

**FERNANDO MILANEZ DIAS**

**ALTERAÇÕES IMUNOMETABÓLICAS NO TECIDO  
ADIPOSO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA  
CAFETERIA: PAPEL ANTI-OBESIDADE DA ACEROLA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos de  
Lira

**CRICIÚMA, 2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D541a Dias, Fernando Milanez.

Alterações imunometabólicas no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta Cafeteria: papel anti-obesidade da acerola / Fernando Milanez Dias ; orientador: Fábio Santos de Lira. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2013. 54 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul

Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Obesidade - Tratamento. 2. Dieta de cafeteria. 3. Suco de acerola. 3. Alimentos funcionais. 4. Metabolismo energético. 5. Lipólise. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.398







UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---


## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **Fernando Milanez Dias** sob o título “**Alterações imuno-metabólicas no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta cafeteria: papel anti-obesidade da acerola**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.


Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito C.

Criciúma, SC, 27 de novembro de 2013

  
**Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck**  
Membro Relator

  
**Profa. Dra. Josiane Budni**  
Membro Interno

  
**Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra**  
Membro Externo

  
**Prof. Dr. Fábio Santos de Lira**  
Orientador

  
**Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza**  
Coordenador do PPGCS



## **Folha informativa**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.





*Dedico esse trabalho à  
minha família.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder esta oportunidade.

A minha família pelo carinho, meu pai Adelino Dias e minha mãe, Adir Milanez Dias, muito obrigado por tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim, sem vocês minha vida não teria rumo.

A toda família LAFIBE que me recebeu de braços abertos.

Ao Dr. Fábio Santos de Lira, por ser meu orientador e me ajudar sempre que precisei, nunca faltando suporte. Ao Grande Dr. Cláudio Teodoro de Souza pela grande amizade e ajuda nesse trabalho

A Rosana Mengue, por ser minha companheira e namorada há três anos e sempre presente em todos os momentos, me fazendo feliz a cada dia que passa.

As amigas pesquisadoras Schérolin de Oliveira Marques e Thais Fernandes Luciano que me ajudaram em vários momentos. E ao Bruno Pieiri, meu grande parceiro de Criciúma Esporte Clube.

A todos os alunos de iniciação científica, que foram muito importantes para o desenvolvimento desta pesquisa e também pela grande convivência e de grandes amizades. Vitor Hugo, Alessandra Gonçalves, Taina, Mateus, Hemely, Daniela.

A todos os colegas de mestrado que junto comigo durante esses 2 anos aprendemos muitas coisas, além de conhecimentos grande amizades. Samira Dal Toé de Prá, Lia Spillere, Karina Ferreira, Rafaela Antonini, Ariete Minetto, Sol Grassi, Eduardo Ghisi Victor, Priscila Soares, Camila Tromm, Willians Cassiano Longen.

Meus sinceros agradecimentos.



*“A vontade de se preparar deve ser maior que a vontade de vencer! Vencer será consequência da boa preparação.”*

**Bernardino**



## RESUMO

**Introdução:** A obesidade tem sido estudada como uma doença metabólica e inflamatória e é caracterizada pelo aumento da produção de mediadores pro-inflamatórios pelo tecido adiposo. Para elucidar os efeitos dos componentes de uma dieta natural nas consequências inflamatórias e metabólicas da obesidade, foram examinados os efeitos do suco de acerola verde, madura e suco de acerola industrial (*Malpighia emarginata* DC) sobre proteínas relevantes na resposta inflamatória e envolvidas no processo da lipólise no tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida por dieta. **Materiais/Métodos:** Dois grupos de camundongos suíços foram alimentados com uma dieta padrão (DP) ou dieta cafeteria (DC) por 13 semanas. Posteriormente os animais alimentados com DC foram divididos em cinco subgrupos, onde cada um deles recebeu suplementos diferentes por mais um mês (água, suco de acerola verde, suco de acerola madura, suco de acerola industrial ou vitamina C) por gavagem. Ensaio de imunoensaio, *Western Bolt*, colorimetria e histológico foram utilizados. **Resultados:** O grupo DC água (controle obeso) apresentou aumento significativo no índice de adiposidade e concentrações de triacilgliceróis. Adicionalmente, reduziu a relação IL-10/TNF- $\alpha$  no tecido adiposo, em comparação com o grupo controle magro. Em contraste, os grupos que ingeriram suco de acerola e vitamina C reduziram o ganho de peso e as concentrações de TAG, e aumentou a relação IL-10/TNF- $\alpha$  no tecido adiposo. Além disso, o grupo ingeriu suco de acerola reduziu a fosforilação da proteína JNK, e aumentou a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e HSL<sup>ser660</sup> no tecido adiposo. **Conclusões:** Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o suco de acerola promove redução do quadro inflamatório de baixo grau e melhora os distúrbios metabólicos associados à obesidade, em especial na via lipolítica.

**Palavras-chave:** dieta de cafeteria, *Malpighia emarginata* DC, tecido adiposo, Inflamação, lipólise.





## ABSTRACT

**Objective:** To elucidate the effects of natural dietary components on the inflammatory and metabolic consequences of obesity, we examined the effects of unripe, ripe and industrial acerola juice (*Malpighia emarginata* DC.) on inflammatory and metabolic control in the adipose tissue of cafeteria diet-induced obesity. **Materials/methods:** Therefore, two groups of male Swiss mice were fed on a standard diet (STA) or a cafeteria diet (CAF) for 13 weeks. Afterwards, CAF-fed animals were divided into five subgroups, of which each group received a different supplement for one further month (water, unripe acerola juice, ripe acerola juice, industrial acerola juice, or vitamin C) by gavage. Enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, colorimetric method and histology were utilized as materials and methods. **Results:** The CAF water (control obese) group showed a significant increase in adiposity index, and triacylglycerol levels, reduced IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in adipose tissue when compared with control lean group. On the other hand, acerola juice intake blunted the weight gain, reducing the TAG levels, and increasing IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in adipose tissue. In addition, reduced phosphorylation of adipose tissue JNK, NF $\kappa$ Bp65 and FAS expression and increasing the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ , HSLser660, the expression of PeriA, and ATGL. **Conclusion:** Together, these results suggest deregulation in the inflammatory and metabolic control in obese mice, but the use of acerola juice reduces low-grade obesity-associated inflammation and deregulation of metabolism.

**Key words:** cafeteria diet DC; *Malpighia emarginata*.; inflammation, metabolismo..



## LISTA DE ABREVIATURAS

**DP:** dieta padrão

**DC:** dieta de cafeteria

**DC+SAI:** dieta cafeteria e suco de acerola industrial

**DC+SAV:** dieta cafeteria e suco de acerola verde

**DC+SAM:** dieta cafeteria e suco de acerola madura

**DC+Vit.C:** dieta cafeteria e vitamina C

**LHS:** lipase hormônio sensível

**IL-6:** interleucina 6

**IL-10:** interleucina 10

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**NF- $\kappa$ B:** fator nuclear *kappa* B

**TLR4:** Receptor do tipo *Toll* 4

**ACC:** acetil CoA Carboxilase

**JNK:** janus quinase

**I $\kappa$ B:** inibidor *kappa* B

**ATGL:** lipase da gotícula lipídica

**FAS:** ácido graxo sintase

**AMPK:** proteína quinase ativada por AMP

**ABHD5/CGI-58:** *Abhydrolase Domain Containing 5*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 GERAL .....	28
2.2 ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	29
3.2. AMOSTRA .....	29
3.3. CÁLCULO E PREPARO DA AMOSTRA .....	30
3.4. DIETAS.....	30
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> .....	31
<b>3.5.1</b> Peso Corporal e parâmetros plasmáticos .....	<b>31</b>
<b>3.5.2</b> Homogeneização dos tecidos.....	<b>31</b>
<b>3.5.3</b> Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado .....	<b>32</b>
<b>3.5.4</b> Técnica de Western blotting;.....	<b>32</b>
<b>3.5.5</b> Extração dos tecidos para Western Blotting.....	<b>33</b>
<b>3.5.6</b> Diluições e anticorpos utilizados no Western Blotting .....	<b>33</b>
3.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	34
<b>3.6.1</b> Obtenção e processamento do tecido .....	<b>34</b>
<b>3.6.2</b> Desparafinização/Hidratação .....	<b>34</b>
<b>3.6.3</b> Reação de histoquímica .....	<b>34</b>
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>ANEXO(S)</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO A - PARECER CEUA</b> .....	<b>54</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade ou sobrepeso ocorrem quando há um balanço energético positivo, em que o acúmulo de energia excede o gasto de energia durante um tempo prolongado, levando ao aumento de massa corporal, principalmente o acúmulo de gordura subcutânea e visceral (Fair e Montgomery, 2009).

