



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de carboidratos

André Barroso Heibel

Brasília

2017



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de carboidratos em animais submetidos à suplementação de ferro

André Barroso Heibel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Prof^ª. Sandra Fernandes Arruda

Brasília

2017



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da dissertação de mestrado do aluno André Barroso Heibel, intitulada “Efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de carboidratos em animais submetidos à suplementação de ferro”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda

Orientadora - Departamento de Nutrição - Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Angélica Amâncio Amato

Membro - Departamento de Farmácia - Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Eliane Said Dutra

Membro - Departamento de Nutrição - Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Nathália Marcolini Pelúcio Pizato

Suplente - Departamento de Nutrição - Universidade de Brasília (UnB)

Brasília
2017

AGRADECIMENTOS

A minha família, principalmente minha mãe Iracema, por sempre estar ao meu lado e ser meu porto seguro.

Aos amigos e sócios da GENES e da SCIENTIA, Bruno, Heyder, Jeff, Lucas, Schweitzer, Paulo, Pedro e Victor que me exigiram nada menos que a excelência ao longo de toda minha caminhada profissional.

À professora Sandra, à Marcela e à Clara por terem sido fundamentais para conclusão do projeto e por todo o aprendizado, acadêmico ou não, que me proporcionaram.

À Laura, que sempre me fez crescer e ver as coisas de um ponto de vista diferente, tornando-me uma pessoa melhor a cada dia. Obrigado por tudo!

Aos colegas do laboratório Alessandra, Caio, Mário, Laís, Lara, Luiz, Pretto e Thaís pela companhia nos momentos fora da bancada.

Ao MHL e ao GPRO - Luana, Carol, Ting e Daniel, por terem me colocado no mundo científico.

Aos membros da banca de defesa e de qualificação, Prof^a. Angélica, Prof^a. Marina, Prof^a. Eliane e Prof^a. Nathália.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP- UnB) pela concessão da bolsa de estudos e fomento a pesquisa.

A todos que tiverem algum contato comigo e me fizeram crescer como pessoa, como nutricionista e/ou como pesquisador melhor, em qualquer âmbito que se possa ser avaliado.

“Remember to look up at the stars and not down at your feet.
Try to make sense of what you see and what make the universe exist. Be curious.
And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at.
It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

RESUMO

Compostos bioativos dietéticos podem melhorar a homeostase de glicose ao passo que a ingestão de ferro pode prejudicar a regulação do metabolismo de glicose e respostas insulinêmicas. Este estudo investigou o efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de carboidratos e a resposta redox em ratos suplementados ou não com ferro dietético. Ratos wistar machos foram tratados com uma das seguintes dietas: CT: dieta controle (AIN-93G); + Fe: dieta enriquecida com ferro; Tuc: dieta controle + 15% de tucum-do-cerrado ou Tuc + Fe: dieta enriquecida com ferro + 15% de tucum-do-cerrado. A suplementação de ferro aumentou a peroxidação lipídica e os níveis de proteínas carboniladas no músculo esquelético. Além disso, a suplementação do metal provocou aumento na atividade hepática de glicocinase e fosfofrutoquinase. Por outro lado, houve redução de glicose-6-fosfatase e nos níveis de diversos transcritos *Slc2a2* (intestino), *Slc2a4* (músculo) e *Prkaa2 α* (músculo). A ingestão de tucum-do-cerrado aumentou a expressão hepática de *Slc2ac*, *Prkaa1 α* e *Prkaa2 α*, mas reduziu a atividade de G6pase. No intestino, o fruto diminuiu os níveis de *Slc5a1* ao passo que causou o mesmo efeito nos genes *Slc2a4* e *Prkaa2 α* no músculo esquelético em relação ao controle. A associação entre ingestão de tucum-do-cerrado e suplementação de ferro aumentou a transcrição de *Prkaa1 α* e *Pck1*, comparado aos grupos controle e Fe^{+} , ao passo que os níveis de *Slc2a2* foram aumentados em relação ao grupo com ingestão aumentada de ferro. O co-tratamento também reduziu a atividade hepática de G6pase em relação a todos os grupos. Não houveram diferenças estatísticas no peso, ingestão alimentar, eficiência energética, glicemia e insulinemia em jejum. Em conjunto, os resultados sugerem que a ingestão de tucum-do-cerrado pode induzir modulação da expressão de *Prkaa1 α* e *Prkaa2 α*, podendo inibir assim enzimas-chave da gliconeogênese como a G6Pase e a PEPCCK, além de favorecer a captação de glicose por meio da regulação de GLUT 2 no fígado. Além disso, a suplementação moderada de ferro parece promover estímulo a enzimas relacionadas a glicólise, como a GK e a PFK1, inibindo enzimas gliconeogênicas como a G6Pase e PEPCCK.

Palavras-chave: tucum-do-cerrado, fitoquímicos, ferro, gliconeogênese, glicólise, *Prkaa*

ABSTRACT

Dietary phytochemicals may improve glucose metabolism while iron excess seems to be associated to impaired glucose homeostasis and insulin responses. This study investigated the effect of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) consumption on the carbohydrate metabolism and redox response in rats supplemented or not with dietary iron. Male wistar rats were treated with one of the following diets: CT: control diet (AIN-93G); +Fe: iron-enriched diet; Tuc: control diet + 15% tucum-do-cerrado or Tuc+Fe: iron-enriched diet + 15% tucum-do-cerrado. Iron supplementation increased muscle lipid and protein oxidation, hepatic glucokinase (GK) and phosphofruktokinase 1 (PFK1) activities and decreased hepatic glucose-6-phosphatase (G6Pase), intestinal Slc2a2 and muscle Slc2a4 and Prkaa2 α mRNA levels compared to CT group. Tucum-do-cerrado consumption (Tuc) increased hepatic Slc2a2, Prkaa1 α , Prkaa2 α and intestinal Slc5a1 mRNA levels, also decreased hepatic G6Pase activity, muscle Slc2a4 and Prkaa2 α in relation to CT group. The association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet increased hepatic Prkaa1 and Pck1 compared to the CT and +Fe groups, intestinal Slc2a2 mRNA levels compared to the +Fe group, while decreased hepatic G6Pase activity in relation to the CT, +Fe and Tuc+Fe groups and muscle Slc2a4 and Prkaa2 α compared to CT group. These results suggest that tucum-do-cerrado consumption might induce Prkaa1 α and Prkaa2 α expression, which may inhibit gluconeogenic rate limiting enzymes, G6Pase and PEPCK and upregulates GLUT2 hepatic glucose uptake. In addition, moderate iron supplementation improves intracellular hepatic glucose response, stimulating the glycolytic rate limiting enzymes GK and PFK1 while inhibiting gluconeogenic enzymes G6Pase and PEPCK.

Keywords: tucum-do-cerrado, phytochemicals, iron, gluconeogenesis, glycolysis, Prkaa

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01

Figura 01. Cascata regulatória da insulina e seus pontos de controle. Referência: GUO, 2014.

Figura 02. Regulação transcricional de parte do metabolismo de ferro. Referência: IMAM et al., 2017.

Figura 03. Regulação do metabolismo de ferro. Referência: NEMETH; GANZ, 2009.

Figura 04. Representação dos danos à biomoléculas mediado por radicais livres. Referência: BHAT et al., 2015.

Figura 05. Representação esquemática dos mecanismos pró- e antioxidantes em sistemas biológicos de mamíferos. Referência: IMAM et al., 2017.

CAPÍTULO 02

Figura 01: Peroxidação lipídica e conteúdo de carbonil no músculo de ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média \pm desvio padrão (n=6). * Diferença estatística em relação ao grupo CT. \$ Diferença estatística em relação ao grupo Tuc. (p < 0.05).

Figura 02: Concentração de glicogênio muscular e hepático em ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média \pm desvio padrão (n=6). \$ Diferença estatística em relação ao grupo Tuc. (p < 0.05).

Figura 03: Níveis de mRNA de Slc5a1 (SGLT1) e Slc2a2 (GLUT2) e da atividade de α -glicosidase em ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a

média ± desvio padrão (n=6). * Diferença estatística em relação ao grupo CT. # Diferença estatística em relação ao grupo +Fe.

Figura 04: Níveis de mRNA de Slc2a2 (GLUT2), Prkaa1 (AMPK- α 1), Prkaa2 (AMPK- α 2) e Pck1 (Pepck1) no fígado de ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média ± desvio padrão (n=6). * Diferença estatística em relação ao grupo CT. # Diferença estatística em relação ao grupo +Fe. \$ Diferença estatística em relação ao grupo Tuc. (p < 0.05).

Figura 05: Atividade de glicoquinase (GK), fosfofrutoquinase (PFK1), Glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no fígado de ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média ± desvio padrão (n=6). * Diferença estatística em relação ao grupo CT. # Diferença estatística em relação ao grupo +Fe. \$ Diferença estatística em relação ao grupo Tuc. (p < 0.05).

Figura 06: Níveis de mRNA de Slc2a4 (GLUT4), Prkaa1 (AMPK- α 1) e Prkaa2 (AMPK- α 2) em músculo de ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média ± desvio padrão (n=6). * Diferença estatística em relação ao grupo CT. # Diferença estatística em relação ao grupo +Fe. \$ Diferença estatística em relação ao grupo Tuc. (p < 0.05).

Figura 07: Atividade específica de hexokinase (HK) e fosfofrutoquinase (PFK1) em músculo de ratos tratados com dieta controle (CT), enriquecida com ferro (+Fe), acrescentada de tucum-do-cerrado (Tuc) e a associação entre tucum-do-cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe) em 12 semanas de tratamento. Os dados correspondem a média ± desvio padrão (n=6).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01

Tabela 01. Composições das dietas dos grupos experimentais e controle. Os valores encontram-se em gramas de ingrediente/kg de dieta. (REEVES et al., 1993).

Tabela 02. Composição do Mix Mineral da dieta padrão AIN-93G.

Tabela 03. Composição do Mix Vitamínico da dieta padrão AIN-93G

Tabela 04. Sequência de primers utilizados com os respectivos números de acesso no GenBank.

CAPÍTULO 02

Tabela 01. Sequência de primers utilizados com os respectivos números de acesso no GenBank.

Tabela 02. Efeito da ingestão de tucum-do-cerrado e da suplementação de ferro no peso corporal final, ingestão alimentar total, ingestão energética diária, razão da eficiência energética e alimentar depois de 12 semanas de tratamento.

Tabela 03. Efeito da ingestão de tucum-do-cerrado e da suplementação de ferro na atividade específica de enzimas antioxidante em músculo de ratos suplementados ou não com ferro durante 12 semanas.

Tabela 04. Efeito da ingestão de tucum-do-cerrado e da suplementação de ferro na glicemia e insulinemia de ratos suplementados ou não com ferro durante 12 semanas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Difosfato de adenosina

AIN-93G: Dieta padrão para roedores em crescimento

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

ARE: Elemento responsivo a antioxidantes

ATP: trifosfato de adenina e

cAMP: AMP cíclico

CAT: Catalase

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CEUA: Comitê de Ética de Uso de Animais

ChREBP: Elemento responsivo a carboidratos

CREBP: Proteína de ligação do elemento responsivo a AMP cíclico

Dcytb: Enzima citocromo b redutase duodenal

EGCG: Epigallocatequina galato

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FBPase: fructose-1,6-bifosfatase

Fe⁺²: Ferro ferroso

Fe⁺³: Ferro férrico

FPN: Ferroportina

G6Pase: glicose-6-fosfatase

G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase

GIP: Peptídeo insulino-trófico dependente de glicose

GK: glicoquinase

GLUT2: transportador de glicose 2

GLUT4: transportador de glicose 4

GLP1: Peptídeo semelhante ao glucagon 1

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSH: Glutathione reduzida

GST: Glutathione S-transferase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HK: hexoquinase

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IREs: Elementos responsivos ao ferro
IRP1 e IRP2: Proteínas reguladores de ferro 1 e 2
KOH: hidróxido de potássio
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA: Malondialdeído
mRNA: RNA mensageiro
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADP⁺: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
Nrf2: Fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O^{•-}: Ânion superóxido OH⁻: Íon hidroxila
O₂: Oxigênio molecular
OMS: Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻: Peroxinitrito
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PFK1: fosfofrutoquinase 1
PGC-1alpha: co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PK: piruvato quinase
PPARs: Receptores ativadores de proliferação de peroxissoma
RDA: Ingestão Dietética Recomendada
SGLT-1: Cotransportador de sódio e glicose 1
SOD: Superóxido dismutase
T2D: diabetes mellitus tipo 2
TBARs: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tf: Transferrina
TfR1: Receptor de transferrina 1

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Metabolismo de carboidratos.....	19
2.2 Metabolismo de ferro.....	26
2.3 Radicais livres e estresse oxidativo.....	29
2.4 Metabolismo de carboidratos, ferro e estresse oxidativo.....	33
2.5 Defesas antioxidantes e o metabolismo de carboidratos.....	37
3 OBJETIVO GERAL.....	43
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
5 MÉTODOS.....	44
5.1 Animais.....	44
5.2 Tratamento experimental.....	44
5.3 Avaliação do consumo dietético e da variação de peso dos animais.....	47
5.4 Proteínas carboniladas no músculo.....	47
5.5 Peroxidação lipídica no músculo.....	48
5.6 Mensuração da atividade das enzimas antioxidantes.....	48
5.6.1 Homogeneização do tecido.....	48
5.6.2 Catalase (CAT).....	49
5.6.3 Glutathiona peroxidase (GPX).....	49
5.6.4 Glutathiona S-transferase (GST).....	49
5.6.5 Glutathiona redutase (GR).....	50
5.6.6 Superóxido Dismutase (SOD).....	50
5.7 Glicogênio hepático e muscular.....	51
5.8 Concentração de insulina sérica e glicose sanguínea em jejum.....	51
5.9 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	52
5.10 Determinação de transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos.....	53
5.11 Mensuração da atividade enzimática – metabolismo de carboidratos.....	55
5.11.1 α -glicosidase intestinal.....	55
5.11.2 Glicoquinase hepática e hexokinase muscular.....	56
5.11.3 Glicose-6-Fosfatase.....	56
5.11.4 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK).....	57
5.11.5 Fosfofrutoquinase (PFK-1).....	57
5.12 Proteínas totais nas amostras.....	58
5.13 Análise estatística.....	58
6 CAPÍTULO 2.....	59
6.1 INTRODUCTION.....	61
6.2 METHODS.....	62
6.2.1 Fruit collection.....	62
6.2.2 Experimental protocol.....	62
6.2.3 Food and energy efficiency ratios.....	63
6.2.4 Oxidative damage markers.....	63

6.2.5	Antioxidant enzymatic activity in muscle	63
6.2.6	Liver and muscle glycogen	64
6.2.7	Glycemia and insulin	64
6.2.8	mRNA extraction and transcripts levels	64
6.2.9	Carbohydrate-metabolism related enzymatic activity	66
6.2.10	Statistical analysis	68
6.3	RESULTS	68
6.4	DISCUSSION	76
6.5	REFERENCES	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - DISSERTAÇÃO	86

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em dois capítulos, sendo o primeiro composto pela introdução, revisão bibliográfica, objetivos e materiais e métodos. O segundo capítulo apresenta os resultados, discussão e conclusão da pesquisa no formato de um artigo original, intitulado “Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 glucose uptake via AMPK pathway”, submetido ao periódico “Nutritional Biochemistry”.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A prevalência global de diabetes mellitus (DM) em 2014 entre adultos foi de cerca de 9% da população mundial, correspondendo a 425 milhões de pessoas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde em cerca de 15 anos, essa doença será uma das dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2017). O diabetes mellitus tipo 2 e a resistência à insulina constituem ainda componentes desencadeadores e agravantes da síndrome metabólica (MANHEIMER, 2015; WONG, 2015), a qual atinge cerca de 35% dos indivíduos adultos e 50% dos idosos

A etiologia dessas doenças está associada à obesidade, baixo nível de atividade física, dietas com baixa ingestão de fibras e alto consumo de alimentos processados, baixo desenvolvimento econômico, condições familiares adversas e outros (MA, 2014; WHO, 2016).

Entre os aspectos dietéticos mais associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica, do diabetes mellitus e até mesmo da resistência à insulina estão o consumo excessivo de carboidratos simples de alto índice glicêmico e insulinêmico, além de uma ingestão inadequada de nutrientes essenciais, como vitaminas antioxidantes e minerais cofatores de enzimas. (MANHEIMER, 2015; MARTINI, 2010).

O ferro, apesar de ser um nutriente essencial, em excesso parece exercer papel negativo no metabolismo de carboidratos. A característica de doar e receber elétrons do ferro confere a esse elemento a capacidade de catalisar reações de geração de radicais livres (FENTON, 1899), os quais podem promover danos oxidativos a biomoléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos (IMAM et al., 2017). A conexão entre ferro e o metabolismo de carboidratos parece se dar, principalmente, pela promoção da disfunção mitocondrial celular causada pelo aumento do estresse oxidativo decorrente da maior geração de radicais livres. Os radicais livres estão ligados a prejuízos a biomoléculas e, por conseguinte, ao início, desenvolvimento e progressão de diversas doenças (ZHUANG, 2014; BERDOUKAS, 2015; LEE, 2016).

O aumento da concentração de ferritina, proteína associada à reserva de ferro, parece estar relacionado ao aumento no risco de desenvolvimento do DM tipo 2 (MA, 2014). Uma meta-análise indicou que indivíduos nos quintis superiores têm até 70% mais chance de desenvolver diabetes mellitus tipo 2. Entretanto, neste caso a ferritina pode ser considerada um

marcador de fase aguda de inflamação, não estando diretamente ligada ao consumo de ferro (KUNUTSOR et al., 2013).

Dentre os diversos mecanismos antioxidantes que evitam os danos oxidativos gerados pelos radicais livres destacam-se os não enzimáticos, composto por componentes dietéticos, tais como as vitaminas A, C, E, carotenoides e os polifenóis (MARTINI, 2010). Diversos estudos têm dado destaque aos polifenóis, metabólitos secundários das plantas, que apesar do caráter não-essencial ao organismo humano possuem potencial antioxidante e anti-inflamatório (DALVI, 2014; MARGINA, 2015; WANG, 2014).

A adaptação das plantas a climas e solos inóspitos parece aumentar a produção de compostos antioxidantes como forma de defesa do vegetal. Assim sendo, frutas colhidas em um bioma como o cerrado brasileiro apresentariam uma concentração maior desses compostos (SIQUEIRA, 2013). Estudos prévios do nosso grupo identificaram e caracterizaram o fruto tucum-do-cerrado (*Bactris setosa Mart*) como uma excelente fonte de compostos fenólicos em comparação com outros frutos regionais do Centro-Oeste brasileiro e com a maçã da variedade *Red Delicious (Malus domestica Borkh.)* (SIQUEIRA, 2013), além de um alto potencial antioxidante *in vivo* (FUSTINONI-REIS, 2016).

Considerando que o excesso de ferro pode promover a geração de radicais livres e consequente danos oxidativos a biomoléculas, condições essas associadas a etiologia de distúrbios do metabolismo de carboidratos e que os polifenóis são capazes de modular a resposta redox, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa Mart.*) no metabolismo de carboidratos em ratos suplementados ou não com ferro. Portanto, a hipótese desse trabalho é que o tucum-do-cerrado, fruto rico em compostos fitoquímicos, module o metabolismo de carboidratos indiretamente através da resposta redox e/ou diretamente através da modulação da expressão de moléculas envolvidas na absorção e metabolização de glicose como proposto por diferentes autores (UDANI et al., 2011; CHOI et al., 2013; WANG et al., 2014)

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo de carboidratos

O metabolismo de carboidratos é ponto inicial e central no estudo da bioenergética e da bioquímica em mamíferos. A digestão de glicídios inicia-se na boca, onde ocorre secreção de α -amilase salivar, enzima responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 das moléculas amido. No intestino delgado uma enzima semelhante é secretada pelo pâncreas por meio do ducto pancreático e responsável pela mesma função que exerce na cavidade oral. Uma vez que o amido, principal forma de carboidrato ingerido pelos humanos, é degradado à di e trissacarídeos a enzima α -glicosidase, ligada na borda em escova do intestino, atua quebrando as ligações entre os sacarídeos e liberando glicose no lúmen do intestino (AL-ASRI, 2015).

Após a liberação no lúmen intestinal, a glicose é absorvida pelos enterócitos ativamente por meio do co-transportador de sódio e glicose 1 (SGLT-1). Além do SGLT-1, debate-se acerca da ação do transportador de glicose 2 (GLUT-2) na captação de glicose do lúmen do intestino. Dados mostram que esse transportador pode ser movido da membrana basolateral para a membrana apical em situações de aumento na concentração de glicose no intestino, por outro lado, existe evidência mostrando que isso não acontece de fato e o GLUT-2 atua apenas no transporte de glicose do enterócito para a circulação (RÖDER, 2014; STELMAŃSKA, 2008).

Além da absorção mediada por transportadores é possível que a glicose seja absorvida de maneira paracelular, isto é, entre as membranas laterais dos enterócitos. Essa via de absorção depende de uma grande quantidade de glicídios presentes no lúmen. Uma concentração elevada de glicose no lúmen também pode levar a translocação do transportador de glicose 2 (GLUT-2) até a borda em escova. Por outro lado, a frutose é absorvida de maneira específica por meio do transportador de glicose 5 (GLUT-5) (RODER, 2014).

Uma vez dentro do enterócito a glicose é transportada pelo transportador de glicose 2 (GLUT-2) para a circulação portal e torna-se disponível para absorção por outras células. Acredita-se que o GLUT-2 e o SGLT-1 também exerçam funções neuroendócrinas, como a regulação da secreção de incretinas como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Além das incretinas, o GLUT-2 parece ter efeito na secreção de insulina. Animais que não expressam estas proteínas de transporte tem menores níveis de insulinemia (RODER, 2014).

As principais ações das incretinas estão relacionadas ao metabolismo de glicose. Aumento na captação de glicose hepática, muscular e adiposa, diminuição da gliconeogênese, aumento na síntese e secreção de insulina, proliferação de células β -pancreáticas, elevação da lipogênese e glicogênese nos músculos, além dos efeitos no sistema nervoso central como redução no apetite, aumento na sensação de saciedade são efeitos mais relevantes das incretinas (OPINTO, 2013).

O uso de drogas semelhantes a incretinas vem crescendo atualmente. A justificativa para o uso de tais fármacos é o efeito das incretinas no metabolismo de carboidratos e no controle do peso. Indivíduos obesos e diabéticos têm menores níveis de incretinas (GLP-1 e GIP) plasmáticas que indivíduos saudáveis. Além dos análogos de incretinas, os inibidores da enzima dipetidil-dipeptidase 4 (DPP-4) são amplamente prescritos no âmbito do tratamento de sobrepeso, obesidade e diabetes mellitus tipo 2. A enzima DPP-4 é responsável pela degradação do GLP-1 e do GIP, logo, sua inibição tornaria estas incretinas ativas durante mais tempo, promovendo assim os benefícios associados às ações das incretinas (OPINTO, 2013).

Uma vez na corrente sanguínea e devido a sua natureza hidrofílica, a glicose se difundirá livremente sem a necessidade de transportadores ou proteínas plasmáticas na corrente sanguínea. O aumento da glicemia provocará uma maior captação de glicose plasmática por meio do transportador de glicose 2 (GLUT 2) em células β -pancreáticas. Essa glicose será disponibilizada para as vias anabólicas do metabolismo energético, como a glicólise aeróbica, o ciclo do ácido tricarboxílico e a fosforilação oxidativa. O saldo de todas essas vias é a formação de moléculas de trifosfato de adenosina e aumento da razão ATP:ADP intracelular. Essa razão é percebida pelo receptor ionotrópico de sulfoniluréias, proteína transmembranar ligada à um canal de potássio dependente de ATP. Com o aumento da razão ATP:ADP o receptor de sulfoniluréias torna-se sensível, altera sua própria conformação espacial e inibe o efluxo de potássio intracelular, despolarizando assim a membrana plasmática da célula. A alteração no potencial elétrico de membrana leva à um influxo de cálcio, que causa a secreção das vesículas lipídicas contendo a insulina anteriormente sintetizada pelas células β -pancreática (ASHCROFT, 2005).

Ao ser secretada na corrente sanguínea a insulina se ligará aos receptores de insulina, uma proteína transmembranar com atividade de tirosina quinase. A ligação entre hormônio e receptor causa auto-fosforilação, ativando-o. Uma vez ativado, o receptor de insulina induzirá fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS). Duas principais respostas podem ser desencadeadas com a fosforilação do IRS: a ativação da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-

3 quinase), responsável pelas principais funções metabólicas da insulina, ou a ativação da via quinase regulada por sinal extracelular (ERK), envolvida prioritariamente com crescimento celular (GUO, 2014).

A sinalização para tais processos inicia-se com a auto fosforilação do receptor, que induzirá uma segunda fosforilação do IRS em um resíduo de tirosina. Com a segunda adição do grupamento fosfato o IRS torna-se ‘alvo’ da ligação da PI-3 quinase. Com a ativação da desta enzima ocorre a geração de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, segundo mensageiro ativador das proteínas quinases 1 e 2 (PDK-1 e PDK-2 – também chamado de mTORC-2). PDK-1 e PDK-2 mediarão o efeito da insulina por meio da proteína quinase B, também chamada de Akt (GUAL, 2005; GUO, 2014).

A Akt representa uma das mais importantes vias de sinalização intracelular, mediando processos metabólicos e de sobrevivência celular. O alvo da rapamicina em mamíferos 2 (mTORC-2), por meio da Akt, regula expressão de diversos genes da homeostase energética, como a proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis (SREBP-1). Além disso, o mTORC-2 suprime a síntese do fator de transcrição “forkhead”, o Foxo-1, responsável por promover gliconeogênese, mostrando assim o mecanismo de ação pelo qual a insulina inibe gliconeogênese no tecido hepático. O mTORC-1 também é ativado pelo IRS-1 e tem como substrato a proteína quinase ribossomal S6 (S6K) e a proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP), ambos responsáveis por promover síntese proteica. Ocorre também lipogênese, isto é, síntese de lipídeos mediada por mTORC-1 por meio da fosforilação da proteína fosfatase de ácido fosfático, a lipina-1 (GUO, 2014).

A Akt também é responsável pela regulação da síntese de glicogênio por meio da desfosforilação e ativação da glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) – enzima reguladora da glicogênio sintase, que de fato faz a construção da cadeia glicídica dentro do tecido muscular ou hepático. A translocação e síntese de transportador de glicose 4 (GLUT-4) também é controlada pelo eixo Akt-mTORC (GUO, 2014).

Destaca-se ainda o fator de transcrição Foxo-1, substrato da Akt na via de sinalização da insulina. O Foxo-1 interage com o elemento responsivo à insulina, responsável pela regulação da expressão gênica de enzimas limitantes na gliconeogênese como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) (GUO, 2014).

Em paralelo com o eixo Akt/mTOR o complexo AMPK também regula diversos parâmetros energéticos da célula, principalmente a biossíntese de aminoácidos e a homeostase de glicose celular, funcionando como um sensor energético para organismos eucariotos.

Acredita-se que o mTORC esteja submetido à regulação por meio da AMPK. O aumento nos níveis de glucagon em mamíferos induz ativação da AMPK e inibição da atividade de mTORC, principalmente em se tratando da atividade de síntese proteica. Nutrientes e fármacos como a leucina e a glutamina, que estimulam o mTOR, são capazes de inibir a AMPK, ao passo que agentes estimuladores da quinase ativada por AMP como a oligomicina e o AICAR suprimem a atividade de mTORC (XU, 2012).

Além do efeito na glicólise, a AMPK pode promover captação de glicose plasmática por meio da indução da translocação de GLUT 4 em adipócitos e músculo esquelético. Outro processo crucial mediado por AMPK é a biogênese mitocondrial. O estímulo da AMPK por meio de fármacos (AICAR e oligomicina) ou pelo exercício é capaz de aumentar a expressão de genes mitocondriais. O efeito mitocondrial causado pela AMPK se deve ao estímulo do coativador 1- α do proliferador do peroxissomo γ (PGC-1 α). Dois mecanismos explicam a ativação de PGC-1 α por meio da AMPK. O primeiro mecanismo é uma fosforilação direta do PGC-1 α causada por AMPK. O segundo, propõe que a ativação de PGC-1 α ocorre por conta da desacetilação dos genes do próprio fator mediado por sirtuína 1 (HARDIE, 2012; XU, 2012).

O estímulo de PGC-1 α pela AMPK ativaria a ‘mitofagia’, isto é, a autofagia das mitocôndrias. Isso se mostraria importante no controle de estresse oxidativo por meio da eliminação de mitocôndrias com algum tipo de disfunção. A reciclagem das mitocôndrias defeituosas aconteceria com o estímulo de AMPK, aumentando a biogênese e melhorando a capacidade da célula em gerar energia (HARDIE, 2012).

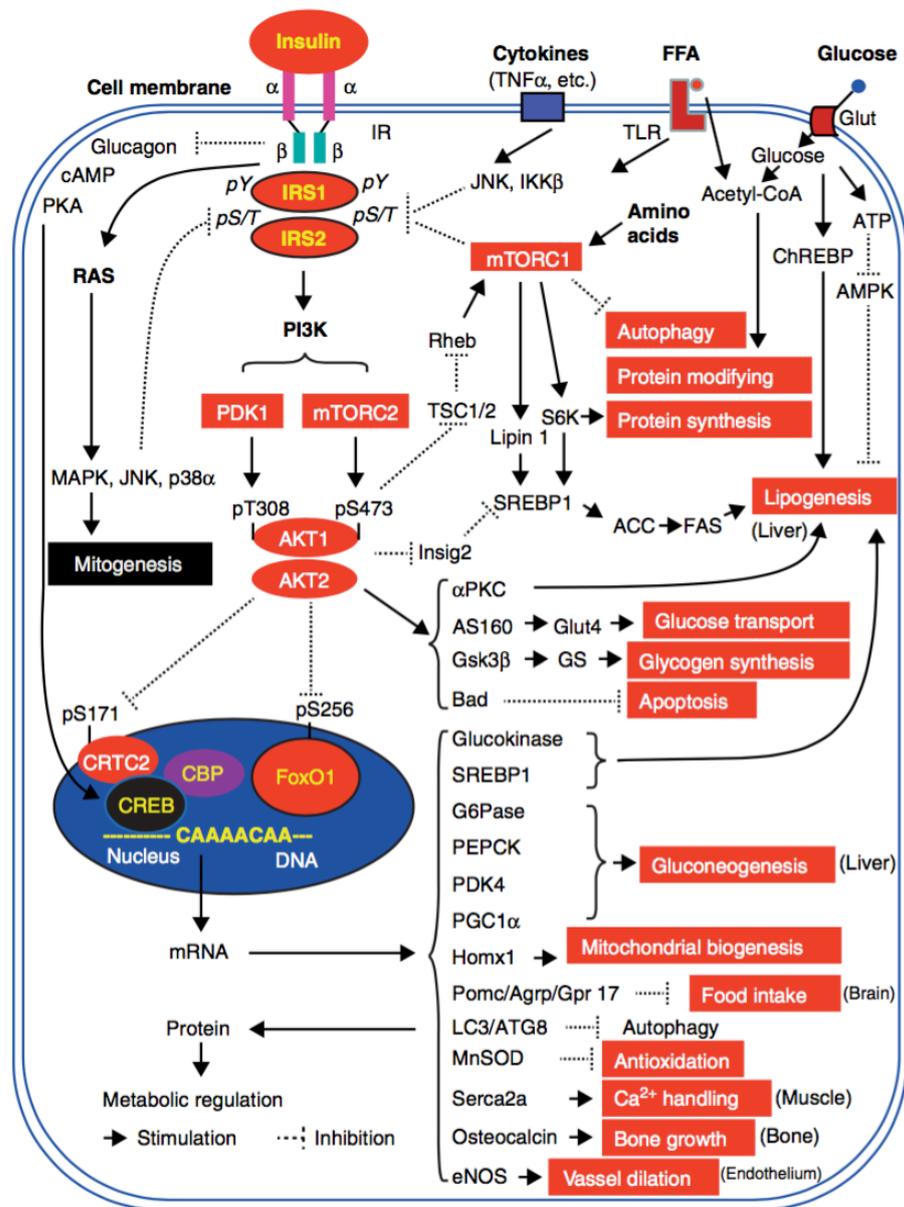


Figura 01. Cascata regulatória da insulina e seus pontos de controle (GUO, 2014).

Uma vez que a glicose esteja disponível no meio intracelular ela é imediatamente fosforilada a glicose-6-fosfato pela hexoquinase ou pela glicocquinase, dependendo do tecido onde acontece a reação. Na forma fosforilada a glicose tem menor afinidade pelos transportadores de glicose (GLUTs), ficando indisponível para o retorno ao meio extracelular, ou seja, permanecendo “presa” dentro da célula. A partir daí o destino mais comum a esta hexose dependeria do estado energético da célula (LUNT, 2011).

A glicólise ocorre no citoplasma visando a produção de esqueletos carbônicos que serão utilizados no ciclo do ácido tricarbônico. Apesar da baixa eficiência na geração de ATP por

mol de glicose em relação a fosforilação oxidativa, a glicólise tem uma taxa de produção de ATP mais rápida que a respiração celular (LUNT, 2011).

Três principais enzimas regulam a taxa de atividade da glicólise. O primeiro ponto de regulação é a hexoquinase, inibida pelo seu próprio produto, a glicose-6-fosfato. O aumento na concentração de glicose-6-fosfato indica acúmulo de outros substratos energéticos e desencadearia um *feedback* negativo evitando que a glicose continuasse sendo fosforilada, podendo assim voltar ao meio extracelular através do canal transportador de glicose. Outro ponto de regulação da glicólise é o complexo piruvato desidrogenase (PDH). O ATP é capaz de inibir alostericamente o complexo quando a concentração de substratos energético dentro da célula for alta. Além do ponto inicial e do final - a hexoquinase e a PDH, respectivamente, o principal ponto regulatório da via é a enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK-1). Novamente, parâmetros energéticos funcionam como preditores da atividade da via: a razão ATP:ADP aumentada indica um excesso de moléculas fontes de energia e, portanto, ocorre uma diminuição da atividade da enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK-1), inibindo a cadeia de reações e diminuindo a produção energética. O citrato, intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico também é capaz de inibir a enzima PFK-1, uma vez que um aumento na concentração de esqueletos de carbono do ciclo do ácido tricarboxílico indicaria que não existe a necessidade da continuação da produção de energia por meio da glicólise. Destaca-se ainda a ação da insulina sobre a PFK-1, estimulando-a positivamente em situações em que o organismo se encontra alimentado. O aumento da concentração de lactato intracelular também serve de estímulo para inibição da via por meio da enzima PFK-1, esse mecanismo serve como autoproteção contra quedas do pH causadas pela glicólise anaeróbia (BERG, 2002; LUNT, 2011)

A figura 01 mostra que a principal forma de regulação e intermediação entre glicólise e gliconeogênese acontece por meio do sistema PFK-1 e PFK-2. A enzima bi-funcional fosfofrutoquinase-2, também age como frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-2), é a responsável pela formação e degradação de frutose-2,6-bisfosfato. O influxo de glicose na célula e a posterior formação de frutose-6-fosfato causa a ativação de PFK-2, enzima na qual formará frutose-2,6-bisfosfato, produto que ativará a PFK-1, aumentando a taxa de formação de produtos para o ciclo do ácido tricarboxílico, sobrepondo o efeito de inibição alostérica do ATP na enzima PFK-1. Todo esse mecanismo é controlado por meio de uma fosforilação na enzima PFK-2 mediada por AMPK. Uma vez que a glicemia seja reduzida e o pâncreas secrete glucagon ocorrerá ativação da cascata do cAMP, alterando covalentemente a PFK-2 e ativando a FBPase-2 (OKAR, 2001).

A homeostase de glicose depende também de vias como a gliconeogênese. Ocorrendo primariamente no fígado e em menor quantidade nos rins essa via é iniciada sob a sinalização do glucagon, hormônio proteico produzido pelas células α -pancreáticas. O glucagon é capaz de induzir atividade da proteína ligadora do elemento responsivo à cAMP (CREBP), aumentando a expressão de enzimas chave na gliconeogênese. Dentre os genes induzidos pelo glucagon encontram-se o da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), glicose-6-fosfatase, piruvato carboxilase e da frutose-1,6-bisfosfatase. A enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) catalisa a síntese de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato. A enzima é um requisito essencial para iniciação da gliconeogênese e controla o fluxo da via (OH, 2013).

Em resumo, a regulação energética de uma célula é dependente de diversos fatores e enzimas, com uma regulação bem orquestrada pelos hormônios, principalmente, insulina e glucagon. Os efeitos do tratamento com tucum-do-cerrado sobre o metabolismo de carboidratos serão investigados ao longo deste trabalho visando estabelecer os mecanismos pelos quais os polifenóis do fruto podem influenciar na homeostase de glicose.

2.2 Metabolismo de ferro

O ferro é o metal mais comum na superfície terrestre. Em organismos vivos participa como elemento traço essencial e faz parte de diferentes estruturas orgânicas, principalmente de grupamentos heme e grupos ferro-enzofre. Biologicamente, a capacidade de oxirredução do ferro torna-o vital para reações de troca de elétrons. O transporte de oxigênio, a síntese de ácido desoxirribonucleico, a respiração celular e a produção de energia são eventos dependentes deste metal (GOZZELINO, 2016).

Em seres humanos saudáveis a quantidade de ferro corporal varia entre 4 e 6 gramas. Os controles de absorção, mobilização e reserva são feitos de maneira orquestrada por meio de uma regulação complexa. Noventa por cento do ferro necessário é mantido via reciclagem de hemácias senescentes, enquanto que o restante é oriundo da dieta (GOZZELINO, 2016).

Como mostra a figura 02, a proteína reguladora de ferro (IRP1) se liga fortemente ao elemento responsivo ao ferro (IRE) presente na porção 5' do mRNA da ferritina e da ferroportina prevenindo a sua tradução, porém ao se ligar ao IRE localizado na porção 3' do mRNA do receptor de transferrina e do DMT-1, aumenta a estabilidade destas moléculas impedindo sua degradação por nucleases, o que favorece a síntese de receptor de transferrina e do DMT-1, aumentando a captação do ferro intracelular e absorção intestinal, respectivamente. Mecanismo contrário ocorre quando a disponibilidade de ferro aumenta, ou seja, a IRP1 não se liga mais ao IRE e então a ferritina é traduzida e o mRNA do receptor de transferrina e do DMT-1 são facilmente degradados (GANZ, 2002).

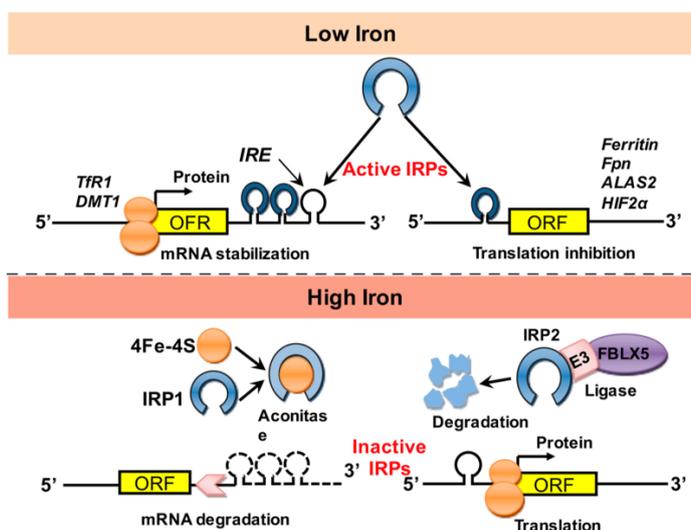


Figura 02. Regulação transcricional de parte do metabolismo de ferro. (IMAM et al., 2017)

A regulação sistêmica do ferro é mediada por um mecanismo hormonal dependente de hepcidina. A hepcidina é um hormônio proteico composto por 25 aminoácidos, sintetizado principalmente pelo fígado e que circula livremente no sangue. A hepcidina liga-se à ferroportina, estimulando sua degradação e retendo, desta maneira, o ferro dentro da célula. A expressão do gene da hepcidina, o *Hamp*, está diretamente relacionado com os níveis de ferro sérico e celular. A elevação na concentração plasmática de hepcidina leva à uma regulação negativa da ferroportina duodenal, impedindo assim a absorção desse metal. Além do duodeno, a hepcidina age também em macrófagos e hepatócitos via inibição da ferroportina, impedindo que esses tipos celulares tornem o ferro intracelular disponível para outros sistemas ou células. (BOGDAN, 2015).

No duodeno três mecanismos são descritos envolvendo a ação da hepcidina: no primeiro, o acúmulo de ferro leva a inativação de proteínas reguladoras de ferro (IRP-1 e IRP-2), que se ligariam ao RNA dos elementos reguladores de ferro do transportador de metal divalente 1 (DMT 1), que é desestabilizado e inativado, evitando assim a transcrição do transportador. O segundo mecanismo envolve o fator de transcrição induzível por hipóxia um alfa, o HIF-1 α . O ferro estimula a hidroxilação e posterior degradação do HIF-1 α , evitando o estímulo de síntese do transportador de metal divalente 1. O último mecanismo se trata da ubiquitinação do transportador de metal divalente 1 mediada por hepcidina - este hormônio hepático serve como gatilho para que ubiquitina ligases façam a degradação proteossomal do transportador de ferro, impedindo sua absorção (GANZ, 2012).

Tanto o excesso quanto a falta de ferro causam disfunções. A hipoferremia leva a uma limitação na síntese de hemoglobina e posteriormente, se agravado, à anemia ferropriva. Em células não hematopoiéticas a deficiência deste metal pode causar prejuízo na função de proteínas dependentes de ferro, como por exemplo a aconitase, enzima catalisadora da reação de citrato em isocitrato, no ciclo do ácido tricarboxílico (GANZ, 2012).

Apesar da fina regulação do conteúdo de ferro no organismo humano, uma ingestão excessiva de ferro seguida de saturação das reservas de ferro sem que exista a necessidade do metal para eritropoiese ou quaisquer outras reações tornaria parte do conteúdo existente “livre”, constituindo o *pool* de ferro lábil. Acredita-se que a elevação na quantidade desse *pool* de ferro livre pode estar ligada a geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio e com o estresse oxidativo (PIETRANGELO, 2016).

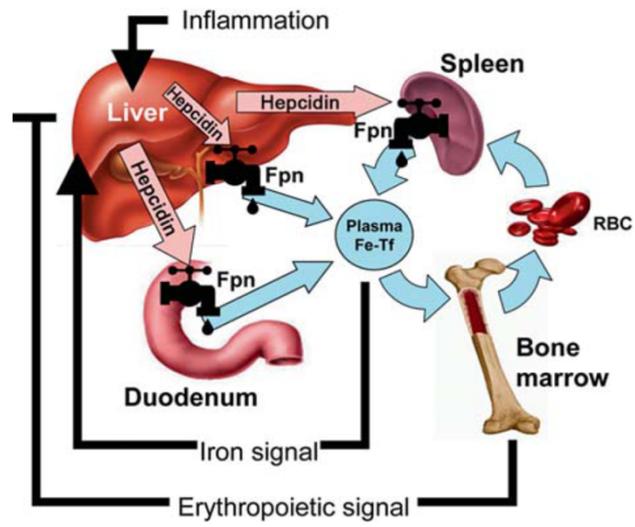


Figura 03. Regulação do metabolismo de ferro (NEMETH; GANZ, 2009).

2.3 Radicais livres e estresse oxidativo

A relação entre radicais livres e a saúde humana vem sendo estudada há muito tempo. Desde os anos 1950, com a “Teoria do envelhecimento baseada em radicais livres”, propõe-se que o desenvolvimento de diversas doenças e o processo de senescência celular estariam relacionados com espécies reativas de oxigênio e radicais livres (HARMAN, 1957).

Atualmente, a literatura mostra estreita relação entre o estresse oxidativo e as doenças crônicas, como o diabetes mellitus, o câncer e as doenças cardiovasculares. Além disso, os declínios cognitivo e físico naturais relacionados com a idade também têm ligação com este desbalanço (INDO, 2015).

Os radicais livres podem ser gerados de forma natural e controlada ou de maneira desequilibrada dependendo de fatores como a dieta, nível de atividade física, o ambiente, a exposição a compostos tóxicos, a presença de doenças e a inflamação – seja aguda e localizada em um tecido específico ou de baixo grau e sistêmica (PINGITORE, 2015; VINCENT, 2015).

Dentre os mecanismos formadores de radicais livres conhecidos, devem ser destacados os seguintes:

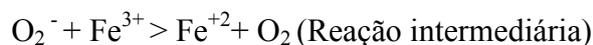
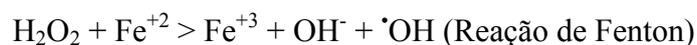
- i. Extravasamento mitocondrial – a grande quantidade de reações de oxi-redução presentes na cadeia de transporte de elétrons torna a mitocôndria um importante sítio de geração de compostos instáveis, como o radical superóxido. Fenômenos como a disfunção mitocondrial e a desestabilização da cadeia de transporte de elétrons causados por doenças podem aumentar ainda mais a geração de radicais livres (INDO, 2015);
- ii. Reações de *Fenton* e *Fenton-like* – a valência e a organização eletrônica de certos metais de transição permitem a troca de elétrons de maneira espontânea com compostos redutores sem a presença de mecanismos enzimáticos, causando a produção de radicais e espécies reativas de oxigênio. Dentre os metais citados, destaca-se o ferro, principal formador de radicais hidroxil no organismo humano (CHOI, 2014);
- iii. NADPH oxidases – As enzimas pertencentes à essa família são capazes de oxidar a forma reduzida do dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADH), gerando subproduto como os radicais superóxidos. Esse mecanismo acontece,

principalmente em fagócitos, tendo como objetivo a defesa e eliminação de patógenos (ABRAMOV, 2015);

- iv. Xenobióticos – Poluentes, metais tóxicos (Cd, Cr, Me, Al e As) e compostos estranhos ao organismo humano (benzeno, benzopireno, fenol, nicotina) estão ligados à diminuição na expressão de enzimas antioxidantes e ao aumento na geração de radicais livres por mecanismos semelhantes as reações de *Fenton* e estímulo da inflamação e posterior atividade de NADPH oxidase (LUNCH, 2010; SOCHA, 2015).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se mostra extremamente relevante em se tratando de estresse oxidativo. O superóxido é considerado o principal precursor de outros radicais livres, além de mediar cadeias de reações oxidativas. Esse radical pode ser gerado dentro das mitocôndrias como primeiro subproduto da redução do oxigênio molecular na cadeia de transporte de elétrons. A produção de radicais superóxido também pode ocorrer por meio da reação que envolve a enzima xantina oxidase, catalisadora da conversão de hipoxantina à xantina, e posteriormente de xantina à ácido úrico. Essa reação é capaz de produzir, além de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio (BELHADJ, 2014).

O ferro recebe destaque uma vez que facilmente consegue gerar radicais hidroxil, considerado uma das espécies reativas mais deletérias encontradas no organismo humano. A reação de formação desse radical livre mediada por ferro foi descrita em 1899, por Henry Horstman Fenton. Em conjunto com a Reação de Fenton, a reação de Haber-Weiss é capaz de oxidar uma molécula de ferro reduzido, tornando-o disponível para reagir com o peróxido de hidrogênio como gerado pela reação de Fenton (DALVI, 2014). A cadeia das reações envolvendo ferro, superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil encontram-se descritas abaixo (HERMES-LIMA, 2004):



Apesar de não ser considerado um radical livre, o peróxido de hidrogênio tem destaque pela capacidade de oxidar metais como ferro, cromo e cobre em reações do tipo Fenton, gerando

assim radicais livres (BOKARE, 2014). Levando em conta seu pequeno peso molecular, o peróxido de hidrogênio tem facilidade de atravessar membranas celulares, permitindo que o mesmo se desloque do sítio onde foi gerado, causando danos a biomoléculas pertencentes a outros compartimentos celulares. Por outro lado, a alta reatividade e a breve meia vida do radical hidroxil o torna extremamente nocivo a sistemas biológicos (BELHADJ, 2014).

Os radicais hidroxil e superóxido podem exercer efeitos sobre qualquer tipo de biomolécula - lipídeos, proteínas, glicídios ou mesmo bases nitrogenadas (BHAT, 2015).

A peroxidação lipídica ocorre quando um radical livre reage com um fosfolipídio, normalmente localizado nas membranas mitocondriais, celulares ou dos retículos. A reação de peroxidação lipídica leva a formação de compostos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Tais produtos de peroxidação lipídica são associados a efeitos carcinogênicos em animais e em cultura de células. Além da geração desses produtos tóxicos, outro importante fator associado a peroxidação lipídica é a perda da fluidez de membrana. Em casos mais graves é possível que ocorra até mesmo a ruptura da membrana celular, resultando em extravasamento do conteúdo intracelular (BHAT, 2015).

A oxidação de proteínas ocorre principalmente em resíduos dos aminoácidos cisteína e metionina, envolvendo os grupamentos tiol e outras ligações com enxofre. O principal prejuízo relacionado com a oxidação de proteínas é a alteração em sua estrutura quaternária, o que gera perda ou prejuízo na função de receptores, transportadores e enzimas. Ademais, ocorre geração de resíduos carbonil – marcador de diversas disfunções celulares (DALVI, 2014; GUEVARA, 2016)

O ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser alvo de danos oxidativos em suas bases nitrogenadas ou em suas riboses por diferentes mecanismos. A adição de elétrons ou H[•] nas ligações duplas entre bases nitrogenadas pode causar problemas à estrutura do DNA. Apesar dos diversos mecanismos de reparo existentes, o DNA danificado por radicais livres pode gerar instabilidade genômica, doenças e até mesmo levar ao processo de carcinogênese (DIZDAROGLU, 2012).

Tendo em vista a natureza dos distúrbios causados pelos radicais livres ressalta-se a relevância da mitocôndria, uma das organelas mais afetadas por lesões radiculares. Sabe-se que a ausência de histonas no DNA mitocondrial (mtDNA) torna-o mais sensível e vulnerável a danos, bem como mais instável do ponto de vista estrutural. Entretanto, devido a características físicas da estrutura mitocondrial sugere-se que o DNA ficaria fisicamente afastado dos locais

onde a cadeia de transporte de elétrons existe, diminuindo assim o risco de interação entre espécies reativas de oxigênio e mtDNA (KAUPPILA, 2015).

Portanto, a geração de radicais livres, apesar de fisiológica e natural, deve ser controlada e combatida, afim de evitar danos a biomoléculas e posteriores efeitos negativos a saúde (KAUPPILA, 2015). Mais pontos relacionando radicais livres e a saúde humana serão tratados logo a diante.

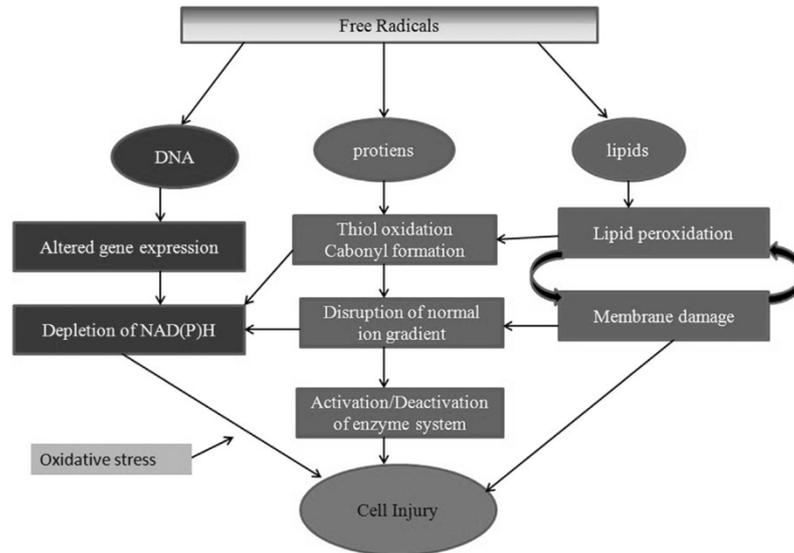


Figura 04. Representação dos danos à biomoléculas mediado por radicais livres (BHAT et al., 2015).

2.4 Metabolismo de carboidratos, ferro e estresse oxidativo

O principal distúrbio do metabolismo de carboidratos, o diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) compreende cerca de 90% do total de casos de DM. Bem como a arteriosclerose e a síndrome metabólica, seus principais fatores de risco são uma dieta inadequada, falta de atividade física e excesso de peso (WHO, 2016). Em um estudo de coorte prospectivo com mais de dez mil participantes seguidos por 14 anos, Ligthart *et al*, 2015 mostraram que em uma população europeia o risco durante toda a vida (do inglês: *lifetime risk*) do desenvolvimento de DM 2 é de 31,3%, enquanto que o risco de desenvolvimento de intolerância à glicose é de quase 50%. Esses riscos são aumentados com o aumento da idade e correlacionados positivamente com índice de massa corpórea e circunferência abdominal.

A etiologia multifatorial das doenças metabólicas como o DM, a síndrome metabólica e a resistência à insulina compreendem desde elementos socioeconômicos até os conhecidos fatores fisiológicos e bioquímicos. Indivíduos com uma menor renda, por exemplo, tem quase cinco vezes mais chance de desenvolver essas doenças. A ocupação e o nível de educação também são capazes de alterar o risco de desenvolvimento de comorbidades. Juntos, esses fatores possivelmente se relacionam com o consumo de alimentos de qualidade, bem como ao acesso a informações sobre saúde, causas e sintomas das doenças supracitadas (MA, 2014).

Em relação à alimentação, o aumento do consumo de cereais refinados e açúcares foi positivamente correlacionado com a gênese do DM 2 e da síndrome metabólica, enquanto uma dieta rica em vegetais, frutas e peixes é capaz de diminuir este risco. Dados sugerem que o consumo de carboidratos de alto índice glicêmico pode ser um importante fator para o desenvolvimento da doença. A ingestão de bebidas adoçadas com açúcar, xarope de milho e xarope de milho rico em frutose é sabidamente ligado ao aumento no risco do desenvolvimento de DM 2, arteriosclerose e síndrome metabólica. A conexão parece acontecer principalmente por conta do aumento de concentração de glicose sanguínea e das respostas desencadeadas pelo evento (BARCLAY, 2008; SCHULZE, 2004).

A associação entre hiperglicemia constante, desbalanço oxidativo e a gênese de doenças já é amplamente conhecida. Com o aumento na oferta de glicose celular, vias metabólicas como glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e a cadeia de transporte de elétrons se encontrariam mais ativas, gerando um maior extravasamento de radicais superóxido na mitocôndria. Além disso, em uma situação de excesso de glicose ocorreria um desvio de rota metabólica, a fim de diminuir a concentração dessa hexose sem que houvesse produção de energia, e como

consequência haveria aumento na produção de polióis, como o sorbitol. A produção deste poliól é dependente da atividade da enzima aldolase redutase, que consome NADPH como substrato, diminuindo assim o potencial redutor da célula e favorecendo o ambiente oxidativo. Com a redução na concentração de NADPH a regeneração de glutathiona oxidada (GSSG) fica prejudicada, intensificando o quadro de estresse oxidativo (TANGVARASITTICHAJ, 2015).

O consumo adequado de alguns micronutrientes que possuem potencial antioxidante tais como as vitaminas A, C, E e os carotenoides está associado a uma menor chance de desenvolver doenças do metabolismo de carboidratos. A ingestão de minerais Mg e Se, que atuam como cofatores de algumas enzimas do sistema antioxidante também se mostra importante como defesa antioxidante (MARTINI, 2010).

A ligação entre ferro e o metabolismo de carboidratos parece se dar, principalmente, por disfunções mitocondriais nas células β -pancreáticas causada pelo aumento do estresse oxidativo. Animais modelos de hemocromatose têm uma maior prevalência de diabetes e intolerância à glicose (HUANG, 2011). Hammerstrom et. al. 2008 mostraram associação positiva entre níveis de ferritina sérica e resistência à insulina em camundongos diabéticos tipo 2 sem sobrecarga de ferro, possivelmente por conta de uma inflamação sistêmica e de baixo grau. Por outro lado, em trabalho do mesmo grupo, Choi *et al*, 2013 mostraram que o acúmulo de ferro no plasma, fígado e pâncreas estaria associado com resistência à insulina e disfunção mitocondrial. Assim sendo, é hipotetizado que alterações no metabolismo de ferro podem gerar distúrbios mitocondriais e conseqüentemente mudanças negativas no metabolismo energético.

Choi, *et al*, 2013 mostraram que a suplementação de ferro em uma dieta com baixa quantidade de gorduras administrada em ratos durante sete semanas foi capaz de aumentar significativamente a ferritina, saturação de transferrina e diminuir a concentração de transferrina sérica. A suplementação *per se* foi capaz de elevar os níveis de triglicerídeos e colesterol total nos animais, independentemente da dieta. A glicemia foi maior no grupo suplementado com ferro, porém, não houve diferenças nos níveis de insulinemia e índice de resistência à insulina (HOMA-IR). A dieta rica em ferro promoveu ainda um aumento nas quantidades de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-phosphatase (G6Pase), ao passo que reduziu a concentração de glicoquinase (GK) no fígado dos animais.

Outro importante resultado mostrado é a redução na concentração de PPAR- α , o receptor ativado por proliferador de peroxissomos α . Este fator de transcrição é responsável pela regulação da transcrição de diversos genes relacionados com metabolismo energético, de

carboidratos e de lipídeos. Em conjunto, esses resultados sugerem uma relação importante do excesso de ferro e disfunções no metabolismo de carboidratos, gerando alterações negativas em diversos parâmetros ligados à resistência à insulina, ao diabetes e à síndrome metabólica (CHOI, 2013).

Lee et al (2015) demonstraram que células de fígado humano (SK-HEP-1) quando tratadas com o complexo Fe-NTA apresentavam um aumento da expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase PEPCCK e do coativador 1 alfa do receptor acoplado ao proliferador de peroxissomos (PGC-1 α). No entanto a adição do quelante desferroxiamina (DFO) ou do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) diminuiu a expressão da PEPCCK e do PGC-1 α . Esses autores observaram ainda que o acúmulo de ferro em hepatócitos humanos causa disfunção mitocondrial e diminuição nos níveis de ATP celular em cultura de hepatócitos. Com bases nesses resultados os autores concluíram que o aumento na gliconeogênese é causado pela elevação da expressão de PEPCCK e PGC-1 α induzido pela fosforilação exacerbada de C/EBP- α , mediada pela ativação anormal de p38MAPK, gerada pelo estresse oxidativo nas células. Em resumo, a disfunção mitocondrial causada pelo acúmulo de ferro é capaz de gerar aumento da atividade da via da gliconeogênese, compondo, assim, importante fator na patogênese do DM.

Os mesmos autores mostraram que camundongos *db/db*, modelo clássico de diabetes apresentavam níveis elevados de hepcidina, ferritina, PEPCCK e PGC-1 α e teriam disfunções na cadeia de transporte de elétrons, na atividade de ATP sintetase, alterações no potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e aumento nos danos oxidativos. Os níveis elevados de hepcidina levariam à uma degradação de ferroportina e acúmulo de ferro intracelular, explicando assim parte das disfunções anteriormente citadas. Esses resultados sugerem uma associação entre DM, intolerância à glicose e expressão de hepcidina por meio de mecanismos envolvendo o controle de ferro celular (LEE, 2015).

Vecchi *et al*, 2009 mostraram que o gene da proteína hepática ligadora do elemento responsivo de cAMP está envolvido constitutivamente na estrutura do gene da hepcidina e é rapidamente transcrito quando o retículo endoplasmático sofre dano, como é comum em indivíduos sob estresse metabólico. O cAMP é o principal segundo mensageiro participante da cascata de ativação da gliconeogênese induzida por glucagon. Logo, a proteína ligadora do elemento responsivo de cAMP é parte fundamental no aumento da expressão de enzimas da gliconeogênese.

Ainda analisando a relação entre metabolismo de ferro e de carboidratos, Vecchi *et al*, 2014 utilizaram-se de um análogo de cAMP e do hormônio glucagon, que agiriam como sinalizadores para a via da neoglicogênese, para estudar o efeito desta rota bioquímica no metabolismo de ferro. Nesse mesmo estudo, Vecchi *et al*, 2014 mostraram que células hepáticas apresentaram um aumento da expressão do gene da hepcidina, *Hamp*, quando incubadas com um análogo de cAMP ou com glucagon, sugerindo que a hepcidina age como um sensor da gliconeogênese. Em animais, o estado de jejum aumentou a transcrição de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e hepcidina, ao passo que elevou a degradação de ferroportina em comparação com animais alimentados.

Ao contrário do observado pelos estudos explorados anteriormente, o grupo de Silva *et al*, 2008 mostrou que a administração intraperitoneal de ferro durante 16 semanas em animais diminuiu a quantidade de glicose no soro e os níveis de hemoglobina glicada, entretanto, elevou os níveis de triacilglicerois séricos. Os autores sugerem que a redução na capacidade mitocondrial e consequente redução na produção de ATP, resultou na redução da atividade gliconeogênica, tornando a glicemia menor, hipótese que vai ao encontro ao esperado e a proposta de Lee *et al*, 2015.

Além do efeito na gliconeogênese, a sobrecarga de ferro parece ter relação com a resistência à insulina no tecido adiposo. A suplementação com ferro foi capaz de aumentar em 40% a glicemia em jejum por meio da resistência periférica à insulina. Os animais suplementados com ferro sofreram hipertrofia e hiperplasia de adipócitos do tecido adiposo visceral, além de terem uma maior concentração de ferro nesse tecido quando comparado ao grupo controle. Ademais, uma redução na sinalização de insulina no tecido adiposo foi percebida por meio da análise da fosforilação de proteínas mensageiras como a Akt. Ao contrário do que acontece no fígado, a expressão de PEPCK e G-6-Pase foi menor no tecido adiposo visceral, esse efeito ocorre principalmente por causa da resistência à insulina desenvolvida pelos adipócitos (DONGIOVANNI, 2013).

2.5 Defesas antioxidantes e o metabolismo de carboidratos

O estresse oxidativo causado por espécies reativas é combatido por meio de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Podem ser obtidos de maneira endógena ou exógena, isto é, pela produção do próprio organismo ou via dieta e suplementação, respectivamente (YEUM, 2015). Os mecanismos antioxidantes enzimáticos de proteção contra o estresse oxidativo englobam, principalmente, as seguintes enzimas:

- Superóxido dismutase: descrita em 1969 por Fridovich e colegas, a enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação de radicais superóxidos em oxigênio molecular e água, sendo considerada como principal agente antioxidante endógeno. Pode ser encontrada em sua forma dependente de cobre e zinco no citossol (CuZnSOD) ou de manganês, presente na mitocôndria (MnSOD). Além dessas duas isoformas, a eSOD está presente no meio extracelular, mas é menos estudada que as formas intracelulares (ASLANI, 2016; FINKEL, 2000).
- Catalase e glutathione peroxidase: são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio em água. A catalase é primariamente localizada em peroxissomos nos eritrócitos, fígado e, em menor quantidade, nos rins. A glutathione peroxidase pode ou não ser dependente de selênio e é encontrada praticamente em todas as células, mas com uma expressão mais relevante nos hepatócitos (ASLANI, 2016; FINKEL, 2000; KODYDKOVÁ, 2014).
- Glutathione reductase: apesar de não agir diretamente como antioxidante, esta enzima é capaz de reciclar o peptídeo de glutathione reduzida (GSH) a partir da glutathione oxidada (GSSG) e NADPH que, por sua vez, pode atuar como antioxidante (ASLANI, 2016).

Em se tratando de antioxidantes exógenos ou dietéticos esses podem ser classificados em essenciais (vitamina C e E, ácidos graxos insaturados) e não-essenciais (compostos fitoquímicos) (PAKUWAL, 2014). Dentre os antioxidantes não-essenciais os fitoquímicos têm ganhado grande destaque por conta de seus diversos efeitos na saúde humana. Essas substâncias são metabólitos secundários das plantas. Mais de oito mil desses compostos provindos de vegetais são conhecidos atualmente (GÜLÇİN, 2012).

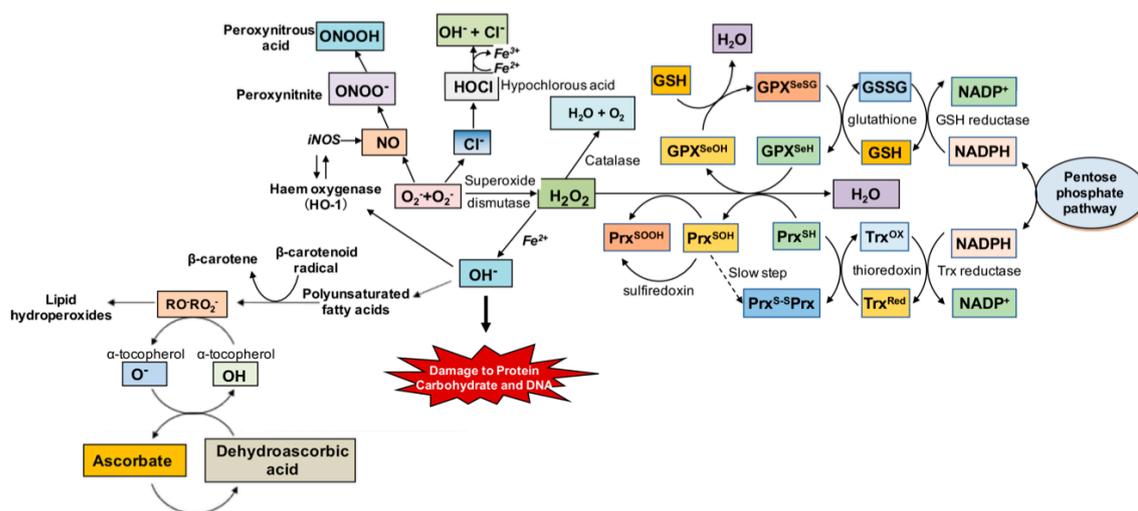


Figura 05. Representação esquemática dos mecanismos pró- e antioxidantes em sistemas biológicos de mamíferos (IMAM et al., 2017).

Os compostos fitoquímicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em alcaloides, terpenos e fenólicos. Dentre os fenólicos estão as seguintes classes: ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinâmico); lignanas; flavonoides (flavononas, isoflavonas, flavanois, flavonas, flavonois, antocianidinas); estilbenos e taninos. No geral, os compostos fenólicos ou polifenóis possuem estruturas químicas ricas em grupamentos hidroxilas, normalmente acopladas a anéis aromáticos, o que lhes confere um alto poder redutor. Tal poder oxidorrreduzidor caracteriza os polifenóis como bons compostos antioxidantes (LIU, 2013; GÜLÇİN, 2012).

Os mecanismos de ação antioxidante dos polifenóis diferem de acordo com o composto em questão, entretanto, enumeram-se os três principais: o mecanismo quelante de metais, a ação *scavenger* de radicais livres e o efeito nutrigenômico na modulação da expressão de enzimas antioxidantes. Além das propriedades antioxidantes, vários polifenóis também têm capacidade anti-inflamatória, geralmente com mecanismos nucleares baseados no aumento da expressão genes que atuam na resolução da inflamação (WANG, 2014).

A alta concentração de compostos com potencial antioxidante nas plantas parece estar relacionada a adaptação dessas à climas e solos inóspitos como forma de defesa do vegetal. Assim sendo, frutas cultivadas em um bioma como o cerrado brasileiro podem apresentar uma concentração maior desses compostos. (SIQUEIRA, 2013). Além disso, a sazonalidade parece ser fator preponderante na produção de polifenóis. A variação climática contribui com a

oscilação natural da produção de compostos bioativos. Ambientes mais inóspitos, como o cerrado brasileiro, podem propiciar uma maior produção dessas substâncias (PIMPA et al., 2013).

Estudos prévios de nosso grupo identificaram e caracterizaram o fruto do cerrado tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) como uma excelente fonte de compostos fenólicos em comparação com outras frutas locais e com a maçã da variedade *Red Delicious* (*Malus domestica* Borkh.). Em relação à maçã, o tucum-do-cerrado tem cerca de 3,5 vezes mais compostos fenólicos por porção. Dentre os compostos fitoquímicos presentes neste fruto destacam-se as antocianinas e os flavonóides (SIQUEIRA, 2013).

O efeito do consumo do fruto em animais foi testado previamente em nosso laboratório. A ingestão de tucum-do-cerrado durante 30 dias por ratos Wistar associado ou não a suplementação de ferro não trouxe mudanças no ganho de peso ou consumo dietético. Por outro lado, a suplementação de ferro (350 mg/kg de dieta) aumentou significativamente a concentração de ferro no fígado, baço e intestino dos animais tratados com este metal. O ferro sérico e a saturação de transferrina também estavam elevados no grupo que recebia suplementação em relação ao controle. O consumo de tucum-do-cerrado não alterou os níveis de ferro em nenhum dos tecidos testados no estudo, entretanto, reduziu o ferro plasmático e a saturação de transferrina nos animais suplementados com o metal (FUSTINONI-REIS, 2016).

O consumo de ferro claramente induziu estresse oxidativo nos animais tratados com ferro. Estes possuíam níveis mais altos de peroxidação lipídica no fígado em relação ao controle, ao passo que a ingestão do fruto reduziu significativamente este efeito. No baço, os animais tratados apenas com tucum-do-cerrado tiveram redução nos níveis de malondialdeído, mostrando proteção contra peroxidação lipídica. A concentração de proteínas carboniladas foi menor nos grupos que ingeriram o fruto, independente da suplementação de ferro (FUSTINONI-REIS, 2016).

O mesmo trabalho mostrou que a ingestão concomitante de ferro e tucum-do-cerrado foi capaz de modular a expressão de catalase no rim, diminuindo sua atividade em relação ao grupo suplementado apenas com ferro. O nível de RNA no baço da mesma enzima foi reduzido no grupo que ingeriu tucum-do-cerrado e ferro em excesso em relação ao controle. Ainda no rim, as atividades de glutathione redutase e glutathione S transferase também foram reduzidas nos animais tratados com o fruto e com o metal, mas não com apenas um dos dois. Com relação a glutathione peroxidase houve aumento na atividade intestinal de animais suplementados com ferro, mas redução a níveis normais quando a suplementação acontecia em conjunto com a

ingestão do fruto. A capacidade antioxidante do plasma foi significativamente maior nos grupos que consumiram tucum-do cerrado.

Com relação ao metabolismo de ferro, como esperado, houve aumento no nível de transcrição do gene da hepcidina no grupo suplementado com o metal. Nos animais tratados com tucum-do-cerrado a expressão desse gene foram reduzidos em relação ao controle e ao grupo suplementado com o metal (FUSTINONI-REIS, 2016).

O consumo de fitoquímicos tem sido associado positivamente a promoção da saúde e conseqüente a prevenção de doenças. Alguns dos benefícios proporcionados pelo consumo de compostos fitoquímicos envolvem o controle da expressão de oncogenes, da proliferação e diferenciação celular, regulação da morte celular por apoptose, aumento na detoxificação hepática, inibição enzimática de mecanismos inflamatórios. Entretanto, a atividade antioxidante parece ser a mais relevante entre todas as citadas (LIU, 2013).

Em recente revisão sistemática, Rangel-Huerta *et al* (2015) mostraram que o consumo de compostos fenólicos leva a diversas alterações clínicas e bioquímicas. De forma geral, foram vistos benefícios na redução de marcadores inflamatórios como proteína C reativa, interleucina-1 β , fator de necrose tumoral-1 α , molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1). Houve melhora também na concentração de colesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), apolipoproteína B, concentração de colesterol na lipoproteína de alta densidade (HDL-c), pressão arterial sistólica, trigliceridemia, além de outros marcadores de saúde cardiovascular. A expressão e atividades de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase são aumentadas após o consumo de diferentes tipos de polifenóis. Em se tratando do metabolismo de carboidratos, a meta-análise observou a diminuição nos índices de resistência à insulina, glicemia e hemoglobina glicada (RANGEL-HUERTA, 2015).

O tratamento de ratos diabéticos durante 28 dias com extrato metanólico do feijão *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. (Fabaceae), matéria prima utilizada para a produção de goma guar, promoveu uma menor glicemia em jejum, maior tolerância oral a glicose e menor índice HOMA IR em ratos diabéticos. Além disso, a atividade de glicose-6-fosfatase foi reduzida aos valores do grupo não-diabético e o extrato da planta foi tão eficaz quanto uma tiazolildinediona, a pioglitazona. O mesmo resultado se repetiu ao se mensurar a atividade de frutose-1,6-bisfosfatase, que mostrou redução na atividade dos animais tratado em comparação com os diabéticos. O conteúdo hepático de glicogênio que se mostrou significativamente reduzido nos animais doentes voltou aos parâmetros de normalidade com a administração do extrato do feijão ou com a pioglitazona (PAULRAJ, 2014).

Em ratos tratados com estreptozotocina, a suplementação do extrato de *Ziziphus spinachristi* diminuiu a glicemia em jejum, aumentou os níveis de insulina e peptídeo C ao passo que reduziu a concentração de hemoglobina glicada. O conteúdo de glicogênio hepático foi restaurado e uma diminuição na atividade de glicose-6-fosfatase hepática também foi vista, enquanto a atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase foi reduzida (ABDEL-HADY, 2005).

Em se tratando de frutos, as bagas das famílias *Rosaceae* e *Arecaceae* que popularmente são conhecidas pelo termo em inglês “*berries*”, são importantes fontes de compostos fitoquímicos (antocianinas, ácido cafeico, catequinas, quercetina, kaempferol e taninos). O consumo de morangos tem sido associado ao aumento da capacidade antioxidante do plasma, com consequente redução do dano oxidativo causado ao LDL. Marcadores inflamatórios como a interleucina 1 β e o inibidor do agregador plaquetário 1 (PAI-1) foram reduzidos em indivíduos que consumiam a fruta junto a uma refeição rica em lipídeos e carboidratos (SUBASH, 2014).

Além do morango (*Fragaria x ananassa*), o mirtilo foi capaz de elevar a expressão do peptídeo glutatona (GSH) e reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio em cultura de células neuronais. Em animais, a suplementação do extrato de mirtilo reverteu com sucesso o declínio cognitivo e de desempenho motor em um modelo murínico. Ainda em modelo experimental, o consumo do extrato de framboesa mostrou-se eficaz em diminuir os danos oxidativos causados por isquemia em cérebro de ratos.

Já em humanos, existem evidências mostrando que o consumo de groselha é capaz de inibir a formação de placas β -amiloide e a geração de radicais livres em pacientes com doença de Alzheimer. Todos esses resultados são, possivelmente, atribuídos à presença de antocianidinas (SUBASH, 2014).

O consumo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea Mart*), duas vezes ao dia durante um mês por uma população de indivíduos saudáveis e com sobrepeso causou redução na glicemia e insulinemia em jejum, bem como no colesterol total e LDL-c. Ademais, o consumo frequente de açaí melhorou a resposta glicêmica pós-prandial após uma refeição padronizada em comparação com indivíduos que não consumiam a fruta (UDANI, 2011).

Apesar da composição variada, as “*berries*” parecem ter um perfil de compostos fitoquímicos semelhantes. A quantidade expressiva de antocianinas e antocianidinas chama a atenção e é característica de frutos com as cores vermelhas e roxas. Flavonóis, taninos, e estilbenos também são comuns a várias espécies desta família de frutos (MANGANARIS, 2014).

Estudos prévios mostram que o tucum-do-cerrado tem cerca de 36 vezes mais antocianinas que a maçã *Red Delicious* por porção de 100 g do fruto. O conteúdo de flavonoides chega a ser quase 20 vezes maior no fruto do cerrado em comparação com a mesma maçã. O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) do extrato alcoólico e aquoso do tucum-do-cerrado é, respectivamente, 5 e 6 vezes maior que da maçã (SIQUEIRA, 2013). Levando em conta o amplo espectro de compostos fotoquímicos e nutrientes presentes em um fruto como o tucum-do-cerrado, faz-se necessário o estudo do alimento como um todo, não apenas de moléculas isoladas como tem sido feito largamente na literatura.

Além do efeito antioxidante, diversos compostos fitoquímicos parecem modular a atividade de enzimas que participam do processo de digestão e quebra dos carboidratos, como a α -glicosidase e a α -amilase. Usualmente diversos compostos inibidores destas enzimas são utilizados na prática clínica. Acarbose, miglitol e a voglibose são os principais fármacos empregados com essa função. Uma meta-análise *Cochrane* mostrou que o uso de inibidores da α -glicosidase conseguia reduzir significativamente a concentração de hemoglobina glicada, insulina, glicemia em jejum e índice de massa corpórea em seres humano. Entretanto, o uso de dosagens mais elevadas que o padrão usado na prática clínica causava uma baixa adesão ao tratamento por conta dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos (VAN DE LAAR, 2005).

Em recente revisão Joshi *et al*, 2015 mostraram a relevância da utilização de inibidores das enzimas responsáveis pela quebra dos carboidratos na saúde humana. Novamente, fica claro o efeito na melhora de parâmetros associados com o metabolismo de glicídios de forma geral (hemoglobina glicada, glicemia em jejum e outros). Além disso, esses inibidores mostram potencial efeito na diminuição de risco de doença cardiovascular e progressão do ‘pré-diabetes’. Por outro lado, ressalta-se novamente a necessidade de tratamentos que gerem menos efeitos negativos, aumentando assim o engajamento dos pacientes no tratamento (JOSHI, 2015).

Existe evidência da eficácia de diversos compostos naturais isolados na inibição de glicosidase e da amilase, entretanto, a utilização de alimentos ou extratos de plantas parece ser mais eficiente. Possivelmente, o efeito sinérgico dos compostos presentes na planta como um todo tem maior eficácia que a utilização de apenas um composto isolado. Assim sendo, tem-se que o tucum-do-cerrado, fruto rico em polifenóis, poderia exercer efeitos sobre a absorção de carboidratos dos animais tratados com o fruto (ADISAKWATTANA, 2012).

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de carboidratos, em ratos suplementados ou não com ferro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do consumo do tucum-do-cerrado na modulação das vias celulares do metabolismo de glicose por meio da avaliação da atividade enzimática da α -glicosidase, glicoquinase, glicose-6-fosfatase, hexoquinase, fosfofrutoquinase 1 e fosfoenolpiruvato carboxiquinase no fígado e/ou músculo.
- Analisar a ação gênômica do fruto na variação de expressão de componentes reguladores do metabolismo energético como Prkaa1, Prkaa2, Slc5a1, Pck1, Slc2a4 no fígado e músculo.
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado sobre os níveis séricos de insulina e glicose em jejum.
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado sobre a concentração de glicogênio hepático e muscular dos animais.
- Relacionar os efeitos do tucum-do-cerrado com marcadores do estresse oxidativo, como malondialdeído e proteínas carboniladas no fígado e músculos.
- Avaliar atividade de enzimas antioxidantes como catalase, GPx, GR, GST e SOD no músculo esquelético.
- Avaliar a eficiência metabólica dos animais.

MÉTODOS

5.1 Animais

Vinte e quatro ratos Wistar machos (procedentes da Granja GR, São Paulo, Brasil) com 25 dias de idade (peso $75 \pm 6,6$ g) foram alojados em gaiolas individuais, com ciclo de luz/escuridão de 12/12h e temperatura de 23 ± 2 °C. A dieta foi ofertada *ad libitum* no período entre 16h e 8h, os animais tiveram acesso irrestrito à água durante todo o tempo. Os animais foram aclimatados por 30 dias antes do tratamento experimental, para que os animais atingissem peso médio de 200 g.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDOC número 20855/2014).

5.2 Tratamento experimental

Após 30 dias de aclimação com dieta padrão para roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais (n=6), e tratados por 12 semanas conforme descrito abaixo:

- **Controle (CT)**: Dieta AIN-93G, com 35 mg de ferro/ kg de dieta;
- **+ Ferro (+Fe)**: Dieta AIN-93G contendo 350 mg de ferro / kg de dieta;
- **Tucum-do-cerrado (Tuc)**: Dieta AIN-93G + 150 g de tucum-do-cerrado / kg de dieta;
- **Tucum-do-cerrado + Ferro (Tuc+Fe)**: Dieta AIN-93G contendo 350 mg de ferro/ kg dieta + 150 g de tucum-do- cerrado / kg de dieta.

O fruto foi adicionado na condição *in natura* e a quantidade utilizada foi definida a fim de ser proporcional ao consumo médio de frutas e hortaliças diário recomendado a um adulto saudável pelo Guia Alimentar para a População Brasileira (Brasil, 2009). A concentração de ferro na dieta suplementada foi estabelecida como dez vezes maior que o valor de necessidade diária de ferro para roedores. Esse nível de suplementação foi baseado na dose de suplementação de ferro utilizada em humanos que é de cerca de 10 vezes o valor de Ingestão Dietética Recomendada (RDA).

Os ingredientes da dieta foram obtidos na sua forma purificada (Rhooster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil), e as rações foram preparadas mensalmente e armazenadas a -20° C após o

preparo. A proporção dos ingredientes utilizados seguiu as recomendações propostas por REEVES et al., 1993 e estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3. Os frutos foram colhidos de janeiro a março de 2014, período de frutificação da espécie em uma fazenda localizada em Terezópolis de Goiás, 16°28'15.4"S e 49°03'44.1"W, Goiás, Brasil. Para fins de identificação botânica do fruto, uma amostra da espécie colhida foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília, com número de identificação 124364. A colheita e utilização foram permitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Ministério do Meio Ambiente (número de autorização 9/2012, IBAMA/Ministério do Meio Ambiente). Após colhidos, os frutos eram lavados com água destilada e estocados em freezer à -80°C até o momento do preparo da ração.

Tabela 01. Composições das dietas dos grupos experimentais e controle. Os valores encontram-se em gramas de ingrediente/kg de dieta.

Ingrediente (g/kg)	Controle	+Ferro	Tucum	Tucum + Ferro
Amido	397,5	397,5	369,6	369,6
Carboidrato (tucum-do-cerrado)	0,0	0,0	27,8	27,8
Proteína (caseína)	200,0	200,0	198,3	198,3
Proteína (tucum-do-cerrado)	0,0	0,0	1,7	1,7
Amido dextrinizado	132,0	132,0	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0	69,7	69,7
Lipídios (tucum-do-cerrado)	0,0	0,0	0,3	0,3
Fibra (celulose)	50,0	50,0	47,5	47,5
Fibra (tucum-do-cerrado)	0,0	0,0	2,5	2,5
Mix vitamínico	10,0	10,0	10,0	10,0
Mix mineral isento de ferro	35,0	35,0	35,0	35,0
L-cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Ferro	0,035	0,350	0,037	0,350

Fonte: (REEVES et al., 1993)

Tabela 02. Composição do Mix Mineral da dieta padrão AIN-93G.

Ingrediente	mg/kg de ração
Cálcio	5000,00
Fósforo	1561,00
Potássio	3600,00
Enxofre	300,00
Sódio	1019,00
Cloreto	1571,00
Magnésio	507,00
Ferro	0,035 – 0,35
Zinco	30,00
Manganês	10,00
Cobre	6,00
Iodo	0,20
Molibidênio	0,15
Selênio	0,15

Fonte: (REEVES et al., 1993)

Tabela 03. Composição do Mix Vitamínico da dieta padrão AIN-93G

Ingrediente	U/kg de ração
Niacina, mg	30
Ácido pantotênico, mg	15
Piridoxina, mg	6
Riboflavina	6
Tiamina, mg	5
Ácido Fólico, mg	2
Vitamina K, µg	750
Biotina, µg	200
Vitamina B12, µg	25
Vitamina A, UI	4000
Vitamina D3, UI	1000
Vitamina E, UI	75

Fonte: (REEVES et al., 1993)

Após 12 semanas de tratamento dietético os animais foram submetidos a jejum de 12 h e anestesiados com isoflurano 3% em câmara fechada e eutanasiados por meio de punção cardíaca. Foram removidos o fígado, o intestino e o músculo bíceps femoral. Os tecidos foram lavados em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) a 4° C, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80° C. O sangue foi coletado em tubos com ou sem EDTA 7% e centrifugado a 3.000 rpm para obtenção do plasma e soro, respectivamente.

5.3 Avaliação do consumo dietético e da variação de peso dos animais

O consumo da dieta foi avaliado diariamente por meio da diferença entre a gramatura inicial ofertada e as sobras. Os animais foram pesados semanalmente em uma balança analítica (Marte, São Paulo, Brasil). A eficiência energética foi calculada pela razão entre o ganho de peso e a ingestão alimentar (kJ) durante o período experimental (MAHER et al., 1996). A eficiência alimentar foi calculada pela razão entre ganho de peso (g) e a ingestão alimentar (g de ração) e foi expressa em percentagem da ingestão total.

5.4 Proteínas carboniladas no músculo

A determinação de proteínas carboniladas foi baseada na metodologia proposta por Richert et al., 2002. Os tecidos foram homogeneizados em tampão tris (hidroximetil) aminometano 25 mM e ureia 6 M imersos em gelo utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, EUA). Cada amostra dava origem a três alíquotas, sendo uma delas o branco. Adicionava-se a cada alíquota ácido tricloroacético 20% e posteriormente os microtubos eram centrifugados a 13.000 rpm e 4° C por cinco minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado era ressuscitado no tampão de homogeneização. Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,2% em HCl 2M era adicionada as amostras e ao branco adicionava-se apenas HCL 2M. Os tubos eram agitados durante 15 min à 4° C e 13.000 rpm. Posteriormente era adicionado TCA 20 % e os microtubos eram submetidos a uma centrifugação por 2 min à 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante era descartado e o precipitado lavado com solução de etanol e acetato de etila na proporção de 1:1 por três vezes. Após a terceira lavagem as amostras eram secas em temperatura ambiente durante 10 min e ressuscitadas em guanidina 6M em fosfato de potássio 500 mmol/L pH 2.5. Os microtubos permaneciam em agitador à 4° C durante 30 minutos a 1.300 rpm. Uma última centrifugação era realizada durante cinco minutos à 8° C e 13000 rpm. As amostras e os brancos eram lidos a 660 nm em um espectrofotômetro (Libra, Biochrom, Cambridge, Inglaterra).

5.5 Peroxidação lipídica no músculo

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no músculo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, coluna 25 cm Shim-park C18 CLC-ODS, Shimadzu, Kyoto, Japão).

As amostras foram homogeneizadas em ácido sulfúrico 1% na proporção 1:9 (p/v) utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, EUA). O homogeneizado foi centrifugado a 4° C e 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e, em seguida adicionado ácido fosfórico 440 mmol/L e ácido tiobarbitúrico 42 mmol/L. As amostras foram incubadas a 99°C durante por 60 min. Posteriormente, 500 µL dessa reação foram transferidos para outro microtubo e adicionados de de hidróxido de sódio 1 mol/L e metanol na proporção 9:91 (v/v). Após centrifugação a 4° C e 13.000 rpm por 5 min o sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon com poros de 0,22 µM.

A separação foi feita em sistema utilizando fases móveis de KH₂PO₄ 50 mmol/L pH 6,8 e metanol P.A. grau HPLC na proporção de 60 e 40%, respectivamente, e fluxo isocrático 0,6 mL/min com uma temperatura do forno de 30° C. O tempo de corrida foi de 10 min e os comprimentos de excitação e emissão foram 532 e 553 nm, respectivamente.

A concentração de MDA foi determinada utilizando uma curva-padrão do padrão 1,1,3,3-tetraetoxipropano 97% (TEP; Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) em ácido sulfúrico 1% na faixa de concentração de 0,101 a 2,02 nmol/mL. A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de HARTREE (1972) e a concentração de MDA foi expressa em nmol de MDA por mg de proteína total.

5.6 Mensuração da atividade das enzimas antioxidantes

5.6.1 Homogeneização do tecido

Para os ensaios de catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) e glutathiona-s-transferase, o músculo era homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, EDTA 0,5 mmol/L pH 7,2 1:9 (p/v) e fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 10 mmol/L 1% diluído em etanol P.A. 99%. Para o ensaio de SOD o músculo era homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L contendo EDTA 0,5 mmol/L, pH 7,8 e fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 10 mmol/L 1% diluído em etanol P.A. 99%. Todo o procedimento era feito com as amostras imersas em gelo e utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, EUA). O homogeneizado era então centrifugado por

20 min à 13.000 rpm a 4°C e o sobrenadante utilizado para mensuração da atividade enzimática. Todas as leituras foram realizadas com utilização de cubeta de quartzo no espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão).

5.6.2 Catalase (CAT)

Uma curva da cinética do decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio indicava a atividade de catalase (JOANISSE; STOREY, 1996). Foi utilizado um sistema contendo 100 µL de homogeneizado de músculo, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L e H₂O₂ 10 mmol/L, concentrações finais, com volume reacional final de 500 µL. As leituras eram realizadas a 240 nm durante 20 segundos com um intervalo de 2 segundos. O branco era obtido sem a adição de peróxido de hidrogênio. A unidade de catalase foi estabelecida como a quantidade de enzima capaz de degradar 1 µmol de H₂O₂ por minuto, tendo em vista um coeficiente de absorvidade molar de ($\epsilon_{240\text{nm}}$) 0,0394 mM⁻¹cm⁻¹.

5.6.3 Glutathione peroxidase (GPX)

A atividade de GPx foi determinada utilizando H₂O₂ como substrato, medindo-se, neste caso, apenas a atividade da GPx selênio dependente. A oxidação de NADPH pela GR foi monitorada pela leitura espectrofotométrica a 340 nm por 20s (JOANISSE; STOREY, 1996). Foi utilizado um sistema reacional com volume final de 500 µL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NaN₃ 2 mmol/L, GR 1,5 IU/mL, NADPH 0,15 mmol/L, GSH 5 mmol/L, H₂O₂ 0,2 mmol/L concentrações finais e 75 µL de homogeneizado de músculo. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ a 340 nm (HERMES-LIMA e STOREY, 1996). Uma unidade (U) de GPx foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

5.6.4 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade de GST foi determinada através da reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), e consequente formação do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutathione, detectado a 340 nm. Um sistema reacional com volume final de 500 µL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, CDBN 1 mmol/L, GSH 1 mmol/L (valores de concentração final) e 75 µL de homogeneizado de músculo. A leitura de cada amostra era feita durante 20 segundos com medições com

intervalo de 2 segundos. A atividade enzimática foi quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar a 340 nm do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutationa de $9,6 \text{ mmol/L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade (U) de GST foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto/min (HABIG; JAKOBY, 1981). Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

5.6.5 Glutationa redutase (GR)

A atividade de GR foi determinada pelo monitoramento da oxidação de NADPH a 340nm por 30s, de acordo com o proposto por JOANISSE e STOREY (1996). Para tanto foi utilizado um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NADPH 0,2 mmol/L, GSSG 1 mmol/L e 250 μL de homogeneizado de músculo. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm de $6,22 \text{ mmol/L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade (U) de GR foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

5.6.6 Superóxido Dismutase (SOD)

O protocolo utilizado para a determinação da atividade de SOD proposto por MCCORD e FRIDOVICH (1969), SUN *et al.* (1988) e adaptado por MCCORD (2001). A reação consiste na produção do íon superóxido a partir do substrato hipoxantina, reação catalisada pela xantina oxidase. O íon superóxido por sua vez reduz o citocromo c. A cinética da reação de redução do citocromo c foi monitorada por meio da leitura da absorbância a 550 nm. Um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,8, EDTA 0,5 mmol/L, citocromo c predominantemente oxidado 0,01 mmol/L, hipoxantina 0,05 mmol/L, homogeneizado de tecido e xantina oxidase suficiente para gerar uma taxa de redução do citocromo c de 0,025 abs/min.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi definida que uma unidade (U) de SOD correspondia à quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a redução do citocromo c, o qual contém 1 mg de proteína. Para obtenção desse dado, o ensaio foi realizado utilizando diferentes volumes de um mesmo homogeneizado 25,50, 100 e 150 μL para músculo). Uma função logarítmica foi gerada ao se plotar os dados das quantidades de homogeneizado utilizadas e os respectivos percentuais de inibição da redução do citocromo C. A partir desta

função foi possível encontrar o valor correspondente a uma unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

5.7 Glicogênio hepático e muscular

A mensuração de glicogênio hepático e muscular foi realizada por espectrofotometria de acordo com LO et al., 1970. Os tecidos foram digeridos em KOH 30% saturado com Na₂SO₄ e submetidos à banho-maria à 98° C dentro de tubos de vidro semiabertos. Após digestão da amostra, adicionou-se etanol 95% e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. O precipitado obtido após a centrifugação (840 x g por 30 minutos) foi ressuscitado em H₂O Milli-Q e acrescido rapidamente de uma solução de fenol 5% e H₂SO₄ 98%. As amostras foram submetidas a uma incubação de dez min à temperatura ambiente e 20 min em banho-maria à 98°C. A absorbância foi determinada a 490 nm em espectrofotômetro (Libra, Biochrom, Cambrige, Inglaterra). A concentração final de glicogênio foi obtida com base em uma curva-padrão com faixa de concentração de 0 a 100 mg de glicose por mL de meio reacional.

5.8 Concentração de insulina sérica e glicose sanguínea em jejum

Os níveis de glicose foram mensurados a partir do sangue obtido na veia caudal dos animais, através de um glicosímetro comum (Accu-chek, Roche, Indianapolis, USA). A concentração de insulina plasmática foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Sigma-Aldrich). Microplacas sensibilizadas com o anticorpo anti-insulina foram lavadas três vezes com tampão de lavagem tris (hidroximetil) aminometano 50 mM contendo *Tween-20*. Adicionou-se então tampão de ensaio contendo 0.05 M solução fosfosalina em pH 7.4, 0,025 M EDTA, 0,08% de azida de sódio e 1% de albumina sérica bovina. O soro foi adicionado a cada poço, seguido da adição de anticorpos de detecção e posterior incubação de 60 minutos. A placa foi selada e mantida protegida da luz em agitador à 500 rpm. Após 120 minutos o selo foi removido e a placa lavada três vezes em tampão de lavagem. Uma solução contendo um conjugado de peroxidase de rabanete e estreptavidina pré-titulado foi acrescida em cada poço de acordo com o manual do fabricante. A placa foi novamente selada e incubada nas mesmas condições já citadas. Após 30 minutos foram feitas seis lavagens e adicionada a solução contendo tetrametilbenzidina. A reação foi então incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi adicionado ácido clorídrico 0,3 M para interromper a reação. A absorbância foi lida à 450 e 590 nm em um leitor de microplacas (SurinseTecan, Seestrasse,

Männedorf, Suíça). Uma curva padrão com variação da concentração insulina de zero à dez ng insulina/mL foi construída para posterior determinação da concentração de insulina nas amostras de soro em ng/mL.

5.9 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração de RNA do fígado, intestino e músculo foi feita segundo protocolo do fabricante do reagente Invitrogen TRIzol[®] (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os tecidos eram homogeneizados na proporção 1:10 (p/v) em reagente trizol. Todo o procedimento era feito com as amostras imersas em gelo e usando homogeneizador elétrico (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, EUA). Posteriormente as amostras eram centrifugadas a 12.000 g, 4° C e por 10 minutos e o sobrenadante obtido era transferido para outro microtubo e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Adicionava-se então um quinto do volume correspondente ao inicial de clorofórmio P.A. > 95% e o microtubo era cuidadosamente agitado manualmente. Após incubação por 2 min a temperatura ambiente, a amostra era centrifugada a 12.000 g, 4° C. A fase aquosa era recolhida e eram adicionados metade do volume inicial de isopropanol P.A. > 95% com posterior incubação por 10 min. A amostra era novamente centrifugada à 12.000 g e 4° C por 10 min. Por fim, adicionava-se etanol 75 % e as amostras eram centrifugadas à 12.000 g e 4° C por 5 min. O precipitado resultante era ressuspenso em água deionizada.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas com base na leitura espectrofotométrica nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm e um espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão) e suas respectivas razões. As amostras foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 x volume da amostra) e etanol (2,5 x volume da amostra), incubadas a 4° C por 30 min e centrifugadas a 10.000 g, 4° C por 30 min. O precipitado obtido foi lavado em etanol 75 % e novamente centrifugado a 10.000g, 4° C e por 5 min. Após solubilização em água ultrapura o material foi estocado a -80° C. A integridade estrutural da fita simples de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1 % (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e tampão de corrida TAE 1x (tris - Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ácido bórico - Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, EDTA - Sigma, Saint Louis, MO, EUA). O gel foi corado com GelGreen[™] (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). A análise foi feita de forma qualitativa utilizando-se o software do sistema de fotodocumentação L – Pix HE Image (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil). Toda a vidraria

utilizada era deixada tratada por, no mínimo, 6 horas com dietil pirocarbonato (DEPC) para inibição de RNase.

A fita de DNA complementar foi sintetizada usando-se o kit comercial Applied Biosystems com RNase Inhibitor. As amostras de RNA eram adicionadas do mix proposto pelo fabricante (água deionizada, tampão, *primers* randômicos, dNTP mix 100 mM, inibidor de RNases e Transcriptase reversa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase). Posteriormente, a transcrição reversa foi realizada em termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA) utilizando os seguintes parâmetros: 10 minutos a 25° C, 120 min a 37° C, cinco minutos a 85° C e armazenamento a 4° C por até, no máximo, 12 horas. O cDNA sintetizado era armazenado a – 20° C e uma alíquota destas amostras foi submetida a reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) para verificar ausência de contaminação por DNA genômico.

5.10 Determinação de transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos

As concentrações de mRNA da proteína quinase dependente de AMP subunidade catalítica alfa 1 (AMPK – Pk α 1), proteína quinase dependente de AMP subunidade catalítica alfa 2 (AMPK – Pk α 2), transportador de glicose 2 (GLUT2 - Slc2a2), transportador de glicose responsivo a insulina (GLUT4 -Slc2a4), co-transportador de sódio e glicose 1 (SGLT1 – Slc5a1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK – Pck1), β -actina (Actb) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH – Gapdh) foram mensurados utilizando sistema de amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR; StepOne Plus Real Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura).

Para cada amostra, utilizou-se 2 μ L de cDNA que corresponderia a 0,02 μ g de RNA total e 5 μ L de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), além de 0,2 μ mol/L do primer respectivo a cada gene. A tabela a seguir mostra os respectivos primers utilizados no trabalho.

Tabela 04. Sequência de primers utilizados com os respectivos números de acesso no GenBank.

Gene	Sequências (5' - 3')	Número de acesso (GenBank)
Actβ (Actin β)	GTCGTACCACTGGCATTGTG CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	NM_031144
Scl2a2 (GLUT2)	AAAGCCCCAGATACCTTTACCT TGCCCCTTAGTCTTTCAAGC	NM_012879
Prkaa1 (AMPK-α1)	GAAGTCAAAGCCGACCCAAT AGGGTTCTTCCTTCGCACAC	NM_019142
Prkaa2 (AMPK-α2)	ATGATGAGGTGGTGGAGCAG GTGAATGGTTCTCGGCTGTG	NM_023991
Slc5a1 (SGLT1)	GAAGGGTGCATCGGAGAAG CAATCAGCACGAGGATGAAC	NM_013033.2
Pck1 (PEPCK)	ATACGGTGGGAACTCACTGC AGTTATGCCAGGATCAGCA	NM_198780
Gapdh (GAPDH)	TGCCCCATGTTTGTGATG GCTGACAATCTTGAGGGAGTTGT	NW_0476961
Slc2a4 (GLUT4)	CGAGTCACTCGCTGCTGA TTGCGATGCCTGAGTCTTCTT	NM_012751.1

A amplificação foi baseada em um protocolo de 40 ciclos com as seguintes características: desnaturação: 95° C por 20 segundos; hibridação: 95° C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos. Além disso, foi estabelecida uma curva de dissociação com os seguintes tempos e temperaturas: 95° C por 15 segundos, 60° C por 60 segundos, 95° C por 15 segundos e 60° C por 15 segundos. Todas as reações foram feitas em triplicata e a especificidade de cada produto amplificado foi verificada a partir da curva de dissociação (*Melting curve*).

Para determinação da eficiência das reações, curvas-padrão de cada gene de interesse foram construídas utilizando o valor do ciclo de amplificação (C_T) *versus* log da concentração de cDNA e a eficiência foi determinada a partir do valor do coeficiente angular da reta, através da equação mostrada a seguir.

$$E (\%) = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$$

Onde, E corresponde à eficiência da reação e a inclinação corresponde ao valor do coeficiente angular da reta. A eficiência do qPCR foi considerada válida quando entre 90 e 110%.

Outra curva foi construída utilizando-se os valores de ΔC_T ($C_{T \text{ gene de interesse}} - C_{T \text{ gene constitutivo}}$) *versus* o log das diluições de cDNA em unidades arbitrárias, para cada gene de interesse. Foram consideradas válidas as curvas com valor de coeficiente angular da reta menor ou igual a 0,1. A validação foi realizada segundo o tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

A expressão gênica foi estabelecida de acordo com Livak e Schmittgen, 2001 por meio do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores obtidos foram expressos em relação ao gene constitutivo – a Actb ou a Gapdh.

5.11 Mensuração da atividade enzimática – metabolismo de carboidratos

5.11.1 α -glicosidase intestinal

A atividade de α -glicosidase foi mensurada de acordo com o método proposto por Gopal et al. 2017 com algumas modificações. O intestino foi homogeneizado em solução salina 0,9% 1:9 (p/v) utilizando homogeneizador vidro-vidro. A atividade enzimática foi medida em um meio contendo tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,8) e 4-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo 3mM e monitorada a 400 nm por 40 min a 37 °C. A atividade de α -glicosidase foi detectada pela formação de p-nitrofenol a partir do substrato adicionado. A atividade enzimática foi expressa como nmol p-nitrofenol/min/mg de proteína.

5.11.2 Glicoquinase hepática e hexokinase muscular

As atividades de glicoquinase e hexoquinase foram mensuradas de acordo com MOSA *et al.*, 2015, além de algumas modificações. O tecido hepático e muscular congelado era homogeneizado a 4°C em um tampão (pH 7.5) de 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15mM 2-mercaptoetanol e 250 mM de sacarose em uma proporção 1:5 (p/v). Em seguida, os homogenatos eram centrifugados a 1000 g, 4°C e 10 minutos. Vinte e cinco microlitros do sobrenadante eram usados para determinar atividade de GK e HK em um volume final de reação de 500 µL, contendo 50 µL tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7.4, 2 mM EDTA), 100 mM MgCl₂, 5 or 100 mM glicose, 15 mM ATP, 10 mM NADP⁺, a reação era iniciada com a adição de 5 unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase e incubada por 30 segundos em temperatura ambiente. A reação foi monitorada a 340 nm por três minutos em intervalos de 10 segundos em um espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240. A atividade de glicoquinase foi estimada calculando a diferença entre formação de NADPH na presença de 5 ou 100 mM de glicose. O conteúdo de proteína total foi determinado de acordo com HARTREE, 1972. Os resultados foram expressos em nmol de NADPH/min/mg de proteína.

5.11.3 Glicose-6-Fosfatase

A atividade de glicose-6-fosfatase no fígado foi medida espectrofotometricamente a 840 nm pela formação do complexo molibdato fósforo, como descrito por BAGINSKI *et al* (1974). O tecido hepático foi homogeneizado à 4° C em tampão contendo 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2,5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA e 5 mM MgCl₂ utilizando homogeneizador elétrico em uma proporção de 1g de tecido para 10 mL de solução tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000g, 4° C por 10 min. O sobrenadante obtido era submetido a uma segunda centrifugação, a 105.000g, 4° C por 60 min. O precipitado era diluído em solução de sacarose/EDTA (0,25 M/1mM) na proporção 2:1 (peso do tecido homogeneizado/ volume solvente). A solução obtida era então utilizada para determinar a atividade de G6pase. A fração microsomal era diluída cinco vezes e 50 µL dessa diluição eram utilizados juntos a 50 µL tampão de homogeneização, 50 µL of 100 mM glicose-6-fosfato, 50 µL 0.25M sacarose/1mM EDTA, para um volume final de 200 µL. O meio reacional era incubado a 37°C por 10 minutos e 1 mL da solução ácido ascórbico e ácido tricloroacético 2%/10% (p/v) era usado para interromper a reação. A mistura era centrifugada a 3.000 g por 3 min e adicionava-se então 50 µL of 1% (p/v) molibdato de amônia e 100 µL de 2%/2% (p/v) arsenito/citrato em uma placa

de 96 poços. A reação era então incubada à temperatura ambiente durante 15 min e a leitura da absorvância era feita a 840 nm. Uma solução padrão de 1,5 mM de fosfato foi submetida aos mesmos procedimentos e os resultados foram expressos em nmol de Pi/ min/mg de proteína. O conteúdo total de proteínas do homogenato foi determinado de acordo com Hartree (1972).

5.11.4 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

A atividade de PEPCK no fígado foi realizada de acordo com HAYANGA *et al* (2016). O fígado foi homogeneizado a 4°C em solução tampão contendo 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2,5 mM ditioneitol, 1 mM EDTA e 5 mM MgCl₂ na proporção 1:10 de tecido para solução tamponante (p/v). Após homogeneização, uma centrifugação a 11,000 g, 4°C por 30 minutos foi realizada e o sobrenadante era transferido para outro tubo e novamente centrifugado (105,000 g, 4°C e 60 min). 50 µL do sobrenadante eram utilizados para mensuração da atividade enzimática realizada em um volume final de 500 µL, contendo 50 mM HEPES/KOH, 1 mM MgCl₂, 10 mM IDP, 1 mM ditioneitol, 0,25 mM NADH, 2 mM fosfoenolpiruvato, 50 mM Na₂CO₃ e 10 U/ml of malato desidrogenase. A taxa de oxidação de NADH foi calculada usando o coeficiente de extinção molar (6.22 mM/cm) em um leitor de placas (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA). Uma unidade de enzima foi estabelecida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de NADH/min/mg de proteína.

5.11.5 Fosfofrutoquinase (PFK-1)

A atividade da enzima fosfofrutoquinase foi mensurada de acordo com Coelho *et al* 2007. O tecido congelado era homogeneizado a 4°C em um tampão (pH 7.5) de 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15mM 2-mercaptoetanol e 250 mM de sacarose em uma proporção 1:5 (p/v). O homogenato era centrifugado a 1000 g, 4°C e 10 minutos. Seis microlitros do sobrenadante eram usados para determinar a atividade de PFK-1 em um volume de 300 µL contendo 50 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM frutose-6-fosfato, 1 mM ATP, 0,5 mM NADH, 2 U/mL aldolase, 2 U/mL triose fosfato isomerase e 2 U/mL alfa-glicerofosfato desidrogenase. Após uma incubação em temperatura ambiente por 25 minutos a absorvância da reação foi monitorada a 340 nm por 20 minutos em um leitor de placas (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA). O resultado foi expresso em miligramas de NADH oxidado/min.

5.12 Proteínas totais nas amostras

A determinação do conteúdo de proteínas totais nos homogeneizados de tecido foi realizado segundo método de Lowry modificado por Hartree, 1972.

5.13 Análise estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliação da normalidade. Para comparação entre os grupos utilizou-se o teste de comparações múltiplas (ANOVA) com correção de Bonferroni. O software SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para essas análises. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

CAPÍTULO 2

Artigo Original

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 glucose uptake via AMPK pathway

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 glucose uptake via AMPK pathway

André Barroso Heibel¹, Marcela de Sá Barreto da Cunha^{1,2}, Clara Tamy Seó Ferraz³, Sandra Fernandes Arruda^{1,3*}.

¹ Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil. andreheibel@gmail.com

² Biological and Health Sciences Center, Campus Reitor Edgard Santos, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, 47810-059, Brazil.

³ Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

***Corresponding author:** Sandra Fernandes Arruda (arruda@unb.br); phone: +55 61 31070092

Running title: Tucum-do-cerrado may enhance hepatic glucose response

ABSTRACT

Dietary phytochemicals may improve glucose metabolism while iron excess seems to be associated to impaired glucose homeostasis and insulin responses. This study investigated the effect of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) consumption on the carbohydrate metabolism and redox response in rats supplemented or not with dietary iron. Male wistar rats were treated with one of the following diets: CT: control diet (AIN-93G); +Fe: iron-enriched diet; Tuc: control diet + 15% tucum-do-cerrado or Tuc+Fe: iron-enriched diet + 15% tucum-do-cerrado. Iron supplementation increased muscle lipid and protein oxidation, hepatic glucokinase (GK) and phosphofrutokinase 1 (PFK1) activities and decreased hepatic glucose-6-phosphatase (G6Pase), intestinal Slc2a2 and muscle Slc2a4 and Prkaa2 α mRNA levels compared to CT group. Tucum-do-cerrado consumption (Tuc) increased hepatic Slc2a2, Prkaa1 α , Prkaa2 α and intestinal Slc5a1 mRNA levels, also decreased hepatic G6Pase activity, muscle Slc2a4 and Prkaa2 α in relation to CT group. The association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet increased hepatic Prkaa1 and Pck1 compared to the CT and +Fe groups, intestinal Slc2a2 mRNA levels compared to the +Fe group, while decreased hepatic G6Pase activity in relation to the CT, +Fe and Tuc+Fe groups and muscle Slc2a4 and Prkaa2 α compared to CT group. These results suggest that tucum-do-cerrado consumption might induce Prkaa1 α and Prkaa2 α expression, which may inhibit gluconeogenic rate limiting enzyme, G6Pase, and upregulates GLUT2 hepatic glucose uptake. In addition, moderate iron supplementation improves intracellular hepatic glucose response, stimulating the glycolytic rate limiting enzymes GK and PFK1 while inhibiting gluconeogenic enzyme G6Pase.

Keywords: tucum-do-cerrado, phytochemicals, iron, gluconeogenesis, glycolysis, Prkaa

6.1 INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is characterized by insulin resistance and diminished insulin secretion, resulting in the dysregulation of glucose homeostasis and, consequently, higher fasting and postprandial glucose levels. Blood and tissue glucose homeostasis are maintained by glucose absorption, peripheral tissue glucose uptake and hepatic endogenous synthesis of glucose [1].

Intestinal glucose absorption is mediated by the sodium-dependent glucose transporter (SGLT1) and glucose transporter 2 (GLUT2) [2] and influenced by the efficiency of carbohydrate digestion catalyzed by α -amylase and intestinal α -glucosidase. Muscle and adipose tissue glucose uptake is increased by insulin, which promotes glucose transporter 4 (GLUT4) expression and subsequent translocation to the plasma membrane, increasing glycogen synthesis. In the liver, insulin inhibits glucose synthesis (gluconeogenesis) and glycogen breakdown (glycogenolysis) [1], by inhibiting the transcription of some genes that encode gluconeogenic enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), and increasing the transcription of the glycolytic enzymes glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK) [1].

Epidemiological studies suggest that high iron levels are associated with a higher risk of T2D [3–6]. Iron loosely bound to low molecular weight compounds is associated with a higher production of reactive oxygen species (ROS), which are related to inflammation and oxidative damage to biomolecules [7–9] and, consequently, to chronic disease development. Tissue iron excess has been shown to increase ROS generation and mitochondrial dysfunction that results in stimulated gluconeogenesis via upregulation of PEPCK expression [10]. The 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a key role in the maintenance of energy homeostasis. As an energy sensor, AMPK is activated when the AMP or ADP to ATP ratio increases, leading to GLUT4 translocation to the plasma membrane and increased glucose uptake by muscle and adipose tissue [11]. Some studies suggest that iron levels modulate AMPK activity; a high iron diet stimulated AMP-activated protein kinase activity in liver and muscle, increasing glucose uptake and inhibiting hepatic gluconeogenesis [12], while Merrill *et al.* (2012) [13] showed a significant increase in AMPK α 1 activity and a reduction in AMPK α 2 subunit protein with chronic iron deficiency.

Dietary phytochemical compounds may modulate the redox response [14], iron metabolism [15,16] and carbohydrate metabolism [17,18]. Polyphenols appear to improve insulin sensitivity and glucose metabolism by decreasing intestinal glucose absorption through

the inhibition of α -glucosidase activity [19,20] and SGLT1 and GLUT2 glucose transport [18], while enhancing GLUT4 glucose uptake through the AMPK signaling pathway [21-24].

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.), a Brazilian savanna fruit, is a rich source of different classes of polyphenols, mostly in the peel [25]. Along with its high *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity [25,26], tucum-do-cerrado also inhibits hepatic hepcidin expression and consequently modulates iron homeostasis [26]. Therefore, we hypothesized that the dietary consumption of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) could enhance the antioxidant capacity of tissues, modulate iron metabolism in iron supplemented rats and modulate carbohydrate metabolism ameliorating glucose metabolism.

To investigate this hypothesis, we evaluated the redox response as determined by antioxidant enzymatic activity and oxidative damage to protein and lipid in muscle. Glucose homeostasis was evaluated via fasting serum glycemia and insulin; glycogen concentration in liver and muscle; hepatic glucokinase (GK), phosphofructokinase 1 (PFK1), glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and muscle hexokinase (HK) and PFK1 specific activity. Carbohydrate absorption was quantified via SGLT1 (Slc5a1) and GLUT2 (Slc2a2) mRNA levels in the intestine; tissue glucose uptake by GLUT4 (Slc2a4) in the muscle and GLUT2 (Slc2a2) mRNA levels in the liver; and energy homeostasis by protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 and 2 (Prkaa1 and Prkaa2) mRNA levels in the liver and muscle.

6.2 METHODS

6.2.1 Fruit collection

Tucum-do-cerrado fruits (*Bactris setosa* Mart.) were gathered during the end of the summer, in the tucum-do-cerrado's ripening period in Terezópolis de Goiás, 16°28'15.4"S and 49°03'44.1"W, Goiás, Brazil. A voucher specimen was deposited in the UB Herbarium of the University of Brasília, Brazil and identified with the ID number 124364. The collection process was allowed by the *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) /Ministério do Meio Ambiente* (authorization number 9/2012, IBAMA/MMA). The tucum-do-cerrado fruits were washed with distilled water, the pulp and peel separated from the seeds, homogenized in a blender and subsequently added to the rat's diet. The diet preparation was performed as described in our previous study [27].

6.2.2 Experimental protocol

Twenty-four male Wistar rats (25 days-old, 75.0 ± 6.6 g, Granja GR, São Paulo, Brazil) were housed individually in stainless-steel cages at ambient room temperature (23 ± 2 °C) under a 12 h light cycle. Diets were offered during the dark cycle with free access to water. Rats were acclimated until they reached adulthood (eight weeks, 248.9 ± 18.6 g) and then randomly allocated into one of the four experimental groups. The control group received a standard AIN-93G diet containing 35 mg of iron per kg of food [28]; the iron supplemented group (+Fe) received the AIN-93G diet supplemented with 350 mg of iron per kg of food; the tucum-do-cerrado group (Tuc) was fed with the standard diet plus 150 g of the fruit's pulp and peel per kg of food; and the tucum-do-cerrado plus iron supplementation (Tuc+Fe) group received the control diet added with 150 g of tucum-do-cerrado peel and pulp/kg of food and 350 mg of iron/kg of food). The animals were weighed once a week and food intake was recorded daily. Rats were euthanized after 12 weeks of treatment by cardiac puncture after an isoflurane 3% anesthesia. Blood was collected into two tubes with and without 7.0% EDTA. The liver, intestine and biceps femoris muscle were removed by a trained technician, washed in saline and quickly frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C for further analysis. The experimental protocol and the animal procedures were approved by The Animal Care and Use Committee of the University of Brasília (UnBDoc 20855/2014).

6.2.3 Food and energy efficiency ratios

The energy efficiency ratio was calculated as body weight gain (g) divided by energy intake (kJ) throughout the feeding period [29]. Food efficiency was determined as the ratio between body weight gain (g) and food intake (g) and expressed in percentage of total food intake.

6.2.4 Oxidative damage markers

Carbonylated protein levels were assessed in muscle as described by Richert *et al.* (2002) [30]. Carbonyl content was determined spectrophotometrically at 376 nm using a Shimadzu – TCC 240A spectrophotometer and expressed as nmol carbonyl/mg of total protein using the molar extinction coefficient of 22,000 mM/cm. Lipid peroxidation in muscle was determined by high performance liquid chromatography as described by CANDAN and TUZMEN (2008) [31]. Malondialdehyde concentration was expressed in nmol malondialdehyde (MDA)/mg total protein.

6.2.5 Antioxidant enzymatic activity in muscle

The activities of catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), and glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) were measured as described previously by our group [32]. Superoxide dismutase activity (SOD, EC 1.15.1.1) was determined using the protocol of Sun *et al.* (1988) [33] and adapted by MCCORD (2001) [34]. All results were expressed in units of the enzyme/mg of total protein.

6.2.6 Liver and muscle glycogen

Tissue glycogen concentration was determined as described by Lo *et al.* (1970) [35]. Tissues were digested in a 30% KOH solution saturated with Na₂SO₄ (1:10 w/v) in a water bath at 98°C for 30 min. After cooling, a 95% ethanol solution (3,5x homogenate volume) was added and samples were boiled for 5 min and centrifuged at 840 g for 5 min at 4°C). The glycogen precipitates were resuspended in 400 µL of distilled water, 400 µL of 5% phenol solution and 2000 µL of 98% sulfuric acid solution were added to each sample. The samples were then incubated at 98°C in a water bath during 20 min. The absorbance was measured at 490 nm (spectrophotometer Libra, Biochrom, Cambridge, England). A standard curve was performed using standard glucose solutions in a concentration range of 0 - 100 mg/mL and glycogen concentration was expressed in mg of glycogen/mg of tissue [35].

6.2.7 Glycemia and insulin

Fasting blood glucose concentration was determined from a blood sample obtained from the caudal vein by colorimetric measurement (Accu-chek, Roche, Indianapolis, USA). Fasting insulin concentration was determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, according to the manufacturer's assay protocol (Millipore Corporation, Missouri, USA).

6.2.8 mRNA extraction and transcripts levels

TRIzol reagentTM (Invitrogen Inc., Burlington, ON, Canada) was used to perform RNA extraction as described previously [36]. A high-capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize complementary DNA (cDNA). The transcription levels of glucose transporter 2 (Slc2a2), sodium-dependent glucose co-transporter 1 (Slc5a1), protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (Prkaa1), protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 (Prkaa2),

phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1), insulin responsive glucose transporter (Slc2a4/Glut4) were determined using real-time polymerase chain reaction (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Singapore). The mRNA levels of Slc2a2 and Slc5a1 were determined in the intestine, mRNA levels of Prkaa1 and Prkaa2 in the liver and muscle, and mRNA levels of Slc2a2, Slc2a4 and Pck1 in the liver. A qRT-PCR reaction was assembled using Fast SYBR Green Master Mix 2x reagent, 2.0 μ L of cDNA and 0.2 μ mol/L of each primer, in a final volume of 10 μ L. The forward (FP) and reverse primers (RP) used for real time PCR reactions are shown in table 01. Each amplicon's specificity was evaluated by its melting curve's analysis. The comparative C_T method was used to quantify the abundance of target gene mRNA, and the results are presented as $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [37]. All samples were assayed in triplicate and were normalized to the housekeeping gene β -actin (Actb) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh).

Table 01. Primers sequences used for amplification of Slc2a2, Prkaa1, Prkaa2, Slc5a1, Pck1 and Slc2a4 by real-time PCR assays and the GenBank accession numbers.

GENE	Primers sequences (5' - 3')	GenBank accession number
Act β (Actin β)	GTCGTACCACