

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LETICIA DINIZ CREPALDI

Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza insulinemia e a sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples.

Maringá – PR
2018

LETICIA DINIZ CREPALDI

Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza insulinemia e a sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Co-orientadora: Prof^a Dra. Rosângela Fernandes Garcia

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

C917g Crepaldi, Leticia Diniz
Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza insulinemia e a sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples / Leticia Diniz Crepaldi. -- Maringá, PR, 2018.
38 f.: il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Rosângela Fernandes Garcia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Goji berry. 2. Síndrome metabólica. 3. Carboidratos. 4. Estresse oxidativo. 5. Resistência à insulina. I. Godoi, Vilma Aparecida Ferreira de, orient. II. Garcia, Rosângela Fernandes, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 572.4

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

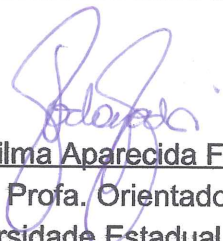
LETICIA DINIZ CREPALDI

Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza a insulinemia e a sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 19/02/18

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi

Profa. Orientadora
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Helenton Christian Barrena

Prof. Componente da Banca
Centro Universitário Ingá



Prof. Dra. Maria Montserrat Dias Pedrosa

Profa. Componente da banca
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Leticia Diniz Crepaldi nasceu em Assis/SP em 26/06/1992. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2011-2014). Durante a graduação participou de um projeto de Iniciação Científica na área de Genética e mais tarde iniciou o trabalho de conclusão de curso na área de Fisiologia renal. Iniciou em 2016 o curso de pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) em nível de Mestrado pela Universidade Estadual de Maringá, investigando os benefícios do fitoterápico goji berry sobre o metabolismo hepático da glicose em ratos Wistar. Possui experiência nas áreas de Fisiologia, Biologia Celular e Bioquímica.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um artigo científico intitulado

Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza insulinemia e a sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples.

Os resultados apresentados neste artigo referem-se aos efeitos do goji berry sobre os parâmetros biométricos e metabolismo hepático em ratos Wistar machos. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo está redigido de acordo com as normas da revista Journal of Functional Food (ISSN: 1756 - 4646), fator de impacto 3.144 (2016).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: *Lycium barbarum* (goji berry, GB), é uma planta milenar cujos componentes bioativos conferem uma variedade de benefícios, tais como redução nos níveis glicêmicos, lipídêmicos e atividade antioxidante. Apresenta potencial terapêutico em reverter o quadro de síndrome metabólica (SM). A maioria dos indivíduos afetados pela SM apresenta sobrepeso ou é obesa. Estratégias para reduzir o ganho de peso corporal envolvem a utilização potencial de suplementos naturais, inclusive o GB. Embora os efeitos do GB tenham sido descritos somente em modelos de obesidade induzida por dieta rica em gordura, neste estudo foi avaliado se, o tratamento diário com GB, em ratos alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples, pode melhorar os parâmetros hepáticos e periféricos da SM.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos do tratamento diário do GB sobre os parâmetros sistêmicos, biométricos e metabólicos, em ratos Wistar, alimentados com dieta rica em carboidratos simples.

METODOLOGIA: Ratos Wistar machos desmamados (21 dias) foram alimentados com dieta padrão para ratos (grupo controle - CON) ou dieta rica em carboidratos simples (high-carbohydrate diet – dieta HC) (130 dias). Aos 90 dias de idade o grupo que recebeu dieta HC foi subdividido em dois grupos, um que recebeu solução veículo (HCD) e outro que recebeu tratamento com GB (HCDGB), 250 mg/Kg/60 dias. O extrato do GB foi preparado em farmácia de manipulação e diluído em solução veículo específica administrada ao grupo HCDGB. Os grupos CON e HCD receberam apenas solução veículo. Para obtenção dos parâmetros biométricos foi avaliado o consumo de água e alimento a cada dois dias, e peso corporal semanalmente. Ao final do tratamento (150 dias) foi medido o comprimento naso-anal para cálculo do índice de Lee, os fígados e músculos gastrocnêmio foram removidos e pesados, assim como os depósitos de tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal, mesentérico e inguinal, para o cálculo do índice de adiposidade. Além disso foram realizados: (i) teste de tolerância à glicose intravenosa (ivGTT), (ii) cálculo do Índice Homa, (iii) avaliação do metabolismo hepático através da técnica de perfusão de fígado *in situ* utilizando o hormônio

glucagon e o precursor neoglicogênico L-alanina (dosagens bioquímicas de glicose, lactato e piruvato do líquido efluente e cálculo da glicólise). Ainda, foi realizada (iv) análise do conteúdo de gordura no fígado por método gravimétrico, determinando a quantidade de colesterol total (CT) e triacilglicerol (TAG) em fragmentos do tecido. Para (v) análise do estado redox do fígado, foram avaliados: a geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial, glutathiona reduzida (GSH) na fração mitocondrial e citosólica e quantificação do malondialdeído (MDA) para avaliação da peroxidação lipídica na membrana. Para comparação estatística dos grupos foi realizado ANOVA *one-way* seguida pelo pós-teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS: Ratos alimentados com dieta HC desde o desmame apresentaram aumento no ganho de peso corporal (28,59%) e no índice de Lee (5,26%), redução do peso do gastrocnêmio, aumento da insulinemia e do índice Homa. O tratamento com GB (250 mg/Kg PC) reverteu o ganho de peso corporal parcialmente, a insulinemia e o índice Homa. O peso do fígado não alterou entre os grupos. O grupo alimentado com dieta HC apresentou índices glicêmico e insulinêmico maiores que o grupo CON durante o ivGTT, comprovando uma menor sensibilidade à insulina. O tratamento com GB foi capaz de reverter estes índices e melhorar a sensibilidade à insulina. O índice de adiposidade aumentou nos animais HCD e o tratamento com GB reduziu esse parâmetro (gordura epididimal -18,11%, retroperitoneal -23,26% e inguinal -41,53%). Fígados de ratos submetidos a dieta HC apresentaram elevada liberação de glicose basal e estimulada por Glucagon, enquanto a taxa de glicólise estimulada por glucagon não foi alterada entre os grupos. O GB não foi eficaz em reverter estes parâmetros. Entretanto, fígados de ratos HCD apresentaram elevada capacidade gliconeogênica a partir da L-alanina, enquanto a taxa de glicólise não foi alterada. No entanto, estes dois parâmetros foram reduzidos pelo GB. Os fígados dos ratos HCD exibiram quantidade elevada (43,79%) de lipídios totais, característico de esteatose, que foi totalmente revertida pelo tratamento com GB. A produção hepática de EROs foi 170,88% maior no grupo HCD, e o tratamento foi eficaz em reverter este parâmetro, assim como em reduzir os níveis de peroxidação lipídica. Os

conteúdos de GSH mitocondrial e citosólico foram reduzidos no grupo HCD, e não foram restaurados com o tratamento de GB.

DISCUSSÃO: Nossos resultados demonstraram que o modelo experimental de animais alimentados com dieta HC desenvolveram características sistêmicas e hepáticas da SM observada em humanos, a saber: (i) aumento no ganho de peso corporal associado ao aumento da adiposidade e redução da massa magra; (ii) hiperinsulinemia e resistência à insulina (RI); (iii) rompimento da homeostase glicêmica associada ao aumento do estoque hepático de glicogênio e da gliconeogênese hepática a partir da L-alanina; (vi) esteatose hepática e (v) aumento do estresse oxidativo associado à redução dos sistemas antioxidantes hepáticos. O GB (250 mg/Kg/60 dias), por sua vez, se mostrou eficiente neste caso por reduzir parcialmente o ganho de peso promovido pela dieta HC associado à redução parcial da adiposidade, apesar de não haver diferença significativa no consumo diário de alimento entre os grupos, restabeleceu a normoinsulinemia e reduziu a RI; promovendo aumento na translocação dos transportadores de glicose (GLUT 4) no músculo esquelético e no tecido adiposo, restabeleceu parcialmente a homeostase glicêmica por reduzir a gliconeogênese a partir da L-alanina; inibindo as enzimas chave da via, reduziu o conteúdo de lipídeos hepáticos por meio da inibição do fator de transcrição SREBP-1 que modula enzimas lipogênicas, e o estresse oxidativo mitocondrial no fígado que se dá pela abundância de compostos fenólicos do GB.

CONCLUSÃO: Portanto, efeitos sistêmicos, hepáticos e periféricos do GB, como redução da insulinemia, redução do estresse oxidativo e da gliconeogênese hepática, associados à melhora na RI, tornam o GB um importante coadjuvante no tratamento de síndromes relacionadas à perda da homeostase glicêmica e lipidêmica, como a SM e DM2.

PALAVRAS-CHAVE: Goji Berry, Síndrome metabólica, dieta rica em carboidratos (HC), estresse oxidativo, resistência à insulina.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Lycium barbarum* (goji berry, GB), is a millennial plant whose bioactive components confer a variety of benefits, such as reduction in glycemic, lipidemic and antioxidant activity. It presents therapeutic potential in reversing the metabolic syndrome (MS). Most individuals affected by MS are overweight or obese. Strategies to reduce body weight gain involve the potential use of natural supplements, including GB. Although the effects of GB have been described only in obesity models induced by a high-fat diet, in this study it was assessed whether daily GB treatment in rats fed a simple carbohydrate-enriched diet could improve hepatic and peripheral parameters SM.

OBJECTIVES: To evaluate the effects of daily GB treatment on the systemic parameters, biometric and metabolic, in Wistar rats fed a diet rich in simple carbohydrates.

METHODS: Wean male Wistar rats (21 days) were fed standard diet for rats (control group - CON) or high-carbohydrate diet (HC diet) (130 days). At 90 days of age the HC diet group was subdivided into two groups, one that received a vehicle solution (HCD) and one that received treatment with GB (HCDGB), 250 mg / kg / 60 days. GB extract was prepared in a manipulation pharmacy and diluted in a specific vehicle solution administered to the HCDGB group. The CON and HCD groups received only vehicle solution. In order to obtain the biometric parameters, the consumption of water and food was evaluated every two days, and body weight weekly. At the end of the treatment (150 days), the naso-anal length was calculated for the Lee index, the livers and gastrocnemius muscles were removed and weighed, as well as deposits of epididimal, retroperitoneal, mesenteric and inguinal white adipose tissue calculation of the adiposity index. In addition, we performed: (i) intravenous glucose tolerance test (ivGTT), (ii) calculation of the Homa Index, (iii) evaluation of liver metabolism through *in situ* liver perfusion using the glucagon hormone and the neoglycogenic precursor L-alanine (biochemical measurements of glucose, lactate and pyruvate from the effluent liquid and calculation of glycolysis). In addition, fat content in the liver was analyzed by gravimetric method, determining the amount of total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TGA) in fragments of the tissue. In order to evaluate the redox status of the liver, we evaluated the generation of mitochondrial reactive oxygen species

(ROS), reduced glutathione (GSH) in the mitochondrial and cytosolic fraction, and quantification of malondialdehyde (MDA) for evaluation of membrane lipid peroxidation. Statistical comparison of the groups was performed one-way ANOVA followed by the Tukey post-test, considering a significance level of 5%.

RESULTS: Rats fed HC diet from weaning presented an increase in body weight gain (28.59%) and Lee index (5.26%), reduction in gastrocnemius weight, increase in insulinemia and Homa index. Treatment with GB (250 mg / kg PC) partially reversed the body weight gain, insulinemia and Homa index. Liver weight did not change between groups. The group fed HC diet had higher glycemic and insulinemic indexes than the CON group during ivGTT, demonstrating a lower insulin sensitivity. GB treatment was able to reverse these rates and improve insulin sensitivity. Adiposity index increased in HCD animals and GB treatment reduced this parameter (epididymal fat -18.11%, retroperitoneal -23.26% and inguinal -41.53%). Livers of rats submitted to HC diet presented high basal and Glucagon stimulated glucose release, while glucagon stimulated glycolysis rate was not altered between groups. GB was not effective in reverting these parameters. However, livers of HCD rats presented high gluconeogenic capacity from L-alanine, while the glycolysis rate was not altered. However, these two parameters were reduced by GB. The livers of the HCD mice exhibited a high amount (43.79%) of total lipids, characteristic of steatosis, which was completely reversed by treatment with GB. The hepatic production of ROS was 170.88% higher in the HCD group, and the treatment was effective in reversing this parameter, as well as in reducing the levels of lipid peroxidation. Mitochondrial and cytosolic GSH contents were reduced in the HCD group, and were not restored with GB treatment.

DISCUSSION: Our results demonstrated that the experimental model of HC diet fed animals developed systemic and hepatic characteristics of MS observed in humans, namely: (i) increase in body weight gain associated with increased adiposity and lean mass reduction; (ii) hyperinsulinemia and insulin resistance (IR); (iii) disruption of glycemic homeostasis associated with increased hepatic glycogen stores and hepatic gluconeogenesis from L-alanine; (vi) hepatic steatosis and (v) increased oxidative stress associated with the reduction of hepatic antioxidant systems. GB (250 mg / kg / 60 days), in turn, proved to be efficient in this case by partially reducing the weight gain promoted by the HC

diet associated with the partial reduction of adiposity, although there was no significant difference in daily food intake between the groups, reestablished normoinsulinemia and reduced RI; promoting increased translocation of glucose transporters (GLUT 4) in skeletal muscle and adipose tissue, partially restored glycemic homeostasis by reducing gluconeogenesis from L-alanine; inhibiting key pathway enzymes, reduced hepatic lipid content by inhibiting the SREBP-1 transcription factor that modulates lipogenic enzymes, and the mitochondrial oxidative stress in the liver which is due to the abundance of GB phenolic compounds.

CONCLUSION: Therefore, systemic, hepatic and peripheral effects of GB, such as reduction of insulinemia, reduction of oxidative stress and hepatic gluconeogenesis associated with the improvement in IR, make GB an important adjunct in the treatment of syndromes related to the loss of glycemic homeostasis and lipidemic, such as MS and DM2.

KEY WORDS: Goji Berry, Metabolic Syndrome, high carbohydrate (HC) diet, oxidative stress, insulin resistance.

Sumário

1. Introdução	16
2. Material e Métodos	17
2.1 Preparo do extrato do GB	17
2.2 Animais, dieta e tratamento	18
2.3 Parâmetros biométricos	18
2.4 Teste de tolerância à glicose intravenosa (ivGTT)	19
2.5 Conteúdo de gordura do fígado	19
2.6 Avaliação do estresse oxidativo hepático	20
2.7 Perfusão de fígado in situ	21
2.8 Análise estatística	21
3. Resultados	21
3.1 Avaliação dos parâmetros biométricos e plasmáticos	21
3.2 Teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)	22
3.3 Avaliação do índice de adiposidade	23
3.4 Avaliação do conteúdo de gordura hepática	24
3.5 Avaliação do estresse oxidativo hepático	25
3.6 Avaliação do metabolismo hepático	26
4. Discussão e Conclusão	27
5. Referências	33
6. Anexo 1	38

Resumo: *Lycium barbarum* (goji berry, GB) apresenta componentes bioativos capazes de reverter a síndrome metabólica (SM). Este trabalho avaliou parâmetros sistêmicos, biométricos e metabólicos de ratos Wistar, alimentados com dieta padrão (CON) e dieta rica em carboidratos simples (HCD). A partir de 90 dias de idade, os animais foram tratados com solução veículo (CON e HCD) ou com solução contendo 250 mg / kg de peso corporal de GB (HCDGB). Aos 150 dias de idade os animais foram submetidos à técnica de perfusão de fígado *in situ*, coleta de tecidos, teste de tolerância à glicose intravenosa, análise do conteúdo de gordura e estresse oxidativo hepático. O tratamento reduziu o ganho de peso corporal, insulinemia e o índice Homa, melhorou a sensibilidade à insulina, e reduziu o índice de adiposidade, a esteatose hepática e estresse oxidativo, tornando o GB um coadjuvante importante no tratamento da SM.

Palavras-Chave: Goji Berry, Síndrome metabólica, dieta rica em carboidratos, estresse oxidativo, resistência à insulina.

Abstract: Lycium barbarum (goji berry, GB) presents bioactive components capable of reversing the metabolic syndrome (MS). This study evaluated systemic, biometric and metabolic parameters of Wistar rats, fed standard diet (CON) and diet rich in simple carbohydrates (HCD). From 90 days of age, the animals were treated with vehicle solution (CON and HCD) or with solution containing 250 mg / kg body weight of GB (HCDGB). At 150 days of age the animals were submitted to in situ liver perfusion technique, tissue collection, intravenous glucose tolerance test, fat content analysis and hepatic oxidative stress. The treatment reduced body weight gain, insulinemia and Homa index, improved insulin sensitivity, and reduced adiposity, hepatic steatosis and oxidative stress, making GB an important adjunct in the treatment of MS.

Key words: Goji Berry, Metabolic Syndrome, high carbohydrate diet, oxidative stress, insulin resistance.

1. INTRODUÇÃO

Lycium barbarum, popularmente conhecido como goji berry (GB), é uma planta milenar utilizada na medicina tradicional chinesa e amplamente indicada como alimento funcional. Pertencente à família Solanaceae, o GB é rico em compostos como polissacarídeos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos, minerais e compostos fenólicos (Qian, Ji, Gao & Huang, 2017; Yao et al., 2011). Desses, os polissacarídeos são considerados os componentes ativos primários com maior gama de atividades farmacológicas (Cheng et al., 2015). Os componentes bioativos dos frutos conferem uma ampla variedade de efeitos benéficos, tais como redução nos níveis glicêmicos e lipidêmicos, melhora na sensibilidade à insulina, anti-inflamatório, anticancerígeno, antienvelhecimento, imunomodulador, citoprotetor e principalmente antioxidante (Amagase & Farnsworth, 2011).

De Souza Zanchet et al. (2017) demonstraram recentemente que a suplementação diária de GB foi efetiva para prevenir doenças cardiovasculares em pacientes com síndrome metabólica (SM). A SM é caracterizada por um grupo de anormalidades metabólicas como obesidade abdominal, resistência à insulina (RI), hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial, que podem predispor a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Mottillo et al., 2010). A obesidade abdominal, por sua vez, está fortemente correlacionada ao aumento da prevalência de esteatose hepática não alcoólica (Non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD) (Pappachan, Babu, Krishnan & Ravindran, 2017) e RI (Alberti, Zimmet & Shaw, 2006). Dentro deste contexto, o efeito hepatoprotetor do GB em suprimir a esteatose e o estresse oxidativo tem sido observado em pacientes com NAFLD (de Souza Zanchet, Nardi, Bratti, Filippin-Monteiro & Locatelli, 2017) e em modelo animal de obesidade (Ming, Guanhua, Zhanhai, Guang, & Xuan, 2009; Yang et al., 2014)

A RI, que é a diminuição da capacidade dos tecidos periféricos em responder a ação da insulina, promove alteração nos parâmetros metabólicos do fígado, músculo e tecido adiposo (Bazotte, Silva & Schiavon, 2014; McCracken, Monaghan & Sreenivasan, 2018), principalmente pela incapacidade da insulina em inibir a produção hepática de glicose e estimular a

captação de glicose no tecido adiposo e no músculo (Hribal & Accili, 2002; Saltiel & Kahn, 2001).

A maioria dos indivíduos afetados pela SM apresenta sobrepeso ou é obesa. Estratégias para reduzir o ganho de peso corporal envolvem uma combinação de fatores como mudanças no estilo de vida (Celleno, Tolaini, D'Amore, Perricone & Preuss, 2007) e a utilização potencial de suplementos naturais, inclusive o GB (de Souza Zanchet, Nardi, Bratti, Filippin-Monteiro, & Locatelli, 2017).

A ingestão de dieta rica em gordura, efetiva no desenvolvimento da obesidade, tem sido extensivamente estudada em modelo animal (Cesaretti & Kohlmann Junior, 2006; Després & Lemieux, 2006), entretanto, poucos estudos avaliam os efeitos de uma dieta rica em carboidratos simples (da Silva-Santi et al., 2016), que também se assemelha ao padrão humano, sobre os parâmetros da SM.

Da mesma forma que os efeitos do GB sobre os parâmetros biométricos e metabólicos de ratos Wistar, tenham sido observados em modelos de obesidade induzida por dieta rica em gordura (Zhao, Li & Xiao, 2005), nenhum estudo foi realizado em modelo de dieta rica em carboidratos simples. Dessa forma, foi avaliado neste estudo se, o tratamento diário com GB, em ratos alimentados com dieta enriquecida com carboidratos simples, promove melhora dos parâmetros hepáticos e periféricos da SM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do extrato de GB

O extrato do GB foi preparado em farmácia de manipulação, utilizando pó do fruto seco (fornecedor Embrafarma[®]) na concentração de 250 mg/mL (Luo, Cai, Yan, Sun, & Corke, 2004). A dissolução do GB foi realizada utilizando-se uma solução veículo contendo 3% de propilenoglicol, 40% de sorbitol líquido, 0,15% de Metilparabeno e 0,5% de goma xantana. Quando não indicado todos os outros reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brazil.

2.2. Animais, dietas e tratamento

Ratos machos da linhagem Wistar (total de 54 animais) obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, com 21 dias de idade (desmame, 45-50g), alocados no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas-UEM, mantidos sob temperatura (23°C) e fotoperíodo (12-h claro/12-h escuro) controlados, foram avaliados neste estudo. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 4373180216). O número de animais por grupo em cada protocolo experimental foi indicado nos resultados.

Após o desmame os ratos foram alocados em caixas de polipropileno (4 por caixa) e alimentados com dieta padrão para ratos (grupo controle, CON) ou dieta rica em carboidratos simples (high-carbohydrate diet, dieta HC). Aos 90 dias de idade o grupo que recebeu dieta HC foi subdividido em dois grupos, um que recebeu solução veículo (HCD) e outro que recebeu tratamento com GB (HCDGB), por 60 dias. A solução veículo também foi administrada aos animais CON. Tanto alimento quanto água foram disponibilizados *ad libitum*.

A dieta padrão foi baseada na ração Nuvilab CR1 (Nuvital®, Brasil). A dieta HC foi preparada de acordo com Lima et al. (2008), sendo composta de 33% de ração padrão moída, 33% de leite condensado (Nestlé®, Brasil), 7% de açúcar (União®, Brasil) e 8,6% de água. Os valores nutricionais das dietas padrão e HC foram respectivamente: 292 e 318 calorias (kcal/100g da dieta); 57,5% e 68% de carboidratos; 30% e 16% de proteínas; 12,5% e 16% de gordura.

O tratamento com GB foi realizado por via intragástrica, onde cada animal recebeu um volume de 0,1 ml/100g de peso corporal (PC) de veículo ou do extrato de GB na dose de 250 mg/Kg PC diariamente, por 60 dias.

2.3. Parâmetros biométricos

A ingestão de água e alimento foi avaliada a cada dois dias, a fim de obter uma média do consumo diário ao longo do todo período experimental. Semanalmente foi mensurado o PC, para acompanhamento da evolução do ganho de peso, que foi obtida pela diferença entre o peso final e peso inicial

(150 e 21 dias, respectivamente). Ao final do período experimental foi realizada a medida do comprimento naso-anal para o cálculo do índice de Lee (Bernardis & Patterson, 1968).

Ao final do teste de tolerância à glicose (descrito abaixo), os animais, sob jejum de 12 horas, foram anestesiados (40 mg/kg de Tiopental e 10 mg/kg de lidocaína, i.p.), e eutanasiados para remoção e pesagem do fígado, o músculo gastrocnêmio e os depósitos de tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal, mesentérico e inguinal. A soma dos depósitos de gordura foi utilizada para o cálculo do índice de adiposidade. Resultados foram expressos em g/100g PC.

2.4. *Teste de tolerância à glicose intravenosa (ivGTT)*

Para este teste, animais em jejum de 12 horas foram anestesiados (40 mg/kg PC de Tiopental e 10 mg/kg de Lidocaína, i.p.). Um cateter de silicone heparinizado foi implantado na veia jugular direita e ligado à região cervical dorsal, para administração de glicose (1 g/kg PC) e coleta de amostras de sangue. No dia seguinte, os animais foram colocados em caixas individuais e o sangue coletado antes (tempo 0) e 5, 15, 30, 45 e 60 min após carga de glicose. Amostras de sangue foram colocadas em tubos heparinizados e centrifugadas para medida de glicose, usando Kit comercial (Gold Analisa[®], Brasil), e expressos em mg/dL. Amostras de plasma foram mantidas a -20 °C, para posterior mensuração de insulina por radioimunoensaio (Wizard2 Automatic Gamma Counter[®], TM-2470, PerkinElmer, Shelton-CT, EUA) e expressos em ng/mL. Os valores de glicemia e insulinemia do tempo zero foram utilizados para o cálculo do Índice Homa (Matthews et al., 1985).

2.5. *Conteúdo de gordura do fígado*

O conteúdo de lipídios foi avaliado por método gravimétrico, de acordo com o procedimento descrito por Folch et al. (1957), baseado na extração de lipídios através da homogeneização de fragmentos de tecido hepático (cerca de 1g) em uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1). Os conteúdos de colesterol total (CT) e triacilglicerol (TGA) foram determinados após suspensão da gordura em 2% de Triton, seguidos por agitação e aquecimento a 55 °C.

Foram mensurados com uso de Kit comercial (Gold Analisa[®]) e expressos em g/100 g de peso úmido de tecido.

2.6. *Avaliação do estresse oxidativo hepático*

Para análise do estado redox do fígado, a geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial, o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) na fração mitocondrial e citosólica e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliadas. Uma porção do fígado coletado foi utilizada para obtenção da fração mitocondrial e outra para obtenção do homogenato. A fração mitocondrial foi obtida por centrifugação diferencial em meio manitol-sacarose pH 7.4 (Bracht, Ishii-Iwamoto & Salgueiro-Pagadigorria, 2003). As mitocôndrias intactas foram usadas para medir a geração de EROs e as mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento foram usadas para medir o conteúdo de GSH.

Para a obtenção do homogenato, aproximadamente 1 g de fígado clampeado em nitrogênio líquido foi homogeneizado utilizando o homogeneizador Van Potter em um meio contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de HEPES, pH 7,2. Alíquotas de homogenato foram utilizadas para medir TBARS. Para avaliar o conteúdo de GSH, o homogenato foi centrifugado a $10\,000 \times g$ durante 3 min após diluição de 25 μ L em 1,5 mL de um meio de precipitação (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES, pH 7,4 e ácido tricloroacético a 15%). As concentrações de proteínas nas frações subcelulares foram determinadas utilizando albumina de soro bovino como padrão (Lowry, 1951).

A geração das EROs foi avaliada através da oxidação do 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) conforme descrito por Berson et al. (1998) e expressa como pmol de DCF produzido/min $\times$ mg de proteína. Os conteúdos de GSH na fração mitocondrial e no homogenato foram medidos usando o-ftalaldeído (OPT) de acordo com o método descrito por Hissin & Hilf (1976) e expressos como μ g GSH/mg de proteína. TBARS como biomarcadores da peroxidação lipídica foram medidos usando espectrofotometria direta (Ohkawa, Ohishi & Yagi 1979). Os resultados foram

expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína (ϵ , 1.56×10^5 M⁻¹×cm⁻¹).

2.7. *Perfusão de fígado in situ*

A técnica de perfusão de fígado foi realizada como previamente descrita (Garcia et al., 2008; Gazola et al., 2007). Os animais, sob jejum de 12 horas, foram anestesiados (40 mg/kg de Tiopental e 10 mg/kg de lidocaína, i.p.), e os fígados perfundidos conforme protocolo demonstrativo (Fig. 5A). A perfusão foi realizada por 10 min com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro (KH) e posteriormente com substância teste dissolvida no tampão KH. Glucagon (1nM) como agente glicogenolítico e L-alanina (5mM) como precursor gliconeogênico, foram perfundidos sequencialmente por 30 minutos cada. O líquido efluente (perfusado) foi coletado a cada 5 minutos para posterior dosagem de glicose, L-lactato e piruvato.

A concentração de glicose no perfusado foi avaliada com uso de kit comercial (Gold Analisa®; Brazil), enquanto L-lactato e piruvato, utilizados para avaliação da taxa de glicólise (L-lactato+piruvato/2), foram mensurados de acordo com métodos descritos por Bergmeyer & Bernt (1974). Os valores apresentados como área sob a curva (*area under curve* – AUC) foram expressos em $\mu\text{mol/g}$.

2.8. *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). O programa Graphpad Prism-Versão 6.0, foi utilizado para o cálculo da AUC e análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey), considerando o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 *Avaliação de parâmetros biométricos e plasmáticos*

A tabela 1 apresenta diferentes parâmetros biométricos e plasmáticos entre os 3 grupos avaliados. Aos 150 dias de idade, ratos alimentados com

dieta HC, desde o desmame, apresentaram aumento no ganho de peso corporal (28,59%), no índice de Lee (5,26%) com menor ingestão diária de água (29,3%) em relação ao grupo CON. Não houve diferença no consumo diário de alimento entre os grupos. O tratamento com GB (250 mg/mL) por 60 dias foi capaz de reduzir parcialmente o ganho de peso corporal, sem alteração no consumo diário de alimento e água em relação aos animais HCD. O peso do fígado não alterou entre os grupos, embora tenha havido redução de peso do músculo gastrocnêmio nos animais dos grupos tratados com dieta HC, sem diferença em relação ao tratamento.

Avaliações plasmáticas mostraram que não houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos, entretanto, a insulinemia foi significativamente maior no grupo HCD e reverteu com o tratamento de GB. O índice Homa, uma medida de RI, apresentou resultado similar, ou seja, aumento nos animais HCD e reversão pelo tratamento com GB.

Tabela 1

Parâmetros biométricos e plasmáticos

Parâmetros	CON	HCD	HCDGB
Consumo de água (mL/dia)	43,00 ± 0,40 ^a	30,40 ± 0,60 ^b	27,30 ± 2,80 ^b
Consumo Alimento (g/dia)	26,00 ± 0,05 ^a	28,30 ± 0,50 ^a	26,60 ± 2,60 ^a
Δ Peso corporal (g)	386,95 ± 6,36 ^a	497,60 ± 14,70 ^b	449,60 ± 8,20 ^c
Índice de Lee	285,42 ± 1,84 ^a	300,42 ± 2,89 ^b	306,91 ± 2,19 ^b
Peso do fígado (g/100g PC)	3,02 ± 0,06 ^a	3,19 ± 0,06 ^a	3,04 ± 0,09 ^a
Peso do Gastrocnêmio (g/100g PC)	1,13 ± 0,022 ^a	1,01 ± 0,035 ^b	0,97 ± 0,0332 ^b
Glicemia (mg/dL)	81,15 ± 2,38 ^a	80,46 ± 4,15 ^a	86,85 ± 3,64 ^a
Insulinemia (ng/mL)	1,89 ± 0,15 ^a	3,03 ± 0,03 ^b	1,94 ± 0,15 ^a
Índice Homa	9,51 ± 0,87 ^a	14,71 ± 0,72 ^b	10,29 ± 0,71 ^a

Tab 1: Os resultados representam a média ± EP (n = 8 a 9). Animais alimentados com dieta padrão (CON); dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB (HCDGB). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

3.2. Teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)

Para avaliar o efeito do GB na sensibilidade à insulina, o teste de tolerância à glicose foi realizado através de infusão intravenosa de glicose (1g/Kg PC). Os valores de glicemia e insulinemia obtidos durante o ivGTT

estão mostrados nas Figs. 1 A e B. Os histogramas representam os valores de AUC das respectivas curvas. Grupo HCD apresentou índices glicêmico e insulinêmico maiores que o grupo CON, comprovando uma menor tolerância à glicose. O tratamento com GB foi capaz de reverter estes índices, conforme verificado pelos valores de AUC, evidenciando um notável aumento na sensibilidade à insulina.

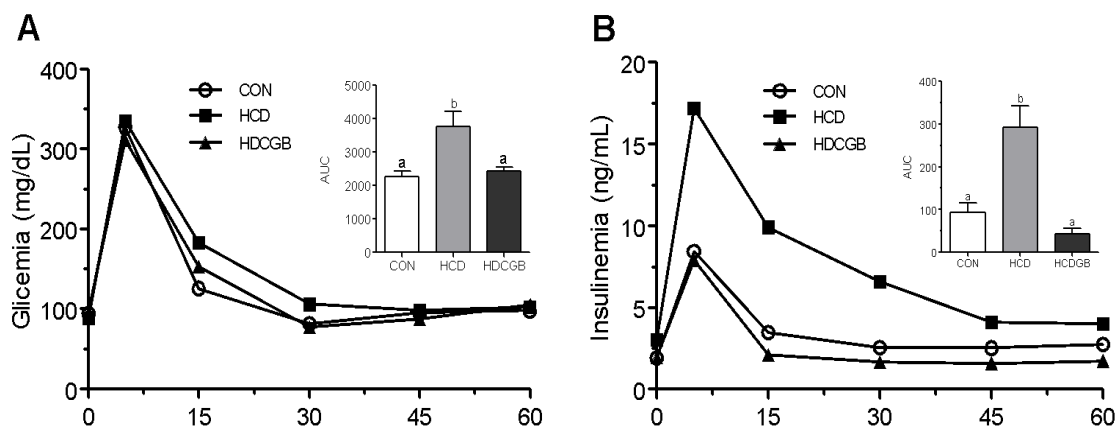


Fig. 1. Teste de tolerância à glicose. Curva glicêmica (A) e insulinêmica (B) de ratos submetidos à infusão intravenosa de glicose (1g/Kg PC). Os histogramas representam os valores de AUC das respectivas curvas. Animais alimentados com dieta padrão (CON); dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB (HCDGB). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP de 7 a 9 animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.3 Avaliação do índice de adiposidade

O índice de adiposidade representado pela Fig. 2 foi calculado pela soma dos depósitos de tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal, inguinal e mesentérico. Animais do grupo HCD apresentaram aumento significativo em todos os depósitos de gordura avaliados. O tratamento com GB promoveu redução significativa nas gorduras epididimal, retroperitoneal e inguinal sem alteração na gordura mesentérica. O índice de adiposidade apresentou a mesma variação, ou seja, aumento dos depósitos de gordura total nos animais HCD e redução nos animais tratados com GB, sendo atribuída a diminuição significativa do acúmulo de gordura epididimal (18,11%), retroperitoneal (23,26%) e inguinal (41,53%).

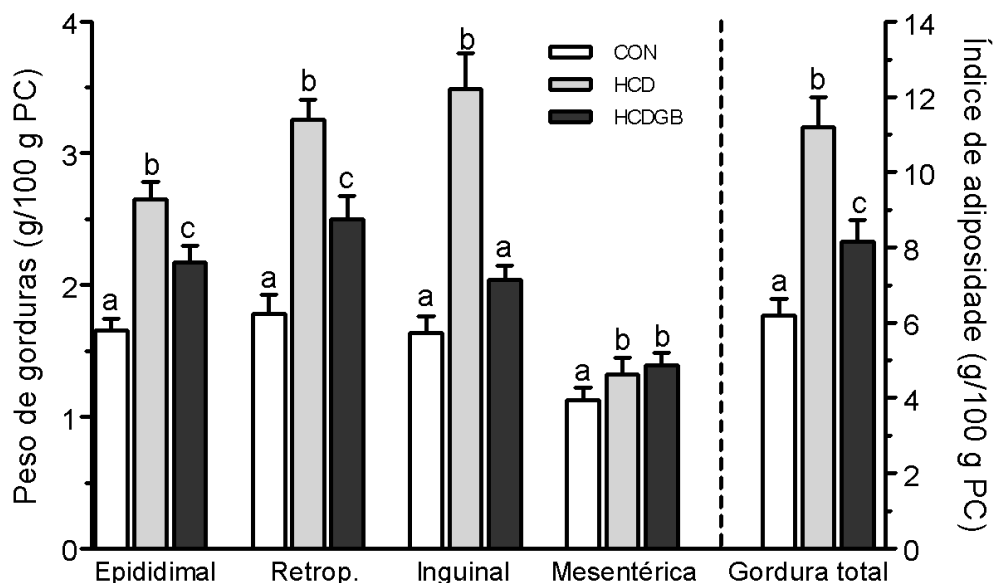


Fig. 2. Peso dos depósitos de tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal (Retrop.), inguinal, mesentérico e do índice de adiposidade (Gordura total). Animais alimentados com dieta padrão (CON); dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB (HCDGB). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP de 9 animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.4. Avaliação do conteúdo de gordura hepática

A quantificação do conteúdo de lipídios totais do fígado revelou que os ratos do grupo HCD apresentaram quantidade significativamente elevada (43,79%) em relação ao grupo CON, característico de esteatose, que foi totalmente revertida pelo tratamento com GB (Fig. 3A). Os níveis de TGA (Fig. 3B) e CT (Fig. 3C) no fígado também foram quantificados, mostrando uma significativa elevação dos níveis de TGA em fígados de ratos HCD, e reversão parcial com o tratamento. Os níveis de CT não foram alterados pela dieta, mas foi reduzido significativamente pelo tratamento com GB em relação ao grupo CON (Fig. 3C).

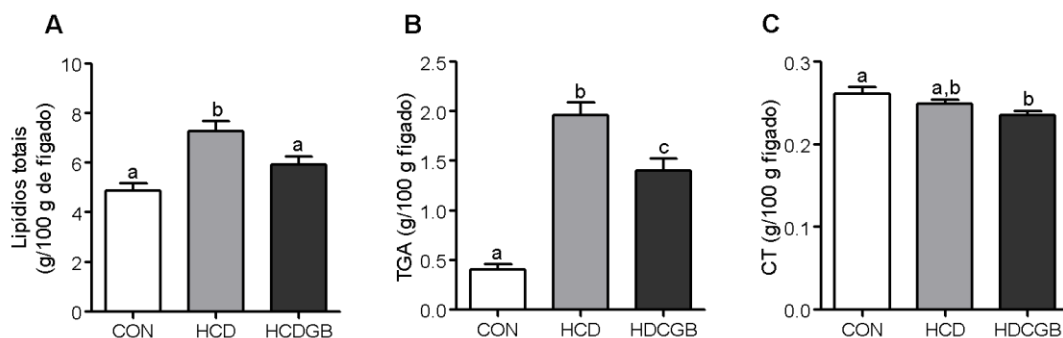


Fig. 3. Perfil lipídico hepático. Conteúdo de lipídios totais, triacilglicerol (TGA) e colesterol total (CT) de fígados de ratos alimentados com dieta padrão (CON), dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB. Os valores foram expressos em g por 100g de peso de fígado como média $\pm$ EP de 8 a 9 animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.5. Avaliação do estresse oxidativo hepático

A figura 4 apresenta a análise do estado redox do fígado onde foram avaliados a geração de EROs e o conteúdo de GSH mitocondrial e citosólico. Como pode ser visto na Fig. 4A, a produção de EROs foi 170,88% maior no grupo HCD que no controle, e o tratamento foi eficaz em reverter este parâmetro. Os conteúdos de GSH tanto mitocondrial (Fig. 4B) quanto citosólico (Fig. 4C) foram reduzidos no grupo HCD, e não foram restaurados com o tratamento de GB, embora seja evidenciada uma tendência de aumento no conteúdo de GSH citosólico.

Ao avaliarmos a peroxidação lipídica, observamos que embora não tenha apresentado diferença entre os grupos HCD e CON, houve um discreto mas não significativo, aumento no grupo HCD, que foi reduzido significativamente pelo tratamento com GB (Fig. 4D).

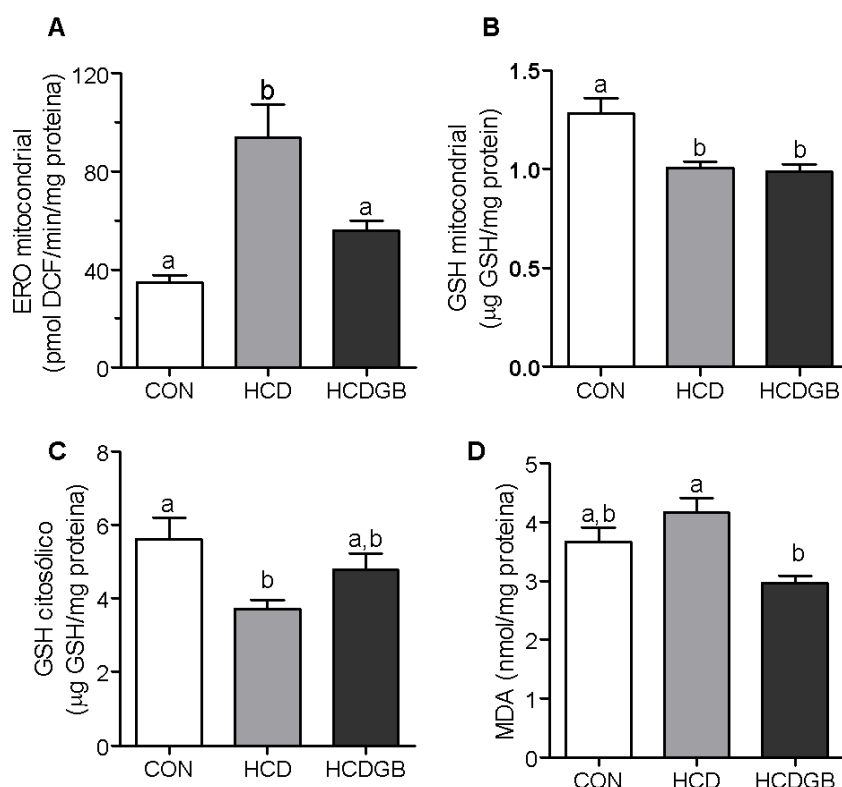


Fig. 4. Estresse oxidativo hepático. Geração mitocondrial de EROs (A), conteúdos de GSH mitocondrial (B), GSH citosólico (C) e Malondialdeído (MDA) (D) de fígados de ratos alimentados com dieta padrão (CON), dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB. Os valores foram expressos como média $\pm$ EP de 5 a 6 animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.6. Avaliação do metabolismo hepático

O metabolismo hepático foi avaliado através da técnica de perfusão de fígado *in situ*, conforme gráfico demonstrativo representado na Fig. 5A. Os valores de glicose, liberada ou produzida pelo fígado, e da taxa de glicólise foram expressos em AUC. Fígados de ratos submetidos à dieta HC apresentaram elevada liberação basal de glicose (Fig. 5B) e de glicose estimulada por Glucagon (Fig. 5C), em comparação aos controles (CON), enquanto a taxa de glicólise estimulada por glucagon não foi alterada entre os grupos (Fig. 5D). O GB não foi eficaz em reverter estes parâmetros. Entretanto, quando perfundidos com L-alanina, fígados de ratos HCD apresentaram elevada capacidade gliconeogênica, observada pela maior liberação de glicose (Fig. 5E), enquanto a taxa de glicólise não foi alterada quando comparado com

o grupo controle (Fig.5F). Estes dois parâmetros foram claramente influenciados pelo tratamento com GB, resultando em *down-regulation* da gliconeogênese, sendo verificada por uma menor produção de glicose, além de reduzir a taxa de glicólise, conforme Figs. 5E e F.

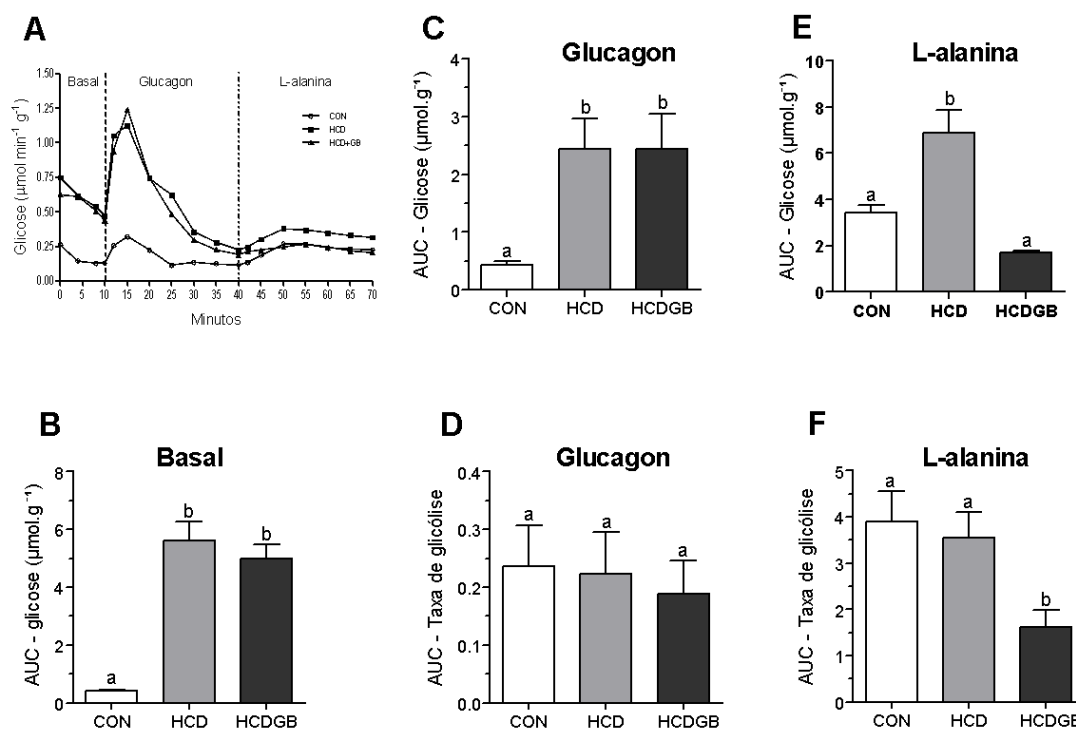


Fig 5. Perfusão de fígado *in situ* em ratos sob jejum de 12 horas. Experimento demonstrativo da liberação de glicose (A), AUC da liberação de glicose basal (B), liberação de glicose (C) e taxa de glicólise (D) durante infusão de Glucagon (1nM) e liberação de glicose (E) e taxa de glicólise (F) durante infusão de L-alanina (5mM). Animais alimentados com dieta padrão (CON); dieta rica em carboidratos simples (HCD) e dieta HC tratados com GB (HCDGB). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP de 7 a 9 animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Animais alimentados com dieta HC desenvolveram desordens metabólicas semelhantes àsquelas observadas em animais alimentados com dieta rica em gordura (*high fat diet* – dieta HF) (Zhao, Li & Xiao, 2005; Zhao et al., 2014), incluindo aumento no ganho de peso corporal, no índice de adiposidade, NAFLD e do estresse oxidativo hepático (Lima et al., 2016), características da SM em humanos (de Souza Zanchet et al., 2017). Embora a

glicemia de jejum não tenha diferido entre os grupos, a elevada insulinemia, Índice Homa, e os picos maiores na insulinemia e glicemia após sobrecarga de glicose, comprovaram a redução da sensibilidade à insulina neste modelo experimental.

O ganho de peso corporal ocasionado pela dieta HC pode ser atribuído ao maior índice de adiposidade dos animais, já que os mesmos apresentaram redução de massa muscular, indicada pela mensuração do gastrocnêmio. A redução do ganho de peso corporal foi promovida pela ingestão diária de GB (250 mg/Kg PC) sem alteração no consumo diário de alimento. Resultados similares foram observados em camundongos (Li, Li, Wang & Yang, 2014) e ratos (Zhao, Gao, Zhang & Li, 2016) alimentados com dieta HF tratados com polissacarídeos isolados do GB. Quanto a menor ingestão hídrica, pode-se atribuir à própria formulação da dieta HC, ou seja, maior conteúdo de água, maior conteúdo de gordura e menor de proteína; juntos esses fatores resultam em maior disponibilidade de água, maior produção metabólica de água e menor *clearance* renal resultante da necessidade de menor excreção de produtos nitrogenados.

O índice de adiposidade, usado como indicador de obesidade por permitir uma avaliação precisa do percentual de gordura corporal, apresentou-se elevado em ratos alimentados pela dieta HC, configurando uma obesidade central ou visceral, além de um maior conteúdo de lipídios no fígado. Medidas da resistência à insulina correlacionam-se significativamente com o grau de adiposidade abdominal em seres humanos. Estudos mostraram que a elevada adiposidade intra-abdominal está associada ao aumento na RI e intolerância à glicose (Després & Lemieux, 2006), o que está de acordo com nossos resultados.

A RI leva a um aumento na lipólise do tecido adiposo e ácidos graxos livres (AGL) circulantes, que sobrecarregam o fígado se não forem oxidados (Mittendorfer, Yoshino, Patterson & Klein, 2016). Este maior aporte de AGL no fígado aumenta a síntese de TGA e a produção/exportação de VLDL na zona perivenosa, levando a hipertrigliceridemia (Bazotte, Silva & Schiavon, 2014). Um aumento de TGA e VLDL plasmáticos foi observado em ratos alimentados com dieta HC (Lima, Silveira, Haibara & Coimbra, 2008). Portanto, a hipersecreção de VLDL e hipertrigliceridemia são características marcantes da

hiperinsulinemia e RI (Sparks, Sparks & Adeli, 2012). Além disto, dietas ricas em carboidratos induzem a lipogênese *de novo* hepática, através da elevada glicólise, formação de piruvato, geração mitocondrial de citrato e posterior conversão a AGL no citosol (Rolo, Teodoro & Palmeira, 2012), contribuindo para a deposição e gordura *in situ* e levando a uma esteatose massiva (da Silva-Santi, et al., 2016).

Muitos pacientes com NAFLD tem concentração de glicose de jejum normal, mas elevados níveis de insulina de jejum e resistência hepática à insulina, indicando que esses são fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 (Petta et al., 2016). O tratamento com GB não só reduziu o índice de adiposidade, o que, em parte, pode justificar a redução no ganho de peso corporal, já que não houve alteração no peso do músculo esquelético, como também reverteu a esteatose hepática. Nossos resultados mostraram que o GB promoveu uma melhora na RI acompanhada de uma reversão na esteatose.

Dentro deste contexto, camundongos alimentados com dieta HF e tratados com polissacarídeos do GB reduziram a expressão de genes lipogênicos e o acúmulo de TG hepático (Li, Li, Wang & Yang, 2014; Luo, Cai, Yan, Sun & Corke, 2004); e, ratos alimentados com dieta HC e tratados com GB, apresentaram redução plasmática de TG e VLDL (dados não publicados). Assim, o GB demonstra possuir atividade biológica para a regulação do metabolismo lipídico e desenvolvimento de esteatose.

Outro caráter importante da dieta HC é que a sobrecarga de AGL no hepatócito induz a danos celulares oxidativos (Ibrahim, Kohli & Gores, 2011). Estudos mostraram que a esteatose no fígado está associada ao estresse oxidativo, incluindo à elevada produção de EROs mitocondrial, redução dos conteúdos de GSH mitocondrial e citosólico, elevada peroxidação lipídica e reduzida atividade de enzimas antioxidantes (Campos et al., 2012; Gilglioni et al., 2012). Os fígados de ratos HCD deste estudo apresentaram quadro semelhante, com aumento de EROs mitocondrial, redução de GSH mitocondrial e citosólico e uma tendência de maior peroxidação lipídica. O tratamento com GB foi capaz de reduzir os níveis de EROs e a peroxidação lipídica, com uma tendência de aumentar o GSH citosólico, sem entretanto, alterar o GSH mitocondrial.

A atividade antioxidante do GB pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e vitaminas, que agem neutralizando radicais livres, detectados pela técnica cromatográfica (Donno, Beccaro, Mellanno, Cerutti & Bounous, 2015; Mikulic-Petkovsek, Slatnar, Stampar & Veberic, 2012). Além disso, em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e tratados com polissacarídeos isolados de GB por 24 semanas, o GB foi capaz de ativar PI3K/Akt/Nrf2, reprimir a ativação da enzima JNK, aumentar a expressão da catalase, superóxido dismutase e GSH; concomitantemente diminuindo os níveis de EROs e melhorando a RI (Yang et al., 2014).

Na mitocôndria, o ciclo redox de GSH é o principal sistema antioxidante endógeno que provê proteção contra EROs (Mari, Morales, Colell, Garcia-Ruiz & Fernandez-Checa, 2009). Embora a geração de EROs mitocondrial tenha reduzido com o tratamento, os níveis de GSH mitocondrial não foram reestabelecidos, sugerindo que as enzimas do ciclo redox do GSH possam estar alteradas. Estudos adicionais serão necessários para confirmar esta hipótese.

Outro importante efeito do GB foi evitar os danos celulares induzidos pela geração de EROs, como observado pela redução nos níveis de peroxidação lipídica em fígados de ratos tratados com dieta HC. Um produto desse processo é o malondialdeído (MDA), composto altamente reativo (Kubow, 1990), formado pela ação de EROs nos lipídios da membrana celular, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, é considerado marcador do grau de peroxidação lipídica no organismo (Borek, 2004). A diminuição nos níveis de MDA já foi observada em estudos que testaram GB em animais (Amagase, Sun & Borek, 2009; Wu, Guo & Zhao, 2006), assim como o potencial antioxidante do GB *per se* (Amagase, Sun & Borek, 2009; Huang, Lu & Shen, 1999; Li, 2007; Ming, Guanhua, Zhanhai, Guang & Xuan, 2009; Nardi et al., 2016).

A homeostase glicêmica depende de um balanço entre a liberação hepática de glicose e a utilização de glicose por tecidos periféricos dependentes de insulina (músculo esquelético e tecido adiposo). Nossos resultados mostraram que animais HCD apresentaram uma aumentada liberação hepática de glicose tanto basal quanto estimulada por glucagon, hormônio com ação glicogenolítica (Unger, 1971), indicando um maior conteúdo de glicogênio hepático e inalterada sensibilidade ao glucagon.

A RI está intimamente associada com a diminuída utilização de glicose e *down-regulation* das enzimas glicolíticas hepáticas (Agius, 2007). Na condição de hiperinsulinemia e hiperglicemia, há relatos que a síntese de glicogênio se encontra elevada (Petersen, Vatner & Shulman, 2017). E além disso relatos em que animais alimentados com dieta HF apresentaram baixo conteúdo de glicogênio e baixa atividade de enzimas glicolíticas (Yang et al., 2014). O fato de não termos observado alteração na taxa de glicólise estimulada por glucagon sugere que diferentes composições da dieta podem alterar tanto a utilização quanto a estocagem de glicose no fígado.

A liberação de glicose basal e estimulada por glucagon não foi alterada nos animais tratados com GB, assim como não houve diferença na taxa de glicólise estimulada por glucagon nos animais alimentados com dieta HC. Estes resultados não foram compatíveis com estudos que mostraram que os polissacarídeos do GB foram eficazes em aumentar a atividade e a expressão de mRNA da hexoquinase e da piruvato quinase, enzimas chave da via glicolítica, em animais alimentados com dieta HF (Yang et al., 2014; Zhu et al., 2013), reafirmando a diferença de resultados em relação a composição da dieta.

O GB também foi efetivo em inibir a produção de glicose estimulada por L-alanina, corroborando com estudos que demonstraram o efeito do GB em suprimir a gliconeogênese por diminuir a expressão de RNAm de enzimas chave desta via, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase (Yang et al., 2014). Além de promover aumento na translocação dos transportadores de glicose (GLUT 4) no músculo esquelético (Zhao, Li & Xiao, 2005) e no tecido adiposo (Zhao et al., 2014). A diminuída taxa de glicólise observada durante a infusão de L-alanina no grupo HCDGB pode ser efeito do exaurido estoque de glicogênio após a ação do glucagon e/ou da reduzida gliconeogênese.

A elevada liberação de glicose quando fígados foram infundidos com L-alanina, confirmam a elevada produção de glicose hepática característica do quadro de RI (Bazotte, Silva & Shiavon, 2014; Petersen, Vatner & Shulman, 2017), devido a supressão do efeito inibitório da insulina sobre a gliconeogênese, o que também foi verificado por Yang et al. (2014) em ratos alimentados com dieta HF. Além disto, o elevado fluxo de AGL para o fígado

acelera a gliconeogênese por prover uma fonte contínua de energia e substrato (Boden, 1997).

Nossos resultados demonstraram que o modelo experimental de animais alimentados com dieta HC (130 dias) desenvolveram características sistêmicas e hepáticas da SM observada em humanos, a saber: (i) aumento no ganho de peso corporal associado ao aumento da adiposidade e redução da massa magra; (ii) hiperinsulinemia e RI; (iii) rompimento da homeostase glicêmica associada ao aumento do estoque de glicogênio e da gliconeogênese hepática a partir da L-alanina; (vi) esteatose hepática e (v) aumento do estresse oxidativo associado à redução dos sistemas antioxidantes hepáticos. O GB (250 mg/Kg)/60 dias), por sua vez, se mostrou eficiente neste caso por: (i) reduzir parcialmente o ganho de peso promovido pela dieta HC associado à redução parcial da adiposidade; (ii) restabeleceu a normoinsulinemia e reduziu a RI; (iii) restabeleceu parcialmente a homeostase glicêmica por reduzir a gliconeogênese a partir da L-alanina; (vi) reduziu o triacilglicerol hepático e (v) reduziu o estresse oxidativo mitocondrial no fígado.

Portanto, efeitos sistêmicos, hepáticos e periféricos do GB, como redução da insulinemia, redução do estresse oxidativo e da gliconeogênese hepáticos, associados a melhora na RI, tornam o GB um importante coadjuvante no tratamento de síndromes relacionadas à perda da homeostase glicêmica e lipidêmica, como a SM e DM2.

5. REFERÊNCIAS

- Agius, L. (2007). New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 587-605.
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic medicine*, 23(5), 469-480.
- Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702-1717.
- Amagase, H., Sun, B., & Borek, C. (2009). Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. *Nutrition Research*, 29(1), 19-25.
- Bazotte, R. B., Silva, L. G., & Schiavon, F. P. (2014). Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin?. *Cell Cycle*, 13(16), 2494-2500.
- Bergmeyer, H.U.; Bernt, E. (1974) Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. *Methods of enzymatic analysis*, 1205-15,
- Bernardis, L. L., & Patterson, B. D. (1968). Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*, 40(4), 527-528.
- Berson, A., De Beco, V., Letteron, P., Robin, M. A., Moreau, C., El Kahwaji, J., ... Pessayre, D. (1998). Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 114(4 I), 764–774. [http://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70590-6](http://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70590-6)
- Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E. L., & Salgueiro-Pagadigorria, C. L. (2003). Técnica de centrifugação e fracionamento celular. In *Métodos de laboratório em bioquímica* (pp. 77-101).
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46(1), 3-10.
- Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 333-341.
- Campos, L. B., Gilglioni, E. H., Garcia, R. F., do Nascimento Brito, M., Natali, M. R. M., Ishii-Iwamoto, E. L., & Salgueiro-Pagadigorria, C. L. (2012). Cimicifuga racemosa impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 680-689.
- Celleno, L., Tolaini, M. V., D'Amore, A., Perricone, N. V., & Preuss, H. G. (2007). A dietary supplement containing standardized Phaseolus vulgaris extract influences body composition of overweight men and women. *International journal of medical sciences*, 4(1), 45.

Cesaretti, M. L. R., & Kohlmann Junior, O. (2006). Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50, 190-197

Cheng, J., Zhou, Z. W., Sheng, H. P., He, L. J., Fan, X. W., He, Z. X., & Cao, C. (2015). An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug design, development and therapy*, 9, 33.

Da Silva-Santi, L. G., Antunes, M. M., Caparroz-Assef, S. M., Carbonera, F., Masi, L. N., Curi, R., & Bazotte, R. B. (2016). Liver fatty acid composition and inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. *Nutrients*, 8(11), 682

De Souza Zanchet, M. Z., Nardi, G. M., de Oliveira Souza Bratti, L., Filippin-Monteiro, F. B., & Locatelli, C. (2017). *Lycium barbarum* Reduces Abdominal Fat and Improves Lipid Profile and Antioxidant Status in Patients with Metabolic Syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

Després, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic Syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887.

Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., & Bounous, G. (2015). Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of functional foods*, 18, 1070-1085.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem*, 226(1), 497-509.

Garcia, R. F., Gazola, V. A. F. G., Hartmann, E. M., Barrena, H. C., Obici, S., Nascimento, K. F., & Bazotte, R. B. (2008). Oral glutamine dipeptide promotes acute glycemia recovery in rats submitted to long-term insulin induced hypoglycemia. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2), 229.

Gazola, V. A. F. G., Garcia, R. F., Curi, R., Pithon-Curi, T. C., Mohamad, M. S., Hartmann, E. M., Barrena, H. C., & Bazotte, R. B. (2007). Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia. *Cell biochemistry and function*, 25(2), 211-216.

Gilgioni, E. H., Campos, L. B., Oliveira, M. C., Garcia, R. F., Ambiel, C. R., Buzzo, A. J. D. R., & Salgueiro-Pagadigorria, C. L. (2012). Beneficial effects of tibolone on blood pressure and liver redox status in ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 68(5), 510-520.

Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, 74(1), 214-226.

Hribal, M. L., & Accili, D. (2002). Mouse models of insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(5), E977-E981.

- Huang, Y., Lu, J., & Shen, Y. (1999). The protective effects of total flavonoids from *Lycium barbarum* L. on lipid peroxidation of liver mitochondria and red blood cell in rats. *Wei sheng yan jiu= Journal of hygiene research*, 28(2), 115-116.
- Ibrahim, S. H., Kohli, R., & Gores, G. J. (2011). Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 53(2), 131.
- Kubow, S. (1990). Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 67-71.
- Li, W., Li, Y., Wang, Q., & Yang, Y. (2014). Crude extracts from *Lycium barbarum* suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation. *BioMed research international*, 2014.
- Li, X. M. (2007). Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *International journal of biological macromolecules*, 40(5), 461-465.
- Lima, D. C., Silveira, S. A., Haibara, A. S., & Coimbra, C. C. (2008). The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metabolic brain disease*, 23(4), 361-373.
- Lima, M. L. R., Leite, L. H., Gioda, C. R., Leme, F. O., Couto, C. A., Coimbra, C. C., ... & Ferrari, T. C. A. (2016). A novel wistar rat model of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease induced by sucrose-rich diet. *Journal of diabetes research*, 2016.
- Lowry, O. H. J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luo, Q., Cai, Y., Yan, J., Sun, M., & Corke, H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life sciences*, 76(2), 137-149.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2685-2700.
- McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology*, 36(1), 14-20.
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). HPLC–MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135(4), 2138-2146.
- Ming, M., Guanhua, L., Zhanhai, Y., Guang, C., & Xuan, Z. (2009). Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and

oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. *Food Chemistry*, 113(4), 872-877.

Mittendorfer, B., Yoshino, M., Patterson, B. W., & Klein, S. (2016). VLDL triglyceride kinetics in lean, overweight, and obese men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(11), 4151-4160.

Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., ... & Eisenberg, M. J. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(14), 1113-1132.

Nardi, G. M., Januario, A. G. F., Freire, C. G., Megiolaro, F., Schneider, K., Perazzoli, M. R. A., ... & Niero, R. (2016). Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. *Pharmacognosy research*, 8(Suppl 1), S42.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

Pappachan, J. M., Babu, S., Krishnan, B., & Ravindran, N. C. (2017). Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *Journal of clinical and translational hepatology*, 5(4), 384.

Petta, S., Valenti, L., Bugianesi, E., Targher, G., Bellentani, S., Bonino, F., ... & Mancini, M. (2016). A "systems medicine" approach to the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*, 48(3), 333-342.

Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 572.

Qian, D., Ji, R. F., Gao, W., & Huang, L. Q. (2017). Advances in research on relationships among Lycium species and origin of cultivated Lycium in China. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 42(17), 3282-3285.

Rolo, A. P., Teodoro, J. S., & Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 59-69.

Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806.

Sparks, J. D., Sparks, C. E., & Adeli, K. (2012). Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2104-2112.

Unger, R. H. (1971). Glucagon physiology and pathophysiology. *New England Journal of Medicine*, 285(8), 443-449.

Wu, H., Guo, H., & Zhao, R. (2006). Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi*, 126(5), 365-371.

Yang, Y., Li, W., Li, Y., Wang, Q., Gao, L., & Zhao, J. (2014). Dietary Lycium barbarum polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.

Yao, X., Peng, Y., Xu, L. J., Li, L., Wu, Q. L., & Xiao, P. G. (2011). Phytochemical and biological studies of Lycium medicinal plants. *Chemistry & biodiversity*, 8(6), 976-1010.

Zhao, R., Li, Q., & Xiao, B. (2005). Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi*, 125(12), 981-988.

Zhao, R., Qiu, B., Li, Q., Zhang, T., Zhao, H., Chen, Z., ... & Zheng, X. (2014). LBP-4a improves insulin resistance via translocation and activation of GLUT4 in OLETF rats. *Food & function*, 5(4), 811-820.

Zhao, R., Gao, X., Zhang, T., & Li, X. (2016). Effects of Lycium barbarum polysaccharide on type 2 diabetes mellitus rats by regulating biological rhythms. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(9), 1024.

Zhu, J., Liu, W., Yu, J., Zou, S., Wang, J., Yao, W., & Gao, X. (2013). Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of Lycium barbarum L. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 8-16.

ANEXO 1

Lista de abreviações

AGL - Ácidos graxos livres

AUC - *area under curve*

CON - Grupo controle

CT - Colesterol total

DCFH-DA - Diclorofluoresceína diacetato

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

EP - Erro padrão

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GB - Goji berry

GSH - Glutathiona reduzida

HC - Dieta rica em carboidratos simples

HCD - Grupo alimentado com dieta HC

HCDGB - Grupo alimentado com dieta HC tratado com GB

HFD - *High fat diet* (dieta rica em gordura)

IvGTT - *Teste de tolerância à glicose intravenoso*

KH - Krebs/Henseleit-bicarbonato puro

MDA - Malondialdeído

NAFLD - Nonalcoholic fatty liver disease

OPT - O-ftalaldeído

PC - Peso corporal

RI - Resistência à insulina

SM - Síndrome metabólica

TGA - Triacilglicerol

TBARS - Teste substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de figuras:

Tabela 1: Parâmetros biométricos e plasmáticos

Figura 1: Teste de tolerância à glicose

Figura 2: Índice de adiposidade

Figura 3: Perfil lipídico hepáticos

Figura 4: Estresse oxidativo hepático

Figura 5: Perfusão de fígado *in situ*