A obesidade é um problema de saúde que tem aumentado a preocupação em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a obesidade como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo, com o índice de massa corporal (IMC) de  $30 \text{ kg/m}^2$  ou superior, e está significativamente associada com o aumento da predisposição para todas as causas específicas ou não de morbidade e mortalidade (WHO, 2011).

A OMS estima que existam atualmente mais de 1,6 bilhões de adultos acima do peso e pelo menos 400 milhões desses são obesos. Além disso, eles preveem que até 2015 cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos. Sabe-se também que 65% da população mundial vivem em países onde o sobrepeso e a obesidade apresenta maior índice de mortalidade quando comparado ao baixo peso. Outro dado preocupante é que em média 43 milhões de crianças abaixo dos cinco anos estavam acima do peso em 2010 (WHO, 2011). Assim, a obesidade está adquirindo as características de uma autêntica pandemia, sendo reconhecida como um dos principais problemas de saúde global, resultando em um número estimado de 300.000 mortes anuais (Allison et al., 1999) e US\$ 100 bilhões por ano em despesas médicas somente nos Estados Unidos (Colditz e Wolf, 1998).

No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstrou que em todas as regiões do país, faixas etárias e de renda, aumentou contínua e substancialmente o percentual de pessoas com excesso de peso e obesas. O sobrepeso atinge mais de 30% das crianças entre 5 e 9 anos de idade, cerca de 20% da população entre 10 e 19 anos e 48% das mulheres e 50,1% dos homens acima dos 20 anos. Entre os 20% dos indivíduos mais ricos, o excesso de peso chega a 61,8% na população com mais de 20 anos. Também nesse grupo concentra-se o maior percentual de obesos, cerca de 16,9% (IBGE, 2011).

Além disso, a obesidade está associada a um estado de inflamação crônica no tecido adiposo, bem como em outros órgãos, onde infiltrantes teciduais como monócitos e macrófagos aumentam em número e em atividade (Alfadda e Sallam, 2012). Vários mediadores

ativos, moléculas quimiotáticas, citocinas e adipocinas aumentam o estado inflamatório crônico e resultam na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao estresse oxidativo sistêmico. Isto é considerado um mecanismo potencial, ligando a obesidade às anomalias vasculares e ao elevado risco de aterosclerose (Alfadda e Sallam, 2012).

Uma das principais fontes de ERO nestas situações acredita-se ser a atividade da enzima dinucleótido fosfato de nicotinamida e adenina oxidase (Nox) um complexo multiprotéico, que é expresso tanto em fagócitos como em células endoteliais, elevando a expressão de receptores do tipo Toll (TLR) nos tecidos vasculares e nos adipócitos. TLR4 um receptor para a endotoxina de lipopolissacarídeos (LPS) e de lipídeos, é expresso em vários componentes celulares, incluindo o fígado, o tecido adiposo, o músculo esquelético, o tecido vascular, as células pancreáticas do tipo  $\beta$ , e sistema nervoso central (Kim et al., 2008). Suas consequências de sinalização intracelular induzem a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6), bem como de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF-kB), que regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, na proliferação e sobrevivência celular (Chen e Stinnett, 2008).

Uma possível via de sinalização da ativação do NF-kB por ERO em macrófagos estimulados por LPS é a ligação de LPS ao TLR4, desencadeando a ativação de Nox gerando ânion superóxido extracelular, que se converte em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  extracelular atravessa as membranas citoplasmáticas de células vizinhas e se acumula no interior das células, ativando o NF-kB (Kim et al., 2008; Dalmas et al., 2011). Portanto, a indução de Nox eleva a expressão e sinalização de TLR4, o que poderia estar envolvido na inflamação desencadeada pela obesidade e resistência à insulina (Chen e Stinnett, 2008). Assim, substâncias conhecidas como antioxidantes, responsáveis pela inibição ou eliminação da geração e acúmulo de ERO intracelular por Nox, diminuem a ativação e a expressão do gene inflamatório NF-kB. Desse modo, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos podem ser úteis para diminuir problemas causados pelo estresse oxidativo e inflamação crônica existentes na obesidade.

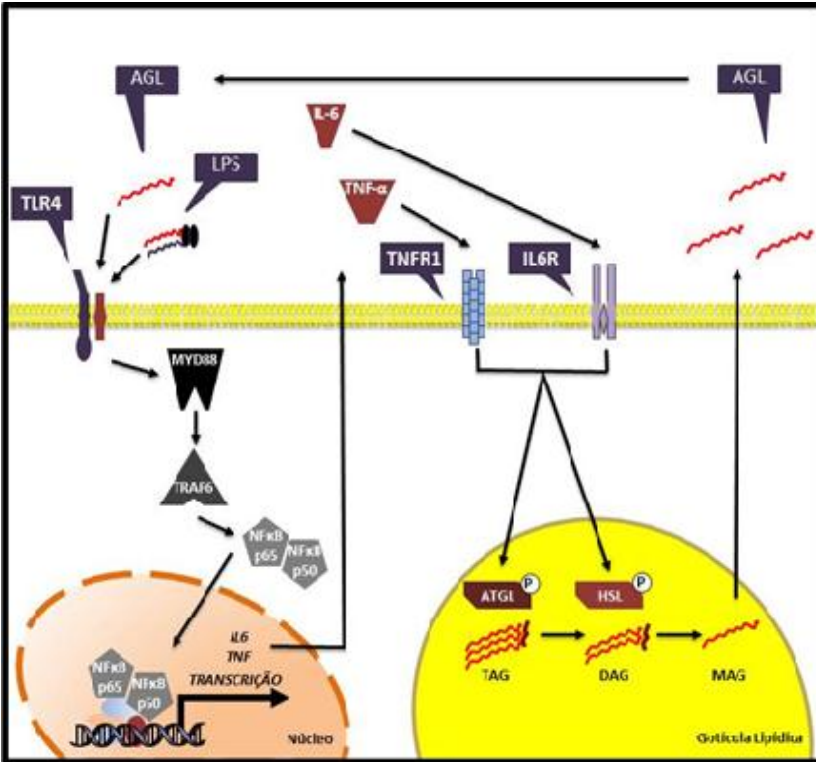
O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para



sintetizar ácidos graxos (Lipogênese) e estocar TAG em períodos em que a oferta de energia é abundante, mobilizando os estoques de TAG, no processo de lipólise quando há déficit calórico. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (Ahima e Flier, 2000).

A instalação do quadro inflamatório crônico em sujeitos obesos esta intimamente relacionada com modulação na plasticidade do tecido adiposo, contribuindo para a regulação da lipogênese (processo de armazenamento de ácidos graxos) e lipólise (mobilização dos estoques de ácidos graxos) (Fonseca et al., 2006). Um grande número de adipocinas pró-inflamatórias induz lipólise, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e a família do interferon (Feingold, et al., 1992). Em 2005, (Suganami et al.) mostraram que os ácidos graxos hidrolizados pela lipólise mediados por monócitos infiltrados no tecido adiposo, criando uma íntima relação parácrina entre lipólise e inflamação. No entanto, vários membros de receptores do tipo Toll (TLR) são expressos em adipócitos e reconhecem ácidos graxos livres como ligantes e induz a produção de adipocinas pró-inflamatórias (Quadro 1).

**Quadro 1.** Ciclo vicioso “imuno-metabólico” no tecido adiposo de animais obesos.



Fonte: Exercise training as treatment in cancer cachexia. Lira et al., 2013

Em obesos (independente do modo que os resultados são expressos, por célula ou por unidade de peso de tecido adiposo), a taxa basal da lipólise está aumentada quando comparada a indivíduos eutróficos (Arner, 1998), entretanto, a taxa estimulada de lipólise apresenta uma resposta diminuída (porcentagem de aumento) à ação da adrenalina (Large et al., 1999). Uma resistência à lipólise, é atribuída a uma expressão diminuída do receptor adrenérgico beta 2 (Reynisdottir et al., 1994), à um aumento do receptor adrenérgico alfa 2 (Mauriège et al., 1991).

Neste ciclo, lipólise e lipogênese, existem algumas proteínas reguladoras desse processo, uma resistência à lipólise é caracterizada também a uma diminuição da expressão da lipase sensível a hormônio (LSH) (Large et al., 1999). Uma diminuição da expressão da LSH

(Large et al., 1999), talvez seja o fator mais importante para explicar esta resistência à ação da adrenalina, pois uma deficiência na LSH é observada já em indivíduos com sobrepeso (Hellström et al., 1996) e também por existir uma relação positiva entre capacidade lipolítica e expressão da LSH nas células adiposas do tecido adiposo de humanos (Large et al., 1998).

Outra proteína que está presente nesse processo de lipólise é a Lipase da gotícula lipídica (ATGL: *adipose triglyceride lipase*). LSH e ATGL são as principais enzimas de taxa determinante do catabolismo do TG em adipócitos, apesar da contribuição relativa destas lipases em lipólise basal e estimulada ainda ser controversa (Zimmermann et al., 2004; Langin et al., 2005; Schweiger et al., 2006).

Junto o ATGL e HSL, outra proteína muito importante no processo de lipólise é a Perilipina (PERI). Perilipina é uma proteína no controle da lipólise, estudo prévio evidenciou a capacidade da PERI A de regular a ação lipolítica da LSH, isto se deve pelo fato da perilipina está presente na membrana da gotícula lipídica do adipócito,perilipina desempenha um papel importante na mobilização de gordura, uma vez que atua como uma camada de proteção contra a ação de lípases, tais como ATGL e HSL, que hidrolisam os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, no processo de lipólise (Wang et al., 2003).

A lipogênese é a síntese de ácidos graxos no organismo a partir da acetil CoA. Schwarz e colaboradores (2003) demonstraram que indivíduos obesos hiperinsulinêmicos alimentados com dieta de alto teor em gordura e baixo em carboidrato apresentaram maior lipogênese de novo quando comparados a indivíduos magros ou obesos normoinsulinêmicos. Existem duas hipóteses para este fenômeno. A primeira é que lipogênese de novo é o resultado de reduzida recaptação de glicose pelos tecidos extra-hepáticos, o que conduz a aumento de reserva e da disponibilidade glicídicas para o metabolismo hepático. Além disso, precursores gliconeogênicos, estão aumentados com a resistência à insulina (Felig et al., 1978; Reaven et al., 1998; Zawadzki et al., 1988). A segunda hipótese é de que a hiperinsulinêmica leva a um aumento da lipogênese de novo em indivíduos obesos. Este mecanismo é controlado por um fator de transcrição chamado SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol) que permanecem sensíveis à insulina levando a um aumento do RNA mensageiro para importantes enzimas lipogênicas, tais como a esteril-Coa desaturase (SCD1), enzima málica, ACC, e FAS. Portanto, as concentrações aumentadas de insulina presentes na resistência à insulina exacerbam a ativação de SREBP-1c resultando no aumento da lipogênese.

Em virtude da obesidade induzida pela dieta, diferentes estratégias são exploradas na tentativa de prevenir e combater a obesidade, conseqüentemente, inibir as alterações sobre a plasticidade e o metabolismo do tecido adiposo, um dos ajustes é a busca da população em geral por alimentos alternativos, como frutas e vegetais (Thaler e Schwartz, 2010). Vegetais e frutas são fontes ricas em variedades de nutrientes, incluindo vitaminas, microminerais, fibras, e compostos bioativos (Lampe, 1999), representados principalmente pelos polifenóis, sendo estes a família mais relevante de fitoquímicos com potenciais benefícios para a saúde, incluindo anti-diabéticos, anti-obesidade, anti-oxidante, anti-carcinogênico e anti-inflamatórios (Devalaraja et al., 2011).

Frente esta questão, uma fruta que vem ganhando destaque por suas propriedades antioxidantes é a acerola (*Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L., *Malpighia emarginata* DC.) (De Assis et al., 2009). A acerola (*M.emarginata*), tem despertado muito interesse nos últimos anos devido aos potenciais benefícios à saúde associados com a sua capacidade antioxidante por conter altos níveis de polifenóis, carotenóides e principalmente maior acúmulo de ácido ascórbico.

*Malpighia emarginata* DC., popularmente conhecida por ‘acerola’ ou ‘cereja-das-antilhas’, é originária da América Central e vem sendo cultivada em zonas de clima tropical e subtropical (Oliveira et al., 2012). Até recentemente a planta vinha sendo conhecida pelo sinônimo *M. glabra* e *M. puniceifolia*, mas um trabalho taxonômico mais recente resultou na aceitação de *M. emarginata* como o nome científico atual para esta planta (Liu et al., 2013). O fruto da aceroleira é uma baga drupácea que apresenta três sementes, cada uma envolvida por um endocarpo reticulado e trilobado (Almeida et al., 2002).

A acerola é muito utilizada popularmente pela sua ação adstringente, vitamínica, antianêmica, nutritiva e antifúngica (Nunes, 2011). Esta fruta, devido ao seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C, que é mais facilmente absorvida pelo organismo humano em comparação com o ácido ascórbico sintético (Bicas et al., 2011) e à sua grande capacidade de aproveitamento industrial tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (Nogueira et al., 2005), fazendo deste país o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo (Carvalho, 2000).

A fruta acerola *in natura* e o suco de acerola não processado também contém macro e micronutrientes como proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido

pantotênico, niacina e retinol) (Mesquita e Vigoa, 2000; Mezadri et al., 2006). Além disso, a parte comestível da acerola também apresenta minerais como Ca, Fósforo (P), K, Mg, Na, Cloro (Cl), Enxofre (S), Mn, Zn, Fe, Cu, Níquel (Ni), Cromo (Cr) (Leterme et al., 2006).

A acerola muda de tonalidade com a maturação, passando do verde ao amarelo, laranja, vermelho ou roxo (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2003) devido, sobretudo, à degradação da clorofila e à síntese de flavonóides, como antocianinas e carotenóides (Musser et al., 2004). A sua composição química, inclusive a distribuição de componentes nutricionais e fitoquímicos, é dependente das variedades, das condições de cultivo tais como fertilidade do solo e pH, irrigação, ocorrência de pragas e doenças e das variações climáticas e sazonais e, também, do estágio de maturação do fruto (Vendramini e Trugo, 2000; Hofman et al., 2002; Alfaia et al., 2003; Nogueira et al., 2005; Kawaguchi et al., 2007).

A acerola pode ser considerada como um fruto tropical de grande potencial econômico e nutricional, uma vez que pode ser usada para preparar diferentes produtos industrializados, como sorvete, gelatina, sucos, refrigerantes, néctar, geleias, goma, frutas em conserva, nutracêuticos e iogurtes (Bicas et al., 2011).

Resultados relatados por Sampaio et al., (2009) e Rufino et al., (2010) utilizando metodologias como: DPPH peroxidação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), capacidade de remoção de radical orgânico 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e capacidade de redução de metal - poder antioxidante de redução férrica (PARF) demonstraram uma considerável capacidade antioxidante da acerola, vitamina C, antocianinas, flavonóides amarelos, carotenóides totais e polifenóis totais extraídos desta fruta.

Estudos recentes demonstram que, devido a este potencial antioxidante apresentado pelos fitoquímicos vitamina C, quercetina e rutina, a acerola também possui atividade antígeno-tóxica, protegendo o material genético de efeitos nocivos causados pelo estresse oxidativo (Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2013). Além disso, Wakabayashi et al., (2003) investigaram o possível efeito do extrato de acerola sobre a produção de ON por macrófagos ativados em células Raw 264.7 de ratos. O extrato demonstrou uma alta atividade inibitória da produção de ON e as análises por *Western blot* demonstraram que o extrato de acerola reduziu a concentração intracelular de ON sintase induzida (iNOS) em cerca de um terço.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Considerando que o consumo de dietas de cafeteria direciona a um aumento exacerbado dos estoques gordura nos diferentes depósitos de tecido adiposo, alterando assim a homeostase celular, temos como objetivo examinar as possíveis alterações sobre os mecanismos que regulam a plasticidade do tecido adiposo branco (lipólise e lipogênese), e os possíveis efeitos benéficos da acerola, tendo em vista a ausência de estudos que analisem essas interferências.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

a) Avaliar o efeito da suplementação do suco de acerola sobre o peso corporal total, gordura epididimal e concentração plasmática de triacilglicerol de camundongos alimentados com dieta de cafeteria;

b) Avaliar os efeitos da suplementação do suco de acerola sobre a via inflamatória no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria;

c) Avaliar os efeitos da suplementação do suco de acerola sobre a via da lipólise no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria;

d) Avaliar os efeitos da suplementação do suco de acerola sobre a via da lipogênese no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria;

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram alojados em caixas de polietileno, com livre acesso a comida padrão e/ou cafeteria e água e foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os animais do grupo dieta cafeteria e os seus demais subgrupos foram mantidos em uma sala isolada dos demais grupos de tratamento, sendo mantidos no mesmo biotério com as condições de aclimação especificadas acima, essa alimentação foi ofertada e controlada por um aluno bolsista responsável pela condução de todo o experimento. Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESC, sob o número 103/2011 e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

#### 3.2. AMOSTRA

Foram utilizados 72 camundongos albinos Swiss machos jovens, divididos em dois grupos: grupo controle (12 animais) alimentado com a dieta padrão (DP) e outro grupo (60 animais) alimentado com a dieta cafeteria mais a dieta padrão (DC). Os animais do segundo grupo foram alimentados com a dieta cafeteria por 13 semanas. Estes, após as 13 semanas, foram divididos em cinco subgrupos (24 animais/grupo) que receberam os seguintes tratamentos: camundongos tratados com veículo água (DC), camundongos tratados com suco de acerola verde (DC + SAV), camundongos tratados com suco de acerola maduro (DC + SAM), camundongos tratados com ácido ascórbico (DC + Vit.C) ou camundongos tratados com suco de acerola industrial (DC + SAI), por via oral diariamente. Após 10 dias de cada um dos diferentes tratamentos (DP, DC, DC+SAV, DC+SAM, DC+SAI ou DC+ Vit.C), 12 animais por cada grupo sofreram eutanásia por decapitação (tratamento curto) e os outros animais foram alimentados por mais vinte dias (tratamento longo) e então sofreram eutanásia da guilhotina. Após os tratamentos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina. Todo modelo experimental foi realizado 2 vezes, para reprodutibilidade dos resultados. O número amostral citado acima foi dividido em 2, sendo 36 animais tratados em cada ocasião.

## Quadro 2: Divisão dos grupos da pesquisa:

Grupos	
1	Grupo Controle C
2	Dieta Cafeteria (DC) DC + ÁGUA
3	Dieta Cafeteria (DC) DC + SUCO VERDE
4	Dieta Cafeteria (DC) DC + SUCO MADURO
5	Dieta Cafeteria (DC) DC + INDUSTRIAL
6	Dieta Cafeteria (DC) DC + VITAMINA C

13 semanas      4 semanas

Tratamento

Adapted by Terra et al. (2010)

Fonte: Adaptado por Terra et al (2010)

### 3.3. CÁLCULO E PREPARO DA AMOSTRA

O componente bioativo sintético, como o ácido ascórbico foi obtido da Sigma. O fruto acerola verde e maduro foram fornecidos por um produtor orgânico certificado e os seus respectivos sucos foram obtidos através do uso de um processador de alimentos, para ambos os sucos foi utilizado o volume de administração de 0,1mL/10g de peso corporal. A dose de ácido ascórbico utilizada no estudo foi de 1 mg/kg de peso corporal como descrito previamente por Franke et al., (2005). O suco de acerola industrial foi adquirido em uma rede de supermercado da região.

### 3.4. DIETAS

A alimentação balanceada dos animais consistiu na ração padrão *Nuvilab*<sup>®</sup> (composição sob as recomendações feitas pelo National Research Council e pelo National Institute of Health-USA) e água *ad libitum*.

A alimentação dieta cafeteria consistiu de alimentos hiperlipídicos e hipercalóricos como: bolacha recheada, bolacha *waffer*, salsicha, mortadela, salgadinhos do tipo *chips* e *Doritos*<sup>®</sup>, *marshmallow*, geléia de mocotó, paçoca e ração *Nuvilab*<sup>®</sup>, além de refrigerante e água *ad libitum*, disponibilizados conforme a Tabela abaixo



Tabela 1. Cardápio semanal dos animais alimentados com dieta cafeteria:

Dias da semana	Alimentos
Segunda-feira	Mortadela, <i>marshmallow</i> , chips de queijo, bolacha <i>waffer</i> , ração <i>Nuvilab</i> <sup>®</sup> , água e refrigerante sabor guaraná.
Terça-feira	Bolacha recheada, Doritos <sup>®</sup> , ração <i>Nuvilab</i> <sup>®</sup> , salsicha, água e refrigerante sabor cola.
Quarta-feira	Paçoca, ração <i>Nuvilab</i> <sup>®</sup> , mortadela, chips de queijo, água e refrigerante sabor guaraná.
Quinta-feira	Mortadela, bolacha <i>waffer</i> , geléia de mocotó, Doritos <sup>®</sup> , ração <i>Nuvilab</i> <sup>®</sup> , água e refrigerante sabor cola.
Sexta-feira, sábado e domingo	Bolacha recheada, ração <i>Nuvilab</i> <sup>®</sup> , salsicha, chips de bacon, <i>marshmallow</i> , água e refrigerante sabor cola.

Fonte: Adaptado de Shafat et al., (2008).

### 3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

#### 3.5.1 Peso Corporal e parâmetros plasmáticos

O registro do peso corporal foi realizado a cada 5 dias e a quantidade de alimento ingerido por caixa foi diário. Este cálculo foi feito pela diferença entre a quantidade de alimento oferecida e as sobras recolhidas, sempre no período de 24 horas, dessa forma, a ingestão calórica diária foi calculada.

Foi realizada a dosagem plasmática de triacilglicerol pelo método colorimétrico, o kit foi adquirido na empresa Labtest<sup>®</sup>. Para calcular o índice de adiposidade foram dissecados e pesados os tecidos adiposos brancos, epididimal, mesentérico e retroperitoneal, a somatórios dos três depósitos refere-se os valores do índice.

#### 3.5.2 Homogeneização dos tecidos

Imediatamente após o sacrifício, os tecidos adiposos brancos, epididimal, mesentérico e retroperitoneal, foram dissecados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para dosagens posteriores.

Durante o processo de homogeneização, o tecido adiposo epididimal foi descongelado em gelo, diluído em 1:10 em tampão de lise celular (The Cell Lysis Kit, nº 171-304012, Bio-rad; Hercules, CA, USA), contendo um cocktail com inibidores de proteases. As amostras foram processadas em duas etapas. Na primeira, os tecidos foram rompidos através suspensão e ressuspensão em pipeta com tip de 1 mL por 20 vezes, seguido por agitação orbital durante 20 minutos a 300 rpm a 4°C. No segundo passo, os tecidos foram homogeneizados em desmembrador ultrasônico (modelo 100, Fischer Scientific, Pittsburg, USA) a 4°C em três pulsos rápidos (< 1 seg. cada). Findo os dois procedimentos de homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4500 x g, durante 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante coletado armazenado a -80°C para dosagens posteriores.

### **3.5.3 Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado**

A quantificação das proteínas totais nos tecidos avaliados foi determinada através do kit Protein Assay-Bradford Method Biotechnology Grade (E535, AMRESCO, Inc. USA). Este procedimento foi baseado no método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), o qual utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, que induz alteração de cor após a ligação com as proteínas desconhecidas, através da formação de um complexo que pode ser detectado por espectrofotometria de luz em comprimento de onda a 595 nm. Os valores da proteína desconhecida foram então comparados com a curva padrão de albumina (0,05 – 0,5 µg / µL).

As amostras (diluídas em 100 vezes) e os pontos da curva foram plaqueados em triplicatas, com 10 µL por poço. Após este procedimento, acrescentou-se 190 µL de Coomassie Brilliant Blue G-250, diluído em 10 vezes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi) a 595 nm. Os dados de absorbância (eixo x) foram plotados junto aos valores referentes às diferentes concentrações da curva-padrão (eixo y), e após a elaboração da curva da reta (regressão linear), os valores foram expressos em µg / µL de proteína tecidual (Bradford, 1976).

### **3.5.4 Técnica de Western blotting;**

Western blotting – pJNK, pIkB $\alpha$ , NF-kBp65, TLR4, pAMPK, pHSL<sup>serina 563</sup>, HSL<sup>serina660</sup>, ATGL, CGI-58, Perilipina A, pACC

### 3.5.5 Extração dos tecidos para Western Blotting

O tecido adiposo branco, epididimal foi colocado em 1,0 ml de tampão específico, preparado e aquecido no dia do experimento, para extratos totais tendo a seguinte composição: Trizma base 100 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM. O tecido foi rapidamente homogeneizado no gelo, utilizando o aparelho POLYTRON. Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado. A determinação do conteúdo total de proteínas no homogenato foi realizada pelo método de Bradford, como já descrito anteriormente.

As amostras foram adicionadas ao tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,01%, fosfato de sódio 50mM, glicerol 25%, SDS 1%) na proporção de 1:1, contendo 200mM de DTT. O volume de 70µg de proteína foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 2 horas à temperatura ambiente. Após a transferência a membrana foi bloqueada a noite inteira em 15 ml de solução bloqueadora, composta de solução basal (Trizma base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20, 50 µl/ml) contendo 1%BSA e azida sódica 0.02%. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário específico por 2 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo dissolvido em solução basal com azida sódica 0,02% e BSA 1%. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpo secundário associado a peroxidase. O anticorpo secundário foi sempre de uma anti-imunoglobulina dirigida contra o animal produtor de anticorpo primário. A membrana foi revelada por quimioluminescência após adição do reagente de revelação (ECL da Amersham) e exposta a filme de raio X.

### 3.5.6 Diluições e anticorpos utilizados no Western Blotting

Os anticorpos primários para pJNK, pIκBα, NF-kBp65, TLR4, pAMPK, pHSL<sup>serina563</sup>, HSL<sup>serina660</sup>, ATGL, CGI-58, Perilipina A, pACC foram adquiridos da empresa Santa Cruz biotechnology e Cell signaling. Esses anticorpos foram produzidos em coelho. Foi utilizada a diluição 1:1000 dos anticorpos primários e 1:5000 do anticorpo secundário (Sigma-Aldrich) contra coelho.

## 3.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

### 3.6.1 Obtenção e processamento do tecido

Os fragmentos do tecido adiposo epididimal foram lavados em água corrente por meia hora e submetidos ao processamento, durante o qual foram desidratados com concentração crescente de álcool; diafanizados com banhos de xilol, e incluídos em paraplax (Paraplax X-tra, SEM). Foram então emblocados em Tissue Cassetes (Fisher Scientific) e cortados em micrótomo rotatório (R Jung-Heidelberg). Os cortes de 5µm de espessura foram estendidos em lâminas previamente cobertas com polilisina (Sigma).

### 3.6.2 Desparafinização/Hidratação

Os cortes foram desparafinizados com sucessivos banhos de xilol (3 banhos de 1 hora, meia hora e 20 minutos, respectivamente), hidratados em concentrações decrescentes de álcool (2 x 100%, 1 x 95% e 1 x 70%) e lavados em água filtrada e destilada.

### 3.6.3 Reação de histoquímica

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (Gamble 2008), e o tamanho dos adipócitos foram determinados pelo programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), foi analisado a área, diâmetros médio, perímetro, comprimento e largura dos adipócitos. As imagens foram fotografadas com auxílio de uma câmara 3CCD (MTI) acoplada a um Powers Macintosh G3.

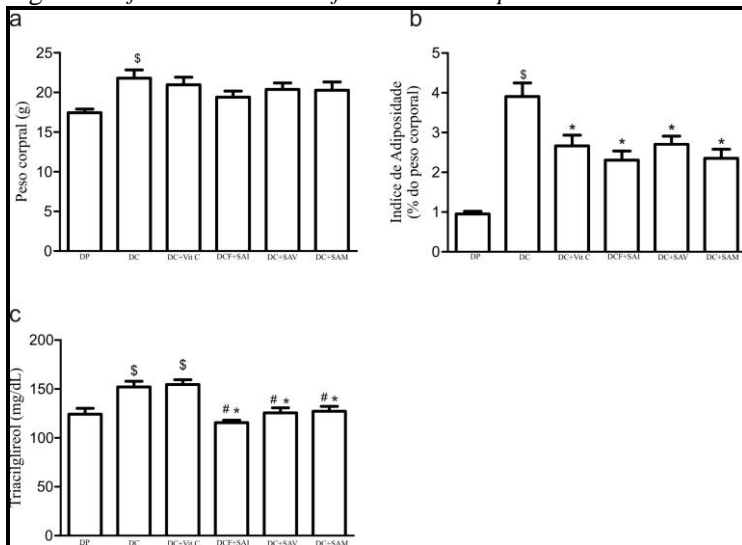
## 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism (versão 5.00). A média aritmética e o erro padrão da média (EPM) foram calculados para todas as variáveis estudadas. Após o período experimental, os valores dos grupos dieta padrão (DP) e dieta cafeiteira (DC) foram analisados por teste t de student não pareado. Para análises dos valores dos grupos obesos (DC, DC + SAI, DC + SAM, DC + VIT C ou DC + SAV) foram realizados pela análise de variância (ANOVA) a um fator (suplemento). Quando o valor de F exibiu diferença significativa detectado pela ANOVA a 1 fator o pós teste de Tukey foi aplicado para a múltipla comparação entre as médias dos grupos

avaliados. O nível de significância utilizado em todas as análises foi inferior a 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Figura 1: Efeitos da dieta de cafeteria sobre os parâmetros metabólicos:



Fonte: Elaborado pelo autor.

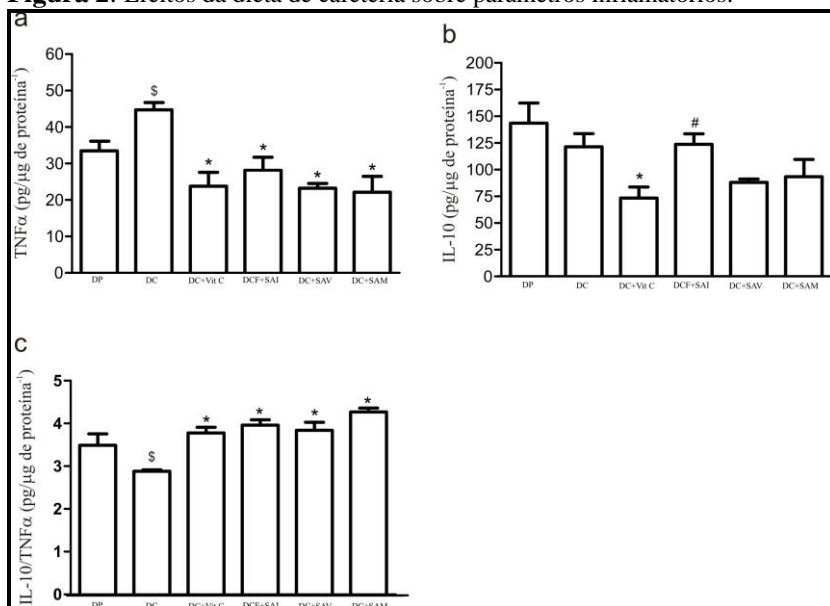
Figura 1: Efeitos da dieta de cafeteria sobre os parâmetros metabólicos: Análise do peso corporal (g) (a) índice de adiposidade (% do peso corporal) (b) e TAG (mg/dL) (c) de camundongos alimentados com dieta padrão (DP), cafeteria dieta (DC), dieta de cafeteria com vitamina C (DC+Vit.C), dieta de cafeteria com suco de acerola industrial (DC+SAI), dieta de cafeteria com suco de acerola verde (DC+SAV) e dieta de cafeteria com suco de acerola madura (DC+SAM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 6 por grupo). <sup>\$</sup>p <0,05 em comparação com grupo DP; <sup>\*</sup>p <0,05 em relação ao grupo DC; <sup>#</sup>p <0,05 em comparação com grupo DC+Vit.C.

Peso corporal, índice de adiposidade e concentrações de TAG.

Primeiramente, avaliamos o efeito da dieta de cafeteria sobre o peso corporal dos camundongos. A DC promoveu aumento do peso do corpo quando comparado com o grupo dieta padrão. Entretanto, o tratamento com suco de acerola não foi eficiente em reduzir este parâmetro (Figura 1a). No entanto, quando avaliado o índice de adiposidade, observamos resultados interessantes. A DC aumentou significativamente o índice de adiposidade quando comparado com o

grupo DP, enquanto os diferentes tratamentos com suco de acerola ou Vitamina C exibiram redução no índice de adiposidade quando comparado com grupo DC (Figura 1b). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes formas do suco de acerola para este parâmetro. Na tentativa de observar se o tratamento induziu aumento da lipólise, avaliamos as concentrações de triacilglicerol plasmática. As concentrações de TAG foram aumentados DC e DC+Vit.C quando comparado com o grupo DP. No entanto, as concentrações de TAG nos grupos DC+SAI, DC+SAM e DC+SAV foram reduzidas quando comparados com os grupos DC e DC+Vit.C (Figura 1c).

**Figura 2:** Efeitos da dieta de cafeteria sobre parâmetros inflamatórios:



Fonte: Elaborado pelo autor.

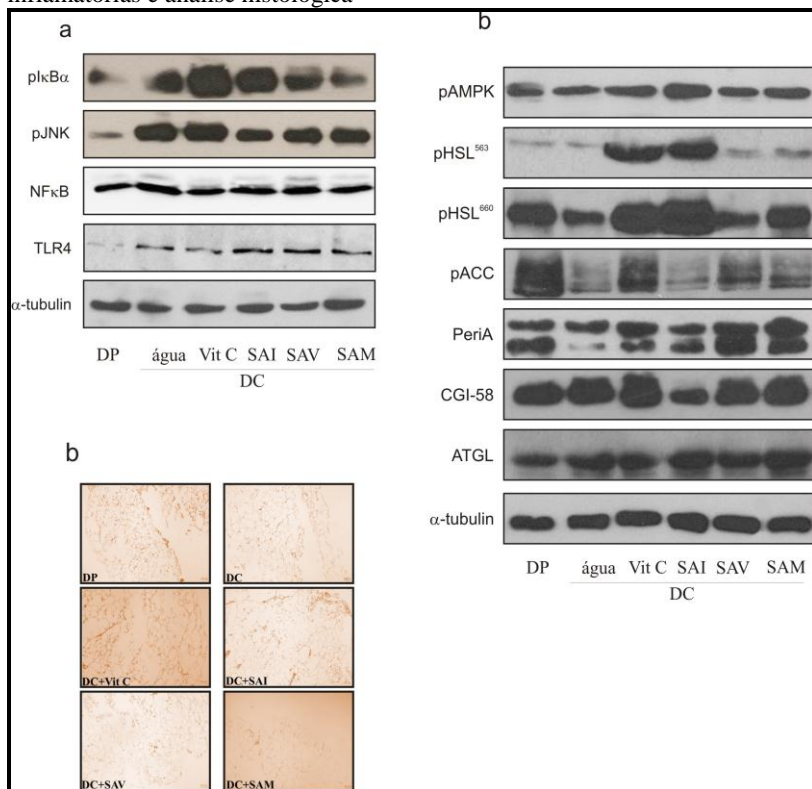
**Figura 2:** Efeitos da dieta de cafeteria sobre parâmetros inflamatórios: TNF- $\alpha$  (pg/ $\mu$ g proteína<sup>-1</sup>) (a) IL-10 (pg/ $\mu$ g proteína<sup>-1</sup>) (b) relação IL-10/TNF- $\alpha$  (c) de camundongos alimentados com dieta padrão (DP), cafeteria dieta (DC), dieta de cafeteria com vitamina C (DC+Vit.C), dieta de cafeteria com suco de acerola industrial (DC+SAI), dieta de cafeteria com suco de acerola verde (DC+SAV) e dieta de cafeteria com suco de acerola madura (DC+SAM). Os

resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$  por grupo).  $^{\$}p < 0,05$  em comparação com grupo DP;  $^*p < 0,05$  em relação ao grupo DC;  $^{\#}p < 0,05$  em comparação com grupo DC+Vit.C.

Como observamos redução nos valores do índice de adiposidade, levantamos a hipótese de que o conteúdo de adipocinas poderia diminuir com tratamento com suco de acerola. Acerca disto, realizamos as dosagens de TNF- $\alpha$ , IL-10, e a relação IL-10/TNF- $\alpha$  no tecido adiposo epididimal dos diferentes grupos. Observamos que o conteúdo de TNF- $\alpha$  foi aumentado no grupo DC quando comparado com o grupo DP, mas o conteúdo de TNF- $\alpha$  foi reduzido em todos os grupos tratados com suco de acerola e Vitamina C quando comparados com o grupo DC. Não foi observada nenhuma diferença no conteúdo de TNF- $\alpha$  entre os grupos tratados (Figura 2a). Quando analisados o conteúdo de IL-10 (uma importante adipocina anti-inflamatório), observou-se que a IL-10 não exibiu diferenças entre o grupo DC e o grupo DP, mas o conteúdo de IL-10 foi reduzido no grupo DC+Vit.C quando comparado com o grupo DC. Adicionalmente, o conteúdo de IL-10 aumentou no grupo DC+SAI quando comparado com a DC+Vit.C (Figura 2b). A relação IL-10/TNF- $\alpha$  tem sido considerada um marcador do estado inflamatório. Desta forma, calculamos a relação IL-10/TNF- $\alpha$ . Observamos que a relação IL-10/TNF- $\alpha$  foi reduzida no grupo DC quando comparado com o grupo DP. No entanto, a relação IL-10/TNF- $\alpha$  foi superior nos grupos DC+Vit.C, DC+SAI, DC+SAV e DC+SAM quando comparado com o grupo DC (Figura. 2c).



**Figura 3.** Efeitos da dieta de cafeteria sobre moléculas lipolíticas, lipogênicas, inflamatórias e análise histológica



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 3:** Efeitos da dieta de cafeteria sobre moléculas lipolíticas, lipogênicas, inflamatórias e análise histológica. A marcação da fosforilação da pIκB, pJNK, NF-κB e TLR4 (a) AMPK<sup>Thr172</sup>, HSL<sup>Ser563</sup>, HSL<sup>Ser660</sup>, ACC<sup>Ser79</sup> e marcação proteína da Peri A, CGI-58, ATGL (b), hematoxilina e eosina (c) no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta padrão (DP), cafeteria dieta (DC), dieta de cafeteria com vitamina C (DC+Vit.C), dieta de cafeteria com suco de acerola industrial (DC+SAI), dieta de cafeteria com suco de acerola verde (DC+SAV) e dieta de cafeteria com suco de acerola madura (DC+SAM). n = 6 por grupo.

Após análise dos parâmetros referentes à composição corporal e o estado inflamatório, investigamos por método de western blotting

moléculas envolvidas com a transdução de sinal da cascata inflamatória (pI $\kappa$ -B $\alpha$ , pJNK, NF- $\kappa$ Bp65, TLR). Observamos marcação reduzida para pI $\kappa$ -B $\alpha$  em ambos grupos DC+SAV e DC+SAM, resultado que acompanha o comportamento do conteúdo de TNF- $\alpha$  e a relação IL-10/TNF- $\alpha$ . Além disso, a marcação da proteína pJNK foi reduzida nos grupos DC+SAI, DC+SAV, DC+SAM (Figura. 3a). Não observamos nenhuma diferença entre os grupos para marcação do NF- $\kappa$ Bp65 e do TLR4 (Figura. 3a). Nosso próximo passo foi avaliar as enzimas lipolíticas e lipogênicas. Os resultados demonstraram maior fosforilação da HSL<sup>serina563</sup> e HSL<sup>serina660</sup> nos grupos DC+Vit.C, DC+SAI, sugerindo aumento da atividade lipolítica nesses grupos. O aumento da fosforilação da HSL nesses grupos foram acompanhados pela redução na marcação da enzima pACC (Figura. 3b).

Finalmente, com objetivo de analisar a morfologia do tecido adiposo, realizamos análise histológica do tecido adiposo epididimal e aplicamos coloração de hematoxilina e eosina (HE). O resultado indicou que, pelo menos em parte, todos os grupos de dieta de cafeteria mostrou aumento da área de adipócitos, quando comparado com o grupo DP.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos que a ingestão de suco de acerola diminuiu o conteúdo de TNF- $\alpha$  e promoveu aumento da lipólise, em camundongos alimentados com dieta de cafeteria. Adicionalmente, os resultados demonstraram que o consumo de suco de acerola promoveu um menor ganho de peso, índice de adiposidade em comparação com os camundongos não tratados, e restaurou as concentrações de TAG similar do grupo controle dieta padrão. Além disso, especulamos, que o consumo do suco de acerola promoveu aumento na via lipolítica (principalmente, a fosforilação da HSL), e aumento da fosforilação da proteína I $\kappa$ B- $\alpha$ .

O metabolismo e a plasticidade do tecido adiposo branco são extremamente complexos. Numerosos efetores lipolíticos e anti-lipolíticos controlar o catabolismo e armazenamento de lipídeos em vários tecidos. Estes incluem hormônios, citocinas e adipocinas. Desde 1992, foi estudada a relação entre a inflamação e a lipólise, pois verificaram que adipocinas pró-inflamatórias promoviam lipólise, principalmente, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Feingold et al., 1992). Nós avaliamos a fosforilação em dois resíduos de serina da HSL (563 e 660). Observamos que, principalmente a fosforilação da HSL<sup>Ser660</sup> e a marcação da Perilipina A foram reduzidas no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, e quando os camundongos ingeriram suco de acerola, a fosforilação HSL<sup>Ser660</sup> e Perilipina A aumentaram. Os resultados podem ser, pelo menos em parte, responsáveis pela redução no índice de adiposidade após o tratamento com suco de acerola, quando comparado com camundongos alimentados somente com dieta de cafeteria. Além disso, observou-se aumento da fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , fato este que pode explicar a redução no conteúdo de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo, além do aumento da relação IL-10/TNF- $\alpha$  (Zamboni et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que tanto o suco de acerola (industrial, verde, maduros) e o tratamento com vitamina C direcionam para melhora do perfil imuno-metabólico no tecido adiposo de camundongos. Estes efeitos do suco de acerola observados no presente estudo podem ser atribuídos ao conteúdo de polifenóis, a vitamina C, a quercetina e rutina (Hanamura et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado redução da adiposidade em animais alimentados com dieta rica em gordura suplementados com vitamina C (Camióñ et al., 2006; García-Díaz et al., 2007) e modificações na lipólise em adipócitos induzida por catecolaminas

(Garcia-Diaz et al., 2009). Além disso, Garcia-Diaz et al., (2011) relataram que, a suplementação de vitamina C modula o estado inflamatório, e altera a interação entre adipócitos e macrófagos. No entanto, macrófagos residentes produzem catecolaminas, que estimulam o processo de lipólise no tecido adiposo branco (Nguyen et al., 2011). Este ambiente, talvez, poderia possibilitar o aumento na lipólise e, conseqüentemente, promover um *milieu* anti-inflamatório promovido pelo consumo do suco de acerola, uma vez que a IL-4, uma citocina anti-inflamatória, é necessário para ativação da lipólise através do aumento na produção de catecolaminas em macrófagos (Nguyen et al., 2011), podendo este ambiente explicar o aumento na marcação da proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  e redução do conteúdo de TNF- $\alpha$ .

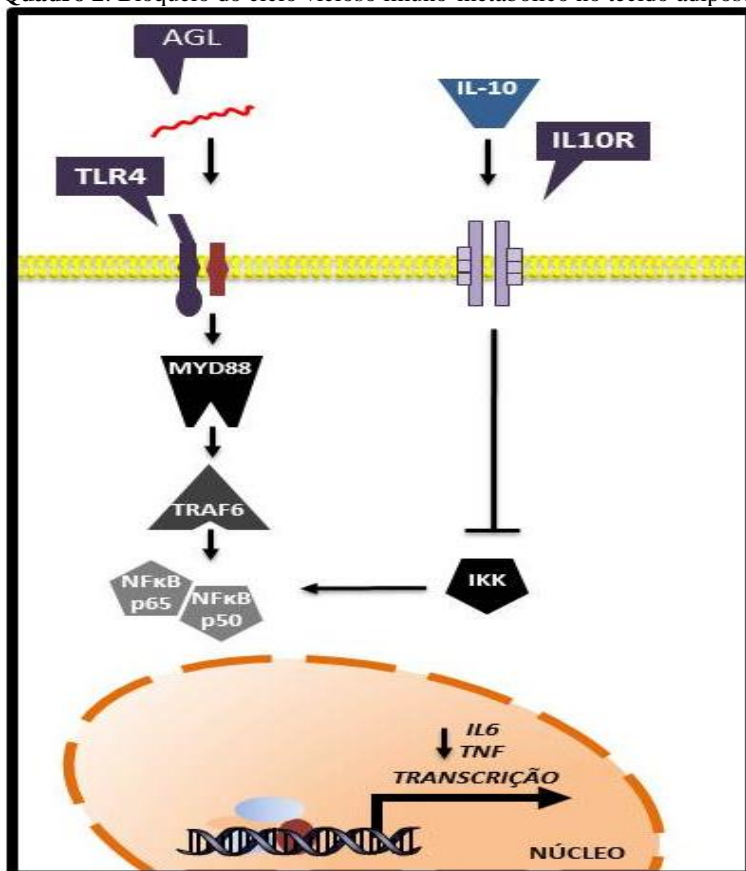
No entanto, existem outros compostos bioativos no suco de acerola, os quais podem gerar efeitos sobre o perfil imuno-metabólico. Rivera et al., (2008) relataram que a administração de quercetina promove melhora na via de sinalização da insulina, dislipidemia e hipertensão em ratos obesos da linhagem Zucker. Mais recentemente, Overman et al., (2011) relataram que a quercetina reduz a inflamação no tecido adiposo, reduzindo a infiltração de macrófagos e ativação do NF- $\kappa$ B. Em nosso estudo, observamos aumento da fosforilação da proteína I $\kappa$ B- $\alpha$ . Este resultado pode sugerir um bloqueio na ativação do NF- $\kappa$ B, conforme observado por Overman e colegas (2011).

Hsu et al., (2009) mostraram que a suplementação com rutina promoveu redução no ganho de peso corporal, e dos depósitos de tecido adiposo epididimal e perirenal em animais alimentados com dieta rica em gordura. Adicionalmente, os autores verificaram valores reduzidos para as frações lipídicas, insulina e leptina no soro dos animais suplementados com rutina. Recentemente, Gao et al., (2013) demonstraram que a rutina é capaz de melhorar o quadro de resistência à insulina no fígado, e reduziu a infiltração de macrófagos no tecido adiposo de animais alimentados com dieta rica em gordura. Nossos resultados demonstraram claramente redução das concentrações de TAG, corroborando com dados encontrados nos estudos acima citados.

O suco de acerola induz redução na absorção de glicose, conseqüentemente, reduz a elevação deste açúcar no sangue após à alimentação (Hanamura et al., 2008). A diminuição nas concentrações de glicose plasmática pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento na utilização de ácidos graxos, para manter a demanda energética, com isto o ciclo vicioso imuno-metabólico é reduzido, uma vez que os ácidos graxos provenientes da lipólise são mobilizados para a utilização como fonte de energia.

Especulamos que, o aumento da relação IL-10/TNF- $\alpha$  associado a maior expressão protéica da pIkBa contribuiu para redução do ciclo vicioso imuno-metabólico no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta de cafeteria. Uma vez que a IL-10 pode bloquear a atividade quinase da IKK, que consequência inibe a liberação do NF $\kappa$ B (fosforilação do NF- $\kappa$ B), bloqueando sua translocação para o núcleo, inibindo desta maneira a transcrição gênica de moléculas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ . A redução na produção de citocinas pró-inflamatórias promove redução da lipólise e consequentemente menor ativação da via inflamatória (Quadro 2).

**Quadro 2.** Bloqueio do ciclo vicioso imuno-metabólico no tecido adiposo.:



Fonte: Exercise training as treatment in cancer cachexia. Lira et al., 2013.

## **6. CONCLUSÃO**

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo evidenciam que o suco de acerola pode ser utilizado com estratégia nutricional no combate ao ganho de peso (peso corporal e índice de adiposidade), dislipidemia (concentrações de TAG), e restaurar a via metabólica e inflamatória no tecido adiposo. Futuros estudos são necessários para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos promovidos pela ingestão de suco de acerola, especialmente em camundongos alimentados com uma dieta de cafeteria.

## REFERÊNCIAS

- Ahima RS, Filer JS. Adipose tissue as an endocrine organ. trends endocrinol metab. 2000; (2):327-32.
- Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. j biomed biotechnol. 2012; (12):1-14.
- Alfaia SS, Ribeiro GA, Nobre AD, Luizão RC, Luizão FJ. Evaluation of soil fertility in smallholder agroforestry systems and pastures in western amazonia. agr ecosyst environ. 2003; 102(3):409-14.
- Almeda JIL, Lopes JGV, Oliveira FMM. produtor de acerola. edições demócrito rocha: fortaleza: instituto centro de ensino tecnológico. 2002; 40.
- Arner P. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. diabetes metab. 1998; 4:507-515.
- Bicas JL, Molina G, Dionísio AP, Barros FFC, Wagner R, Maróstica MRJR, Pastore gm. Volatile constituents of exotic fruits from brazil. food res int. 2011; 44(7):1843-55.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, analytical biochemistry. 1976; 72:248-254.
- Campión J, Milagro JI, Fernández D, Martínez AJJ. Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity. j physiol biochem. 2006; 62(2):71-80.
- Carvalho RA, Ferreira CAP, Júnior JDBN, Menezes AJA, Sasaki ESG. Análise econômica da produção de acerola no município de tomé-açu, Pará. belém: embrapa amazônia oriental. 2000; 49: 21.
- Chenn JX, stinnett A. Critical role of the nadph oxidase subunit p47phox ovascular tlr expression and neointimal lesion formation in high-fat diet-induced obesity lab invest. 2008; 88(12):1316-28.

Colditz GA; wolf AM. Current estimates of the economic cost of obesity in the united states. *obesity research*. 1998; 6:97-106.

Dalmas E, Cl  menet K, Guerre-millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *trends immunol*. 2011; 32(7):307-14.

De assis SA, Velloso JC, Brunetti IL, Khalil NM, Leite KM, Martins AB, Oliveira OM. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in brazil. *int j food sci nutr*. 2009; 60(5):439-48.

Devalaraja S, Jain S, Yadav H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. *food res int*. 2011; 44(7):1856-1865.

Fair AM, Montgomery K. Energy balance, physical activity, and cancer risk. *methods mol biol*. 2009; 472:57-88.

Felig P; Wahren J; Hendler R. Influence of maturity-onset diabetes on splanchnic glucose balance after oral glucose ingestion. *diabetes*.1978; 27:121-126.

Franke AA, Cooney RV, Henning SM, Custer LJ. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *j agric food chem*. 2005; 29(13):5170-8.

Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *endocrinology*. 1992; 130(1):10-6.

Fonseca-alaniz, Miriam H. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *arq bras endocrinol metab*, são Paulo. 2006; v. 50, n. 2, abr.

García-d  as D, Campi  n J, Milagro FI, Martínez JA. Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *mol cell biochem*. 2007; 305(1-2):87-94.

Garcia-diaz DF, Campion J, Milagro FI, Paternain L, Solomon A, Martinez JA. Ascorbic acid oral treatment modifies lipolytic response



and behavioural activity but not glucocorticoid metabolism in cafeteria diet-fed rats. *acta physiol (oxf)*. 2009; 195(4):449-57.

Garcia-diaz DF, Campion J, Quintero P, Milagro FI, Moreno-aliaga MJ, Martinez JA. Vitamin c modulates the interaction between adipocytes and macrophages. *mol nutr food res*. 2011; 55(2):257-63.

Gao M, Ma Y, Liu D. Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and blocks high fat diet-induced obesity and fatty liver in mice. *pharm res*. 2013.

Gamble M, Gambe M. Theory and practice of histological techniques. new york: churchill livingstone. 2008; 121-35.

Hanamura T, Hchida E, Aoki H. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from acerola (*malpighia emarginata* dc.) fruit on uv-induced pigmentation. *biosci biotechnol biochem*. 2008; 72(12):3211-8.

Hellström L, Langin D, Reynisdottir S, Dauzats M, Arner P. Adipocyte lipolysis in normal weight subjects with obesity among first-degree relatives. *diabetologia* 39. 1996; 921-928.

Hofman PJ, Vuthapanich S, Whiley AW, Klieber A, Simons DH. Tree yield and fruit mineral concentrations influence hass avocado fruit quality. *sci hortic*. 2002; 92(2):113-23.

Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *j agric food chem*. 2009; 28(2):425-31.

Ibge, instituto brasileiro de geografia e estatística. pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003. análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no brasil. rio de janeiro; 2011.

Kim JH, Na HJ, Kim CK, Kim JY, Ha KS, Lee H, Chung HT, Kwon HJ, Kwon YG, Kim YM. The non-provitamin a carotenoid, lutein, inhibits nf-kappab-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/pTEN/akt and nf-kappab-inducing kinase pathways: role of h(2)o(2) in nf-kappab activation. *free radic biol med*. 2008; 45(6):885-96.

Kawaguchi M, Tanabe H, Nagamine K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2''-glycosidic linkage from green mature acerola. (*malpighia emarginata* dc) fruit. *biosci biotechnol biochem.* 2007; 71(5):1130-5.

Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *am j clin nutr.* 1999; (70):475-490.

Langin D, Dicker A, Tavemier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Amer E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, Van hamelen V, Gross RW, Holm C, Amer P. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *diabetes.* 2005; 54(11):3190-7.

Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *j lipid res.* 1999; 40:2059-2066.

Large V, Arner P, Reynisdottir S, Grober J, Van harmelen V, Holm C, Langin D. Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. *j lipid res.* 1998; 39:1688-1695.

Leterme P, Buldgen A, Estrada F, Londono AM. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the andes and the rain forest of colombia. *food chem.* 2006; 95(4):644-52.

Liu JP, Peng XR, Li XY, Li TZ, Zhang WM, Shi L, Han J, Giu MH. Norfriedelins a-c with acetylcholinesterase inhibitory activity from acerola tree (*malpighia emarginata*). *org lett.* 2013; 15(7):1580-3.

Lira FS, Neto JC, seelaender M. Exercise training as treatment in cancer cachexia. *appl physiol nutr metab.* 2014; 5:1-8

Mauriège P, Després JP, Prud'homme D, Pouliot MC, Marcotte M, Tremblay A, Bouchard C. Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *j lipid res.* 1991; 32:1625-1633.

Mesquita PC, Vigoa YG. La acerola. Fruta marginada de america con alto contenido de ácido ascórbico. madrid: alimentaria. 2000; 37(309):113-26.

Mezadri T, Fernández-pachón MS, Villano D, García-parrilla MC, Troncoso AM. The acerola fruit: composition, productive characteristics and economic importance. *arch latinoam nutr.* 2006; 56(2):101-9.

Musser RS, Lemos MA, De lima YLAG, Mélo EA, Lederman JE, Dos santos VF. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em pernambuco. *ciênc tecnol aliment.* 2004; 24(4):556-61.

Nguyen KD, Giu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *nature.* 2011; 480(7375):104-8.

Nogueira RJMC, Moraes JAPV, Burity HÁ, Silva júnior JF. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *pesq agrop bras.* 2005; 37(4):463-70.

Nunes RS. Avaliação das atividades genotóxica e antigenotóxica da acerola (*malpighia glabra* L.). [tese de doutorado]. programa de pós-graduação em genética e toxicologia aplicada. canoas: universidade luterana do brasil; 2011.

Nunes RS, Kahl VFS, Sarmiento MS, Richter MF, Abin-carrquiry JA, Martinez MM, Ferraz ABF, Da silva J. Genotoxic and antigenotoxic activity of acerola (*malpighia glabra* L.) extract in relation to the geographic origin. *phytother res.* 2013; 27(10):1495-501.

Oliveira LS, Moura CF, De brito ES, Mamede RV, De miranda MR. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*malpighia emarginata* d.c) clones. *j agric food chem.* 2012; 60(32):7957-64.

Overman A, Chuang CC, Mcintosh M. Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *int j obes (lond).* 2011; 35(9):1165-72.

Porcu OM, Rodriguez-amaya D. Carotenóides de acerola: efeito de estágio de maturação e remoção de película. 5º simpósio latino-americano de ciências de alimentos. campinas: 2003.

- Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *obesity (silver spring)*. 2008; 16(9):2081-7.
- Reaven GM; Hollenbeck C; Jeng CY; Wu MS; Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with type 2 diabetes. *diabetes*. 1998; 37:1020-1024.
- Reynisdóttir S, Wahrenberg H, Carlström K, Rössner S, Arner P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of alpha 2-adrenoceptors. *Diabetologia*. 1994; 37:428-435.
- Rufino MSM, Alves RE, De Brito ES, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, Mancini Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. *food chem*. 2010; 121(4):996-1002.
- Sampaio CG, Morais SM, Rufino MSM, Alves RE, Brito ES. Quality, bioactive compound content, and antioxidant activity in fruits of Brazilian acerola clones. *acta hort*. 2009; 841:463-6.
- Schwarz JM; Linfoot P; Dare D; Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *the American journal of clinical nutrition*. 2003; 1:43-50.
- Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, and Zimmermann R. *J. Biol. Chem* 2006; 281:40236-40241.
- Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *appetite*. 2009; 52(1):34-8.
- Suganami T, Nishida J, Ogawa YA. Paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *arterioscler thromb vasc biol*. 2005; 25(10):2062-8.

Terra X, Pallarés V, Ardevol A, Bladé Fernández-Iarrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *J Nutr Biochem*. 2011; 22(4):380-7.

Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*. 2010; 151(9):4109-15.

Vendramini AL; Trugo LC. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*. 2000; 71:195-198.

Wakabayashi H, Fukushima H, Yamada T, Kawase M, Shirataki Y, Satoh K, Tobe T, Hashimoto K, Kurihara T, Motohashi N, Sakagami H. Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by Barbados cherry, a fruit of *Malpighia emarginata* DC. *Anticancer Res*. 2003; 23(4):3237-41.

Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee MJ, Schneider SH, Brolin RE, Kang YH, Werber Y, Greenberg AS, Fried SK. Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obesity Research*. 2003; 11:930-936.

WHO, World Health Organization, Obesity and Overweight, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. 2011.

Zamboni M, Di Francesco V, Garbin U, Fratta Pasini A, Mazzali G, Stranieri C, Zoico E, Fantin F, Bosello O, Cominacini L. Adiponectin gene expression and adipocyte NF- $\kappa$ B transcriptional activity in elderly overweight and obese women: inter-relationships with fat distribution, hs-CRP, leptin and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31(7):1104-9.

Zawadzki JK; Wolfe RR; Mott DM; Lillioja S; Howard BV; Bogardus C. Increased rate of cori cycle in obese subjects with type 2 diabetes and effect of weight reduction. *Diabetes*. 1988; 37:154-9.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F,

Hermetter A, Zechner R. fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *science*. 2004; 306:1383-1386

.

**ANEXO(S)**

**ANEXO A - PARECER CEUA**

Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

**Protocolo: 130/2011**

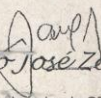
**Professor:**

VANESSA MORAES DE ANDRADE

**Título: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTIGENOTÓXICOS DO TRATAMENTO COM O SUCO DE MALPIGHIA EMARGINATA DC. SOBRE A DIETA CAFETERIA EM CAMUNDONGOS".**

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 21 de dezembro de 2011.

  
Jairo José Zocche

Coordenador do CEUA