Health Dis **17**(1): 178.

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

UNIS, A. (2015). "Acai berry extract attenuates glycerol-induced acute renal failure in rats." Ren Fail **37**(2): 310-317.

VALLIM, T.; SALTER, A. M. (2010). "Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **82**(4-6): 211-218.

VAN HOORN, D. E.; NIJVELDT, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A.; HOFMAN, Z.; M'RABET, L.; DE BONT, D. B.; VAN NORREN, K. (2002). "Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids." Eur J Pharmacol **451**(2): 111-118.

WALKER, A. K.; YANG, F.; JIANG, K.; JI, J. Y.; WATTS, J. L.; PURUSHOTHAM, A.; BOSS, O.; HIRSCH, M. L.; RIBICH, S.; SMITH, J. J.; ISRAELIAN, K.; WESTPHAL, C. H.; RODGERS, J. T.; SHIODA, T.; ELSON, S. L.; MULLIGAN, P.; NAJAFI-SHOUSHTARI, H.; BLACK, J. C.; THAKUR, J. K.; KADYK, L. C.; WHETSTINE, J. R.; MOSTOSLAVSKY, R.; PUIGSERVER, P.; LI, X.; DYSON, N. J.; HART, A. C.; NAAR, A. M. (2010). "Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP." Genes Dev **24**(13): 1403-1417.

WILLIAMS, L.; SEKI, Y.; VUGUIN, P. M.; CHARRON, M. J. (2014). "Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review." Biochim Biophys Acta **1842**(3): 507-519.

WONG, D. Y.; MUSGRAVE, I. F.; HARVEY, B. S.; SMID, S. D. (2013). "Acai (Euterpe oleraceae Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against beta-amyloid exposure in vitro." Neurosci Lett **556**: 221-226.

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

YAMAGUCHI, K. K.; PEREIRA, L. F.; LAMARAO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. (2015). "Amazon acai: chemistry and biological activities: a review." Food Chem **179**: 137-151.

YANG, H.; ZUO, X. Z.; TIAN, C.; HE, D. L.; YI, W. J.; CHEN, Z.; ZHANG, P. W.; DING, S. B.; YING, C. J. (2015). "Green Tea Polyphenols Attenuate High-Fat Diet-Induced Renal Oxidative Stress through SIRT3-Dependent Deacetylation." Biomed Environ Sci **28**(6): 455-459.

YI, W.; XIE, X.; DU, M.; BU, Y.; WU, N.; YANG, H.; TIAN, C.; XU, F.; XIANG, S.; ZHANG, P.; CHEN, Z.; ZUO, X.; YING, C. (2017). "Green Tea Polyphenols Ameliorate the Early Renal Damage Induced by a High-Fat Diet via Ketogenesis/SIRT3 Pathway." Oxid Med Cell Longev **2017**: 9032792.

YOSHINO, J.; MILLS, K. F.; YOON, M. J.; IMAI, S. (2011). "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice." Cell Metab **14**(4): 528-536.

YOUNOSSI, Z.; ANSTEE, Q. M.; MARIETTI, M.; HARDY, T.; HENRY, L.; ESLAM, M.; GEORGE, J.; BUGIANESI, E. (2018). "Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **15**(1): 11-20.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. (2016). "Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes." Hepatology **64**(1): 73-84.

ZHANG, M.; YANG, X. J. (2016). "Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases." World J Gastroenterol **22**(40): 8905-8909.

ZHANG, X.; STRAKOVSKY, R.; ZHOU, D.; ZHANG, Y.; PAN, Y. X. (2011). "A maternal high-fat diet represses the expression of antioxidant defense genes and induces the cellular senescence pathway in the liver of male offspring rats." J Nutr **141**(7): 1254-1259.

ZHANG, X. Q.; XU, C. F.; YU, C. H.; CHEN, W. X.; LI, Y. M. (2014). "Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease." World J Gastroenterol **20**(7): 1768-1776.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; SANYAL, A. J. (2007). "Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease." Am J Clin Nutr **86**(2): 285-300.

11. Anexos

Anexo I – Certificado CEUA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2015/15**, intitulado "***Efeito do consumo de açaí (Euterpe oleracea Mart.) e da dieta high fat sobre a programação metabólica da doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos.***", que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a). Renata Nascimento de Freitas**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados			
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo
Rato heterogênico Fischer	176	90 dias	Fêmeas

Restrição de dieta: ( ) sim (X) não

Especificar:

Este Certificado expira em: 30/03/2019.

Ouro Preto, 29 de fevereiro de 2016.

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

Anexo II – Otimização PCR

Primeiramente foi realizado a amplificação das sequências dos iniciadores através da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Todos os genes foram amplificados e os produtos foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose.

A figura 25, mostra o resultado da qRT-PCR para os genes *Gpx1*, *Gpx4*, *Gapdh* e *microglobulina β2*. A amplificação dos genes foi avaliada conferindo o tamanho do produto obtido em relação a um padrão conhecido de DNA. De acordo com o tamanho esperado para cada genes, pode-se observar que as condições da qRT-PCR para os produtos em questão funcionou adequadamente. As "bandas" A correspondem ao gene *Gpx1*, as bandas B correspondem ao *Gpx4*, C ao *Gapdh* e as de D correspondem a *β2*. Vale ressaltar as que as bandas nas quais as setas estão apontando é o padrão de DNA. Todos estão em duplicata e ainda há a presença de um branco onde não foi observado presença de contaminação ou dímeros de iniciadores.

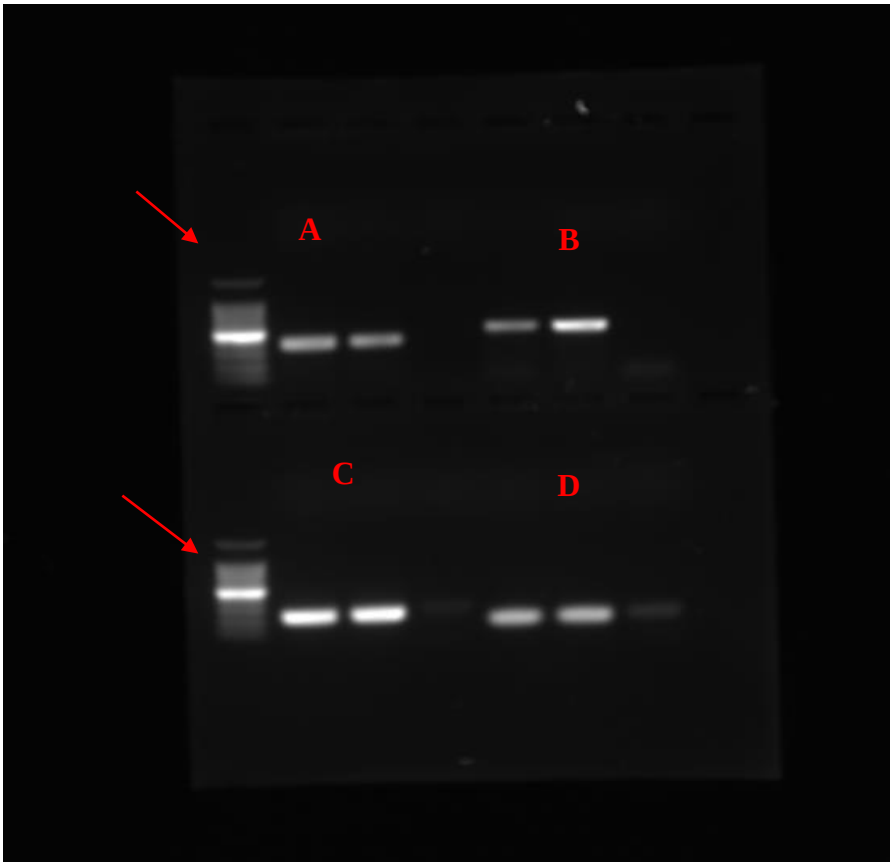


Figura 26: Resultados da PCR com identificação dos *Gpx1*, *Gpx3*, *Gapdh* e *β2*.

A figura 26 mostra o resultado da amplificação para os genes *Sirt1, Sirt3, Sod1* e *Sod2*. As "bandas" E corresponde a *Sirt1*, F a *Sirt3*, G a *Sod1* e H a *Sod2*. Os produtos obtidos correspondente ao tamanho esperado, e novamente as condições da qRT-PCR pode ser usada para análise da expressão gênica

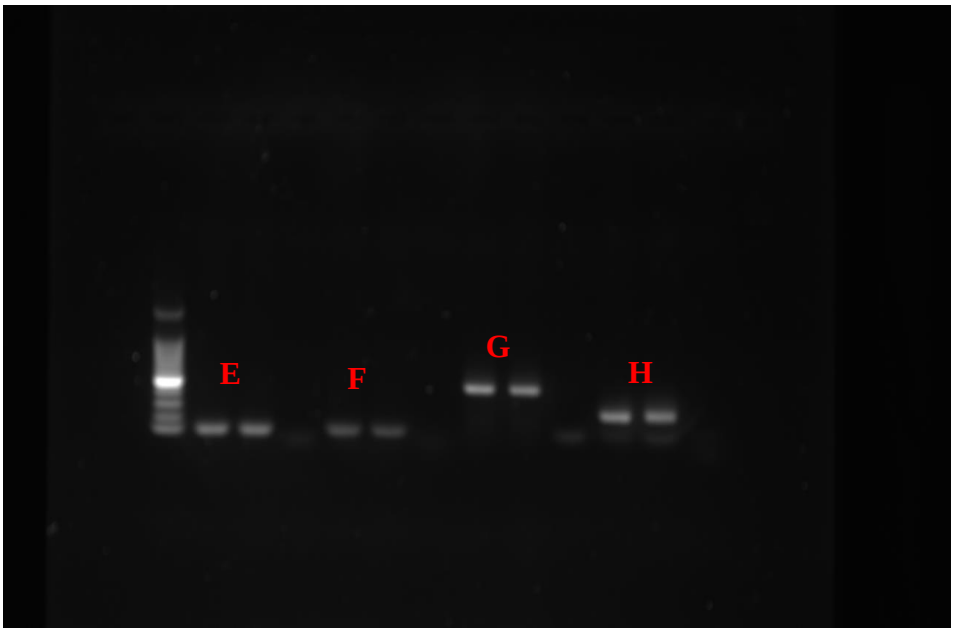


Figura 27: Resultados da PCR com identificação dos genes *Sirt1, Sirt3, Sod1* e *Sod2*.

A figura 27 mostra o resultado da amplificação para o gene *Srebpf1*, que de acordo com a sequência proposta apresenta 121 bp. Pode-se observado que a presença de produtos de amplificação no branco. Através da análise dos resultados obtidos na curva de amplificação, é provável que o produto encontrado seja formação de dímeros de primers.

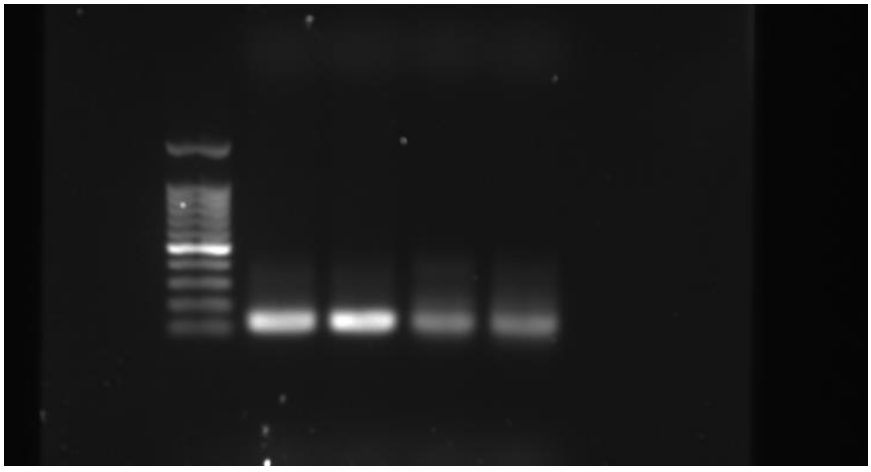


Figura 28: Resultado da PCR com identificação do gene *Srebpf1* 121 bp.

Na figura 28 pode ser observado a amplificação dos genes *Ucp1* (I, 102 bp), *Fasn* (J, 163 bp) e *Ucp2* (L, 230 bp). Nota-se que a banda obtida para *Ucp1* apresentou uma amplificação aquém do esperado. Outras sequências foram obtidas para esse gene, mas não foi possível realizar a amplificação desse gene.

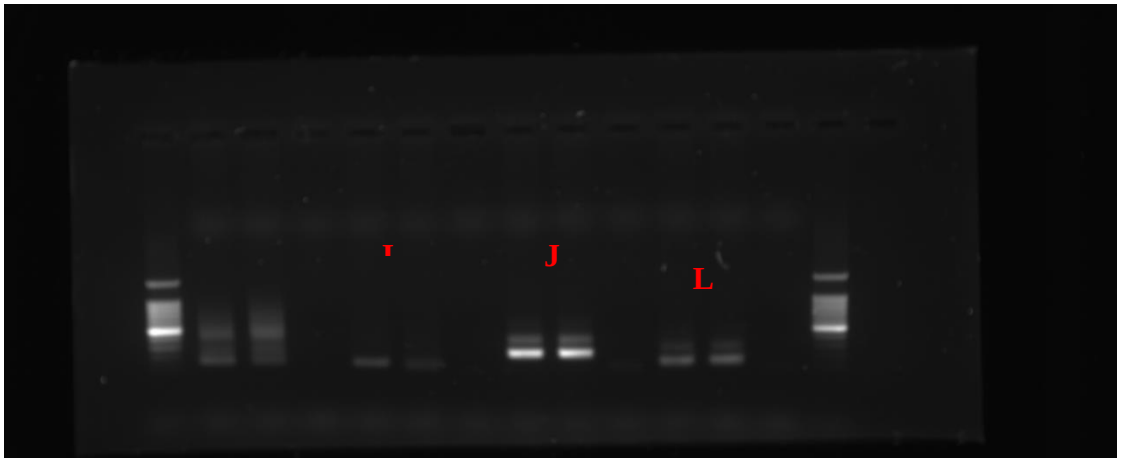
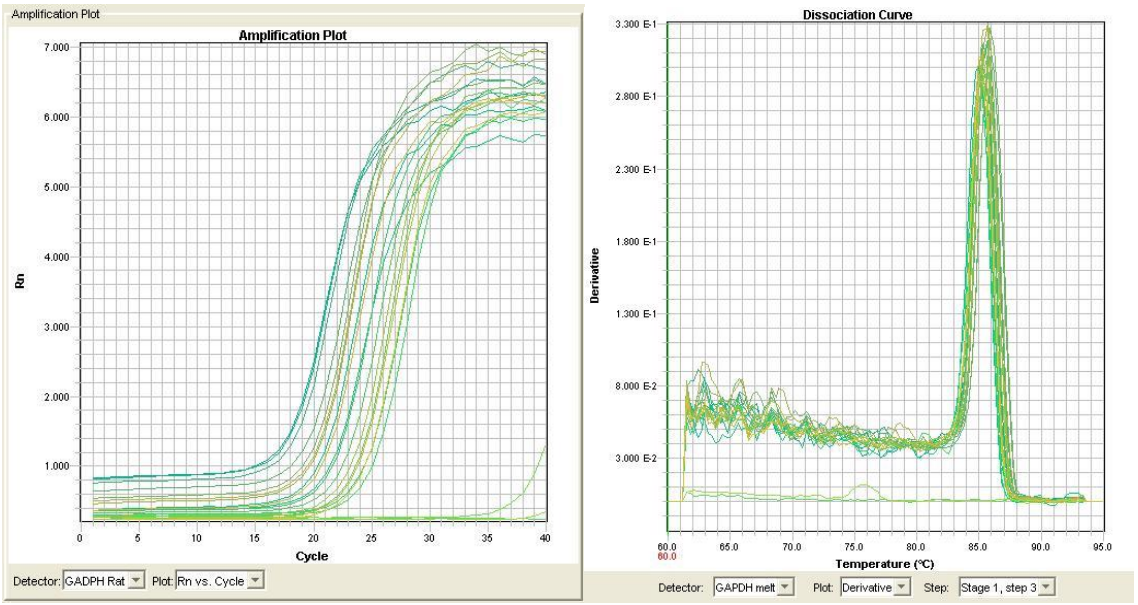


Figura 29: Resultados da PCR com identificação dos genes *Ucp1*, *Fasn* e *Ucp2*.

Otimização

Após a identificação dos genes foi realizada uma otimização com diferentes concentrações de RNA para avaliar a eficiência dos genes e escolher a melhor concentração de RNA para ser utilizado nas amostras do presente trabalho. A eficiência das amplificações foi avaliada por meio da linearidade e da inclinação das curvas padrão frente a diferentes concentrações de cDNA-alvo. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado.

A figura 29 e 30 mostram a curva de amplificação, de dissossiação e o gráfico obtido para avaliar a eficiência dos genes de referência *Gapdh* e *β2.*



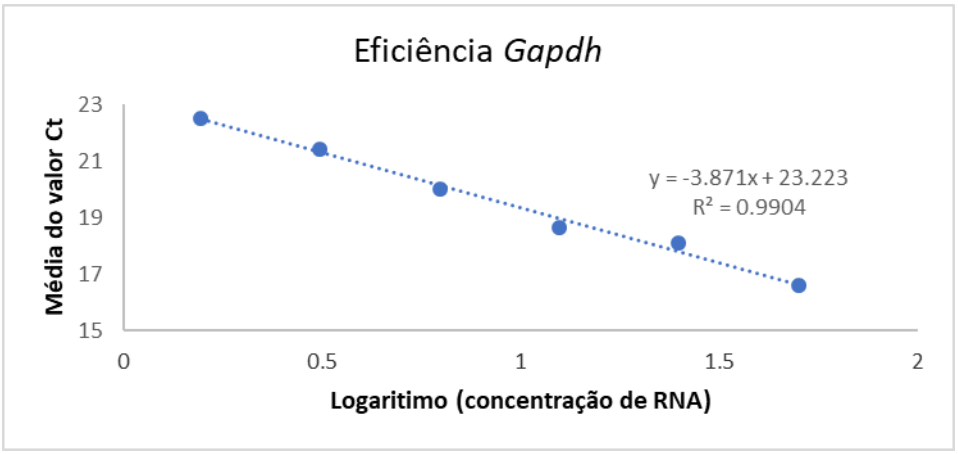
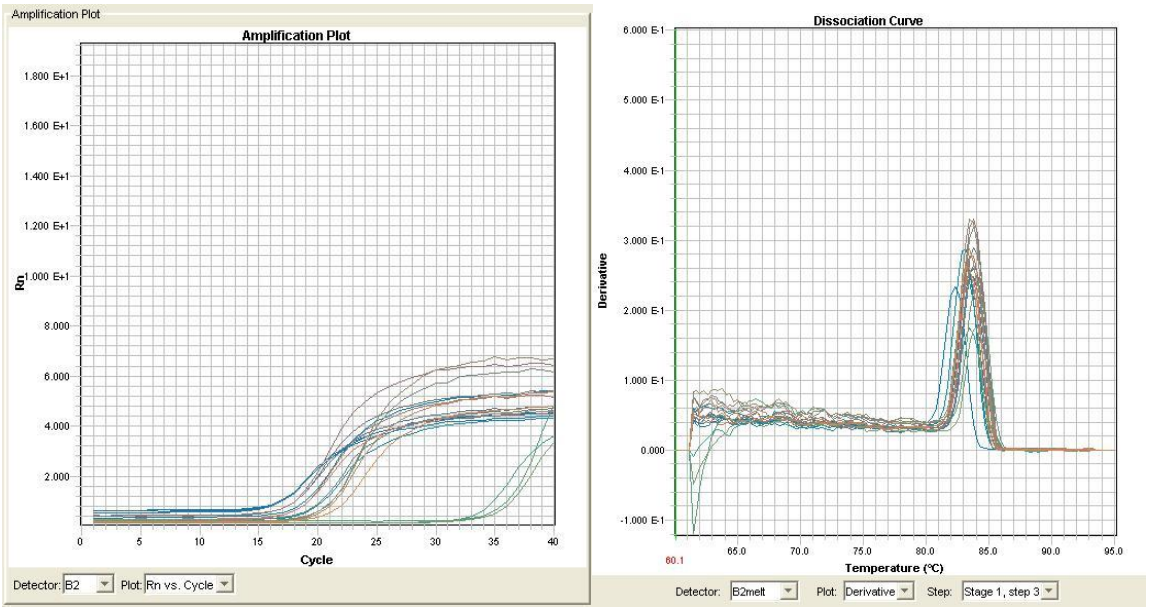


Figura 30: Curva de avaliação da eficiência do gene *Gapdh.*



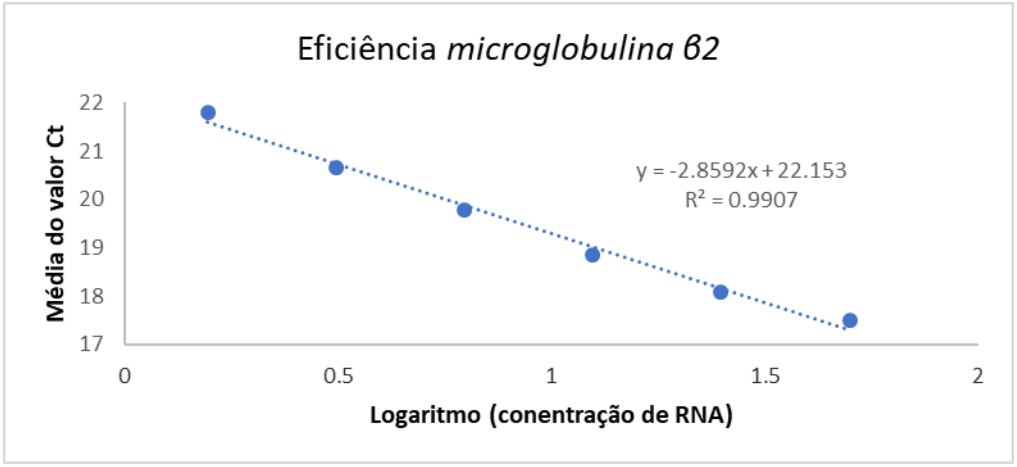
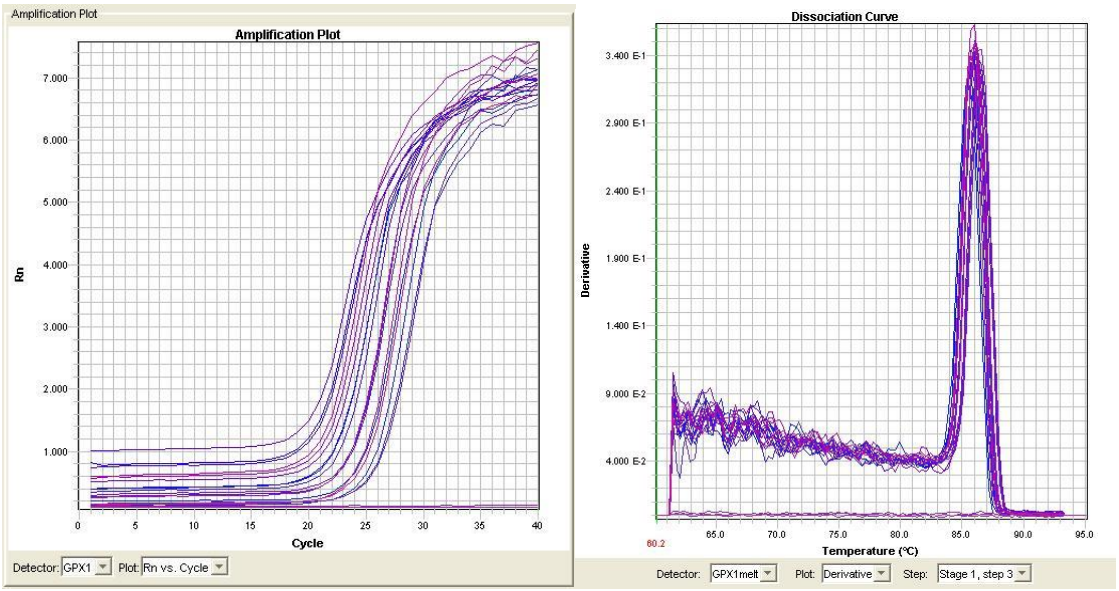


Figura 31: Curva de avaliação de eficiência do gene *β2*

As figuras 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39 apresentam as curvas de amplificação, dissossiação e os gráfico de eficiência para os genes alvo: *Gpx1*, *Gpx4*, *Sirt1*, *Sirt3*, *Sod1*, *Sod2*, *Srebpf1*, *Fasn* e *Ucp2*.



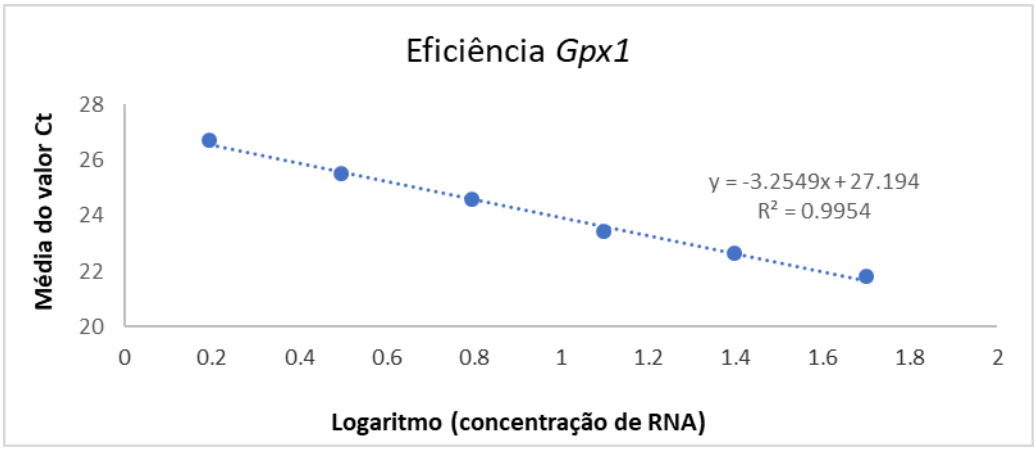
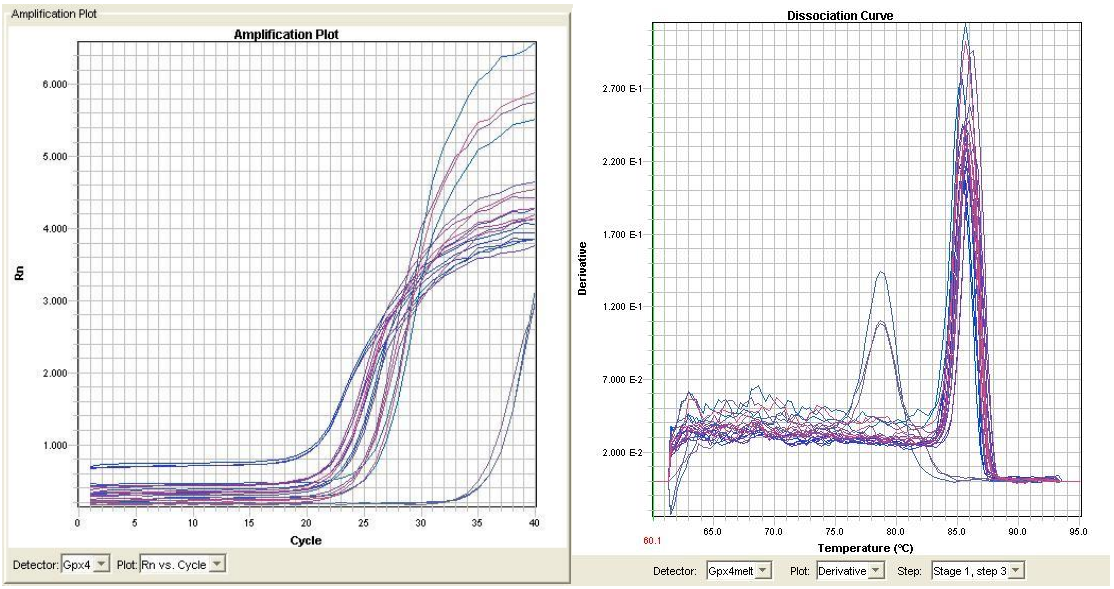


Figura 32: Curva de avaliação de eficiência do gene *Gpx1*



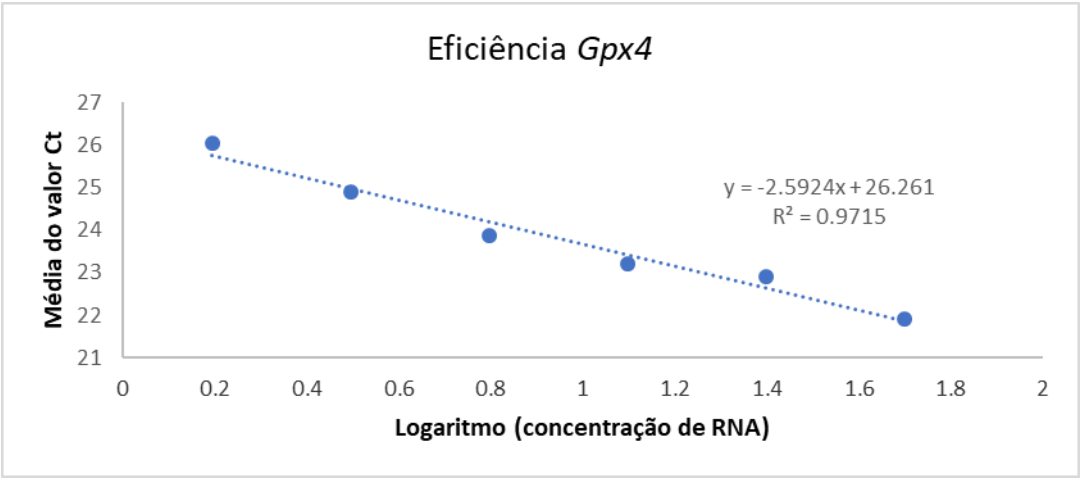
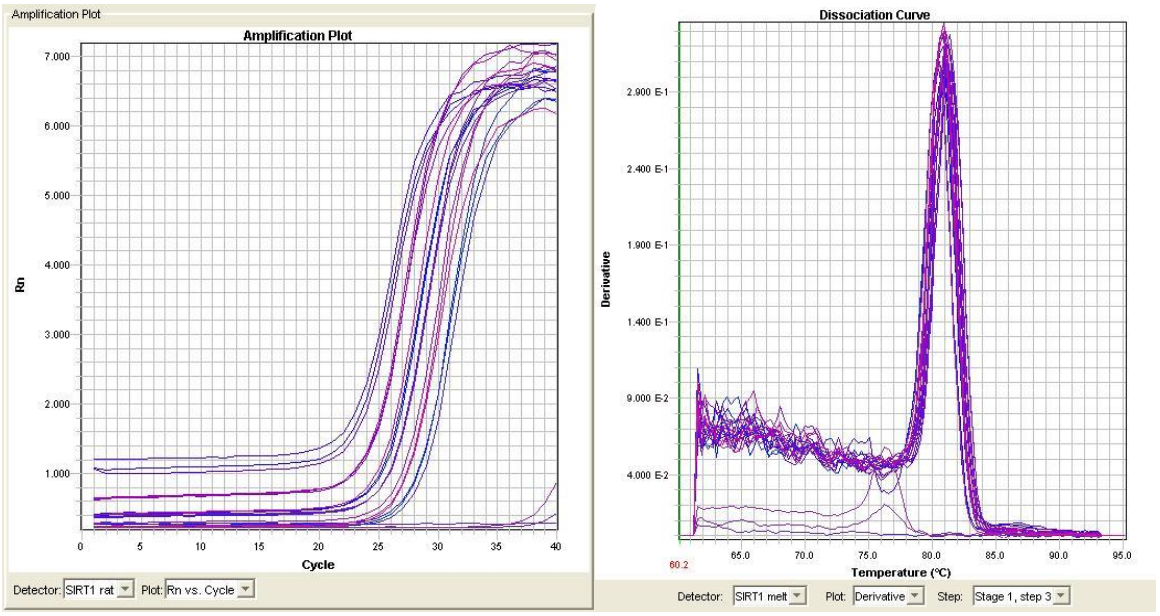


Figura 33: Curva de avaliação de eficiência do gene *Gpx4*



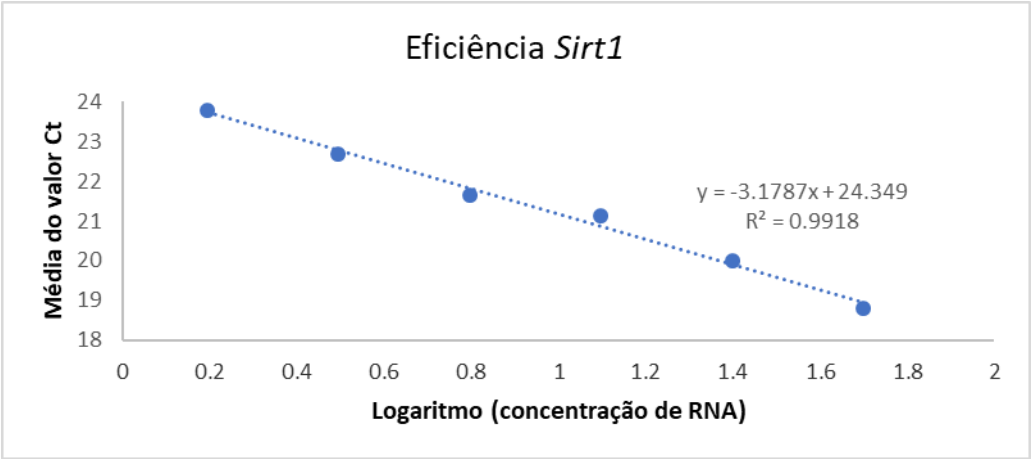
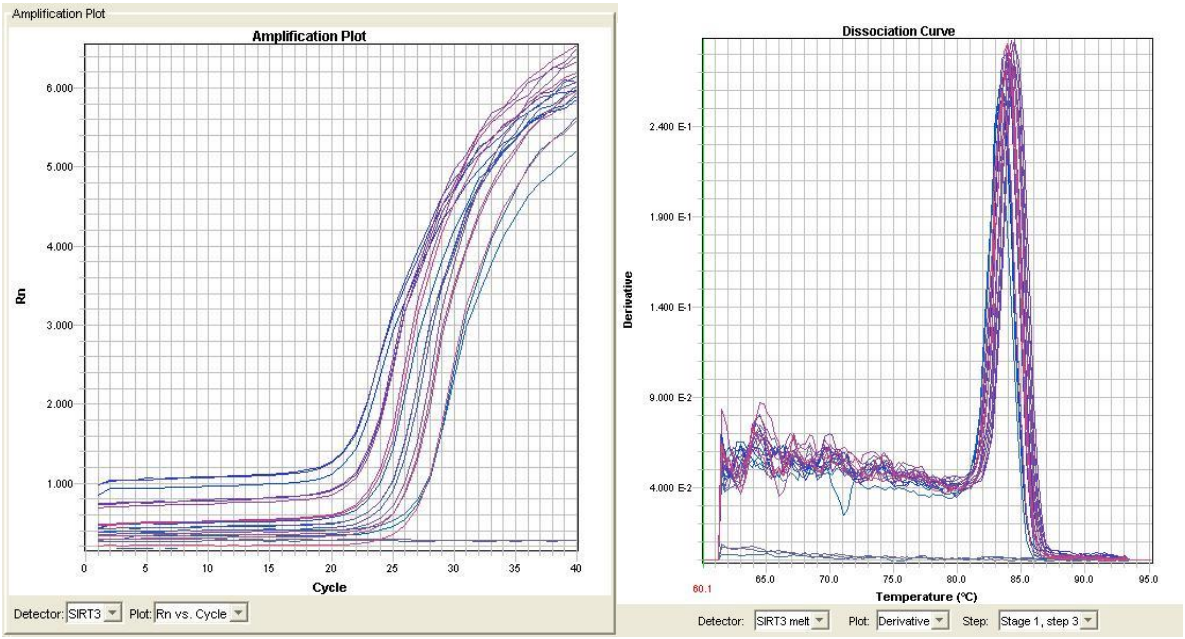


Figura 34: Curva de avaliação de eficiência do gene *Sirt1*



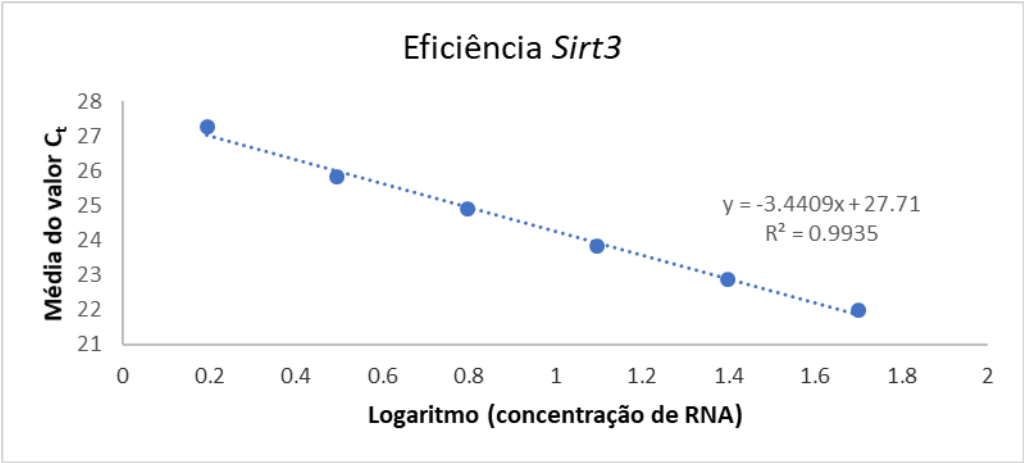
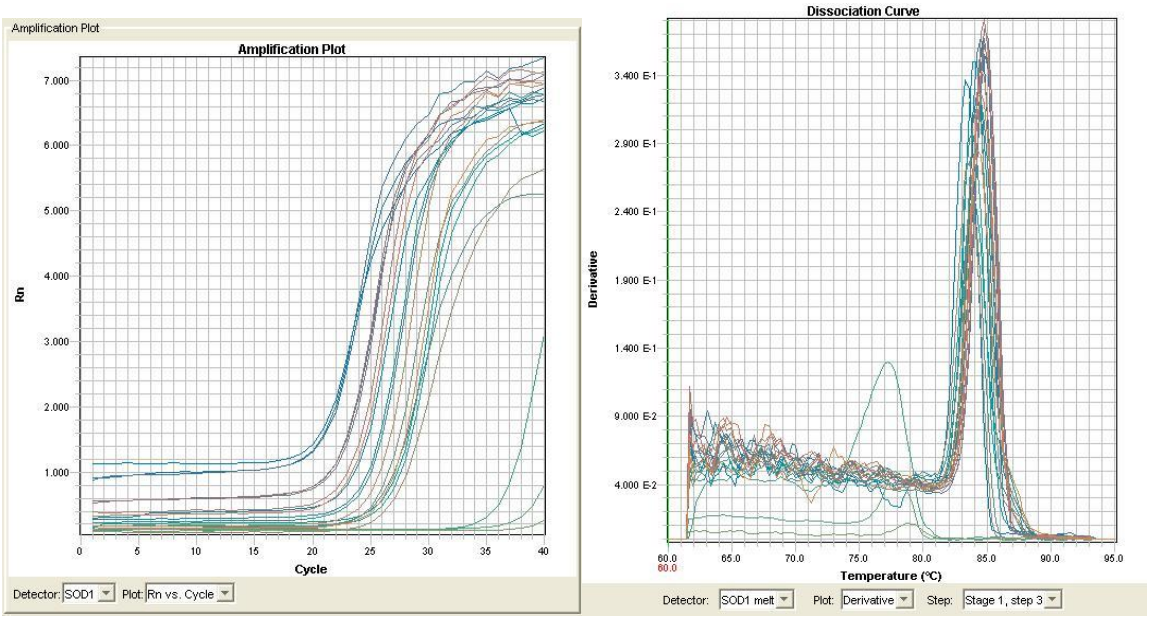


Figura 35: Curva de avaliação de eficiência do gene *Sirt3*



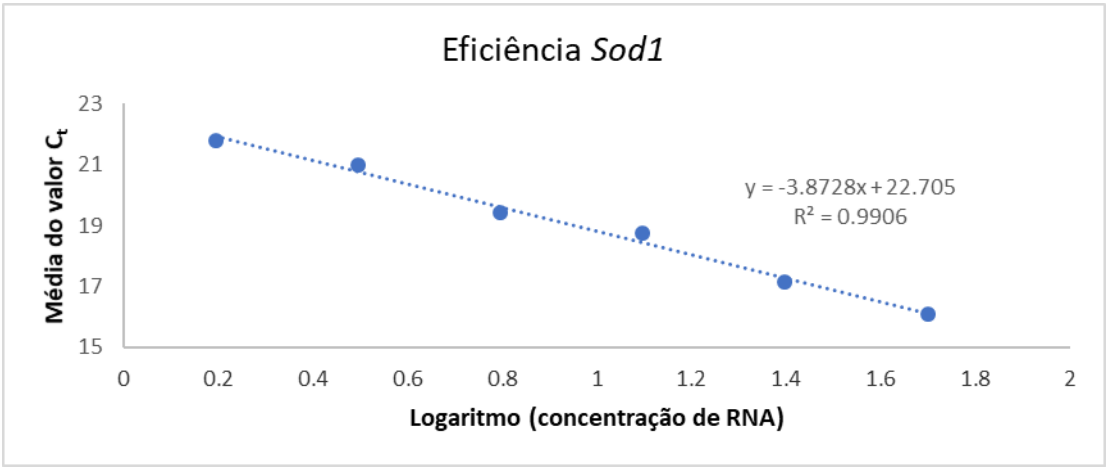
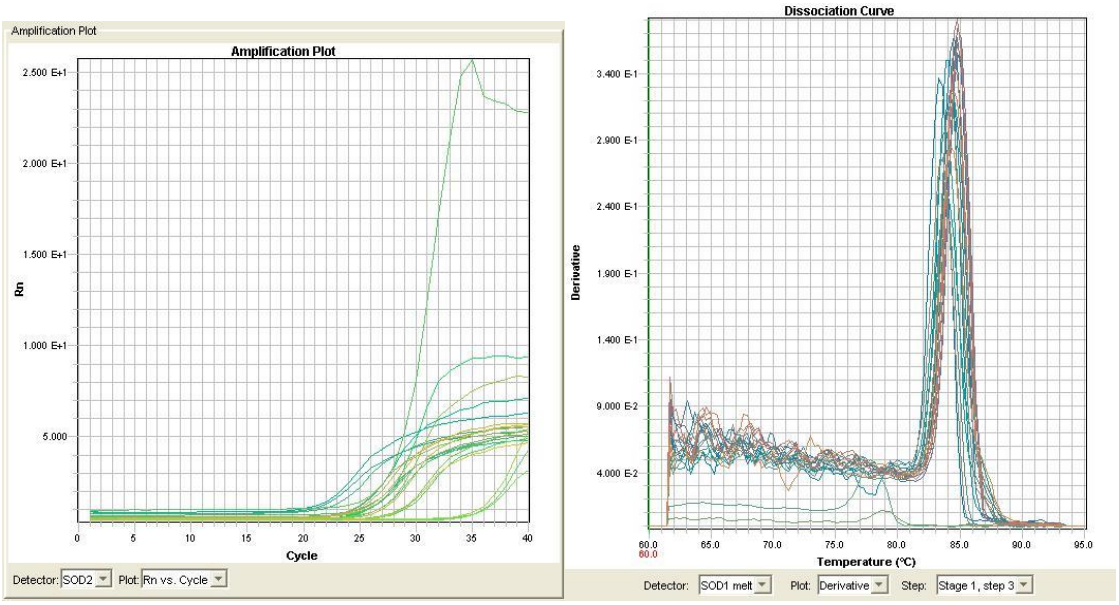


Figura 36: Curva de avaliação de eficiência do gene *Sod1*



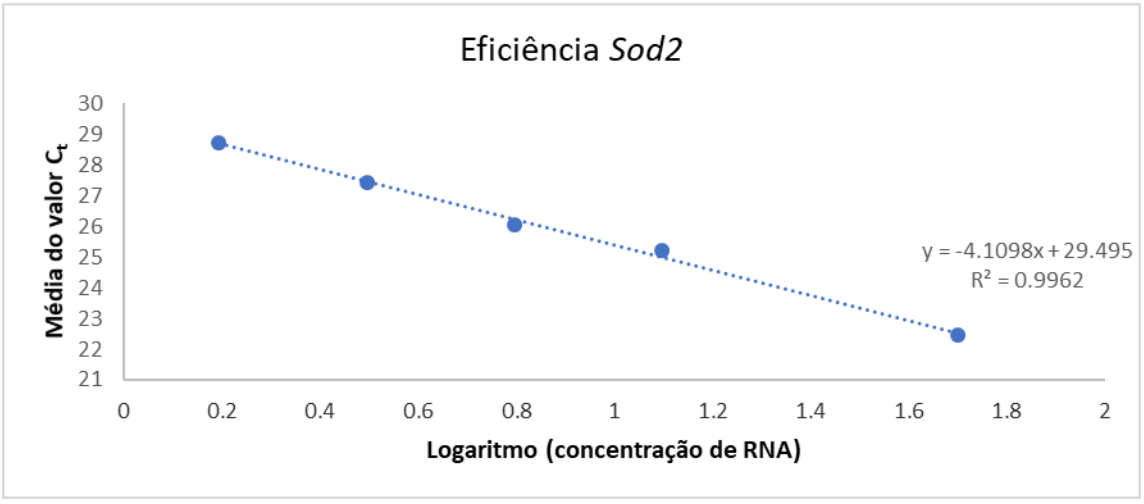
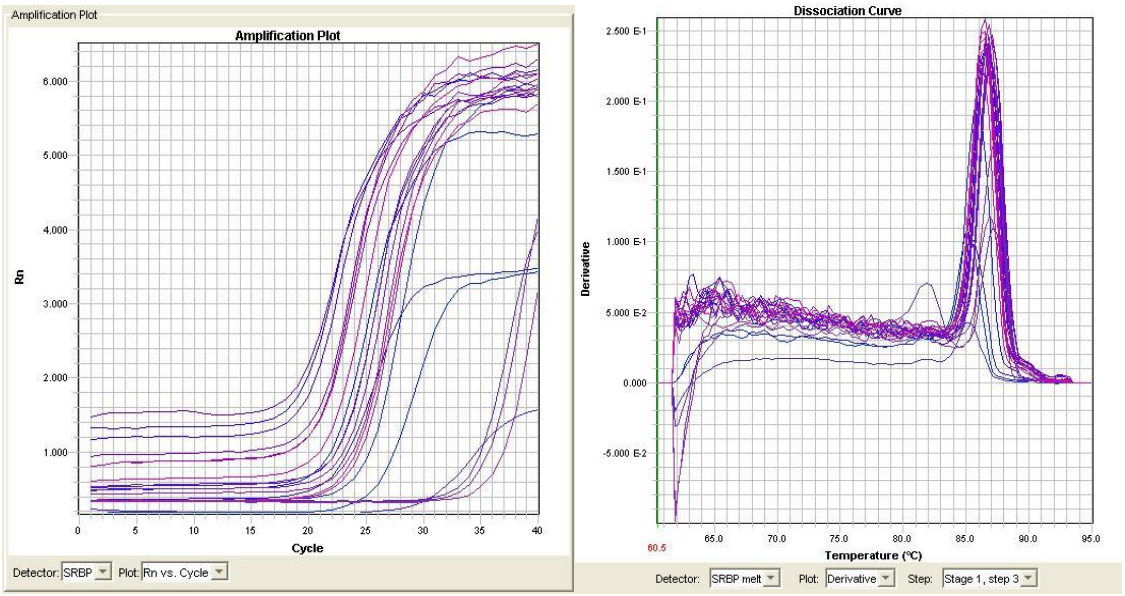


Figura 37: Curva de avaliação de eficiência do gene *Sod2*



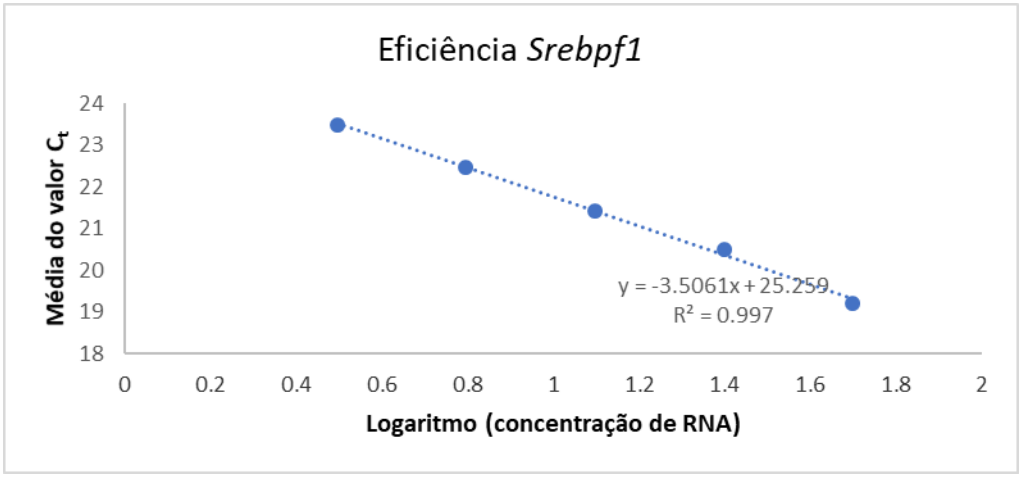
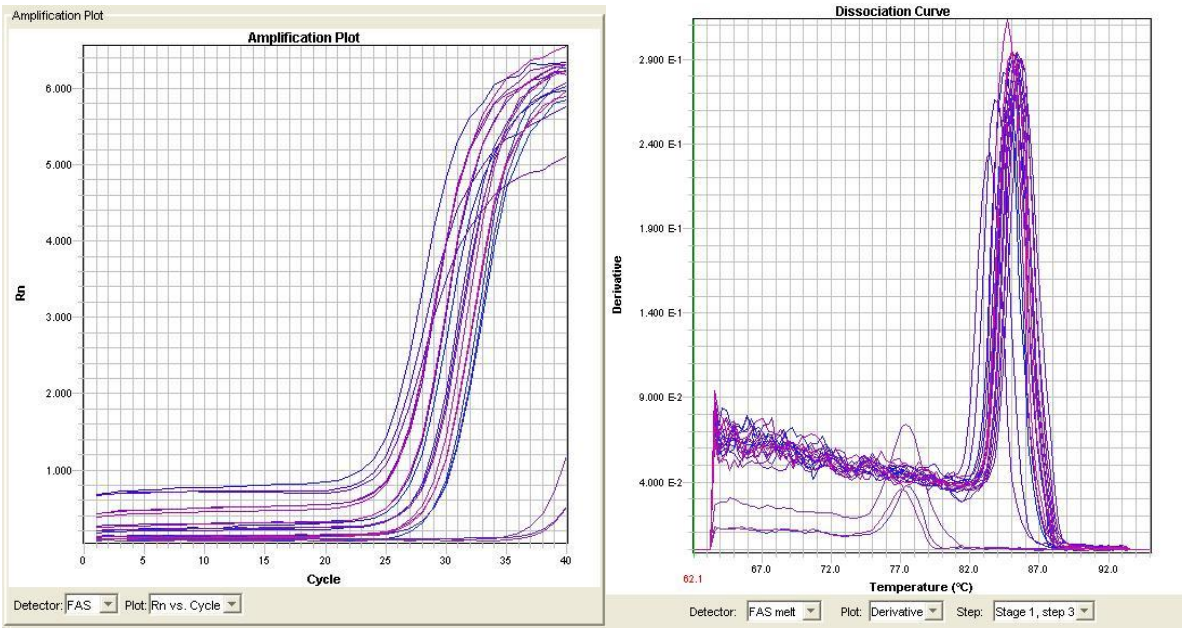


Figura 38: Curva de avaliação de eficiência do gene *Srebpf1*



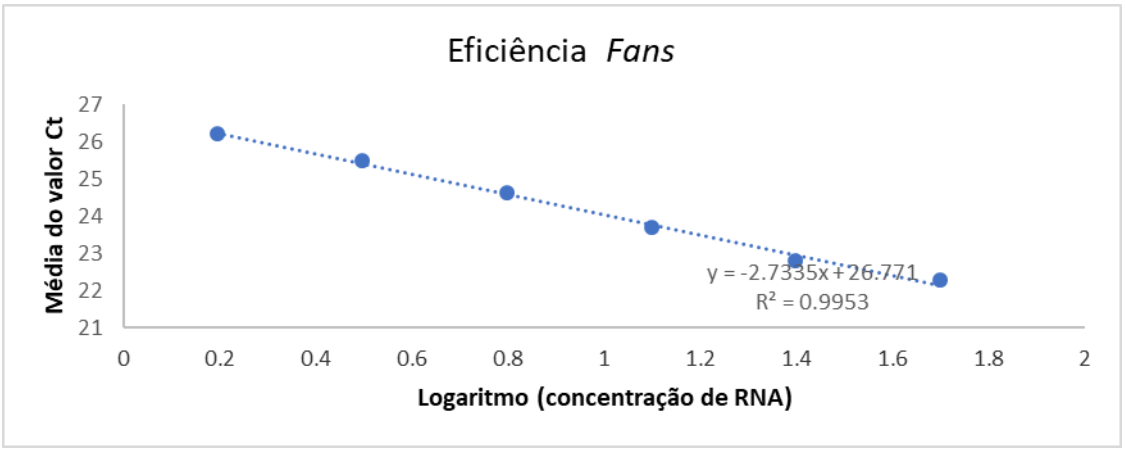
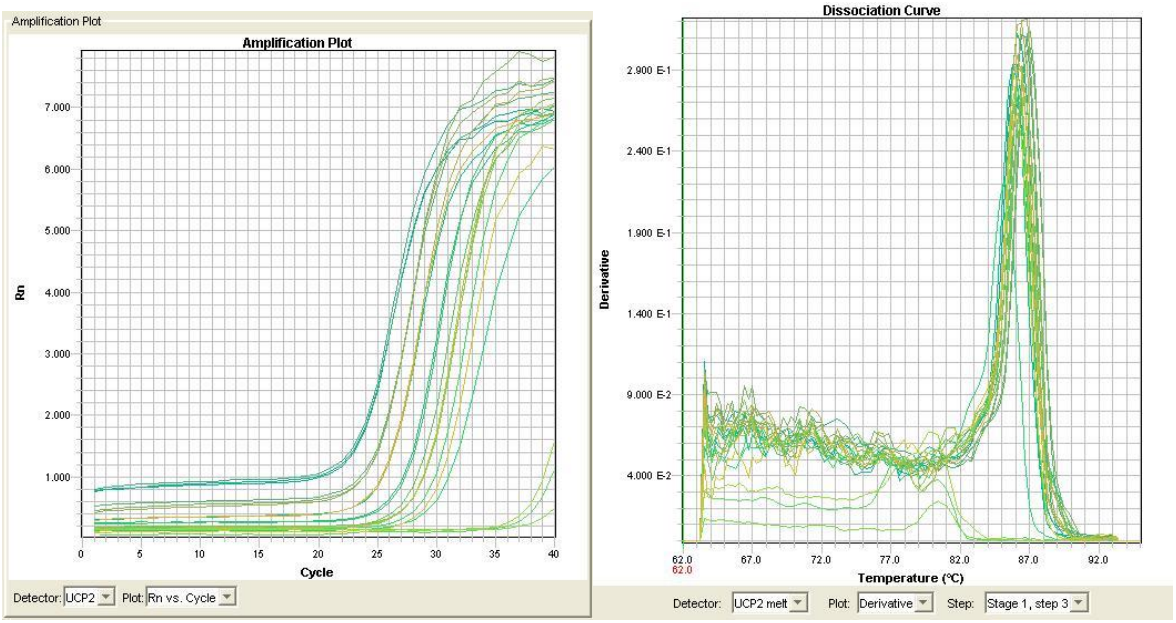


Figura 39: Curva de avaliação de eficiência do gene *Fasn*



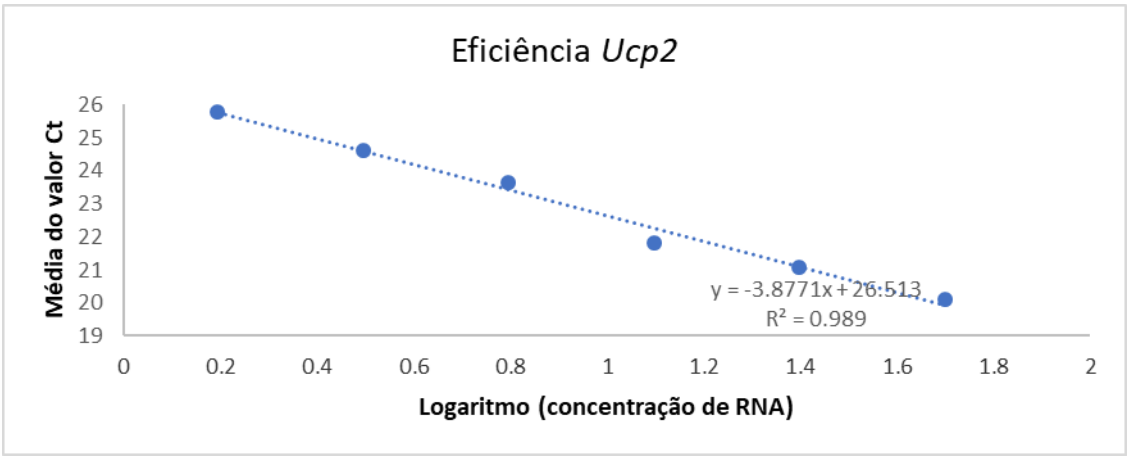


Figura 40: Curva de avaliação de eficiência do gene *Ucp2*

Anexo III – Artigo Publicado

European Journal of Nutrition
https://doi.org/10.1007/s00394-019-02040-2

ORIGINAL CONTRIBUTION

Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) supplementation in the diet during gestation and lactation attenuates liver steatosis in dams and protects offspring

Priscila O. Barbosa[1] · Melina O. de Souza[2] · Deuziane P. D. Paiva[2] · Marcelo E. Silva[1,2] · Wanderson G. Lima[1] · Giovanna Bermano[3] · Renata N. Freitas[1,2]

Received: 25 January 2019 / Accepted: 29 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose Maternal high-fat diet affects offspring and can induce metabolic disorders such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). New therapeutic strategies are being investigated as way to prevent or attenuate this condition. The objective of this study was to evaluate the effect of açaí supplementation in the maternal high-fat diet on dams and offspring lipid metabolism.

Methods Female Fisher rats were divided in four groups and fed a control diet (C), a high-fat diet (HF), an açaí supplemented diet (CA) and a high-fat diet supplemented with açaí (HFA) 2 weeks before mating, during gestation and lactation. The effects of açaí were evaluated in the male offspring after birth (P1) and weaning (P21).

Results HFA reduced relative liver weight, fat and cholesterol liver content in dams and improved liver steatosis as confirmed by histological analyses. HFA increased serum cholesterol and expression of *Srebpf1* and *Fasn* genes. In offspring, HFA decreased relative liver weight, and serum cholesterol only in P21. An increase in the *Sirt1, Srebpf1* and *Fasn* genes expression was observed in P21.

Conclusions These results suggest that açaí supplementation may attenuate NAFLD in dams and protect offspring from the detrimental effects of lipid excess from a maternal high-fat diet.

Keywords Açaí · *Euterpe oleracea* Martius · High-fat maternal diet · Metabolic programming · Non-alcoholic fatty liver disease

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by accumulation of triglycerides in hepatocytes. This disease encompasses a spectrum of conditions ranging from simple hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by the presence of inflammation, which can progress to cirrhosis or hepatic carcinoma [1].

The prevalence of NAFLD in children and adolescents has evidenced the role of maternal nutrition during critical periods of fetal development [2]. Metabolic programing is a process by which maternal lifestyle (including diet) promotes modifications in the uterus environment or milk composition that can trigger several changes in the sequence of events, in the gestational or lactation periods, leading to metabolic disorders in the offspring [3]. The molecular mechanisms and pathways involved are not well understood but some studies have pointed epigenetic changes as having a pivot role in the process [4]. This is a current and extremely relevant concept due to the pandemic of metabolic diseases, such as diabetes, obesity and systemic arterial hypertension [5] that might be partially explained by metabolic programming. High-fat maternal diet has been widely used in the literature to induce NAFLD in experimental animal models and the consumption of such diet reflects the current world scenario in which excessive lipid intake may contribute to rise of liver diseases in the population [6, 7]. Over the last decade, considerable

✉ Renata N. Freitas
renata.freitas@ufop.edu.br

1 Nucleus of Research in Biological Sciences (NUPEB), Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil

2 School of Nutrition, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil

3 Centre for Obesity Research and Education, School of Pharmacy and Life Sciences, Robert Gordon University, Aberdeen, UK

Published online: 05 July 2019

Anexo IV – Artigo em progresso

Title: Açaí supplementation improves oxidative stress biomarkers in dams fed a high-fat diet and antioxidant defences in offspring.

Background: Maternal high-fat diet affects offspring and can induce metabolic disorders. Lipids excess from a uterine environment can promote oxidative stress and progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in offspring. Antioxidant nutrients may play an important role in redox metabolism.

Objective: This study aimed to evaluate the effect of açaí pulp supplementation on metabolic programming of NAFLD, by assessing antioxidants defences and biomarkers of oxidative stress.

Methods: Female Fisher rats were divided in four groups and fed a control diet (C), a high-fat diet (HF), an açaí supplemented diet (CA) and a high-fat diet supplemented with açaí (HFA) before mating, during gestation and lactation. The effects of açaí supplementation were evaluated in dams and in the male offspring after weaning (P21).

Results: HFA increased body weight in dams, however reduced the absolute and relative liver weight. There was a reduction in biomarkers of oxidative stress, malondialdehyde and carbonyl protein, in the liver of dams, and the enzyme activity of CAT, GPx and SOD were reduced in dams. In offspring (P21), HFA reduced liver weight compared to HF. *Gpx1* and *Gpx4* mRNA expression increased in P21.

Conclusions: These results suggest açaí is able to restore the redox metabolism, preventing oxidative damage in dams by a direct mechanism. Moreover, açaí may promote beneficial transgenerational effects on antioxidant defences.

Keywords: açaí, *Euterpe oleracea* Martius, maternal high-fat diet, metabolic programming, oxidative stress, redox metabolism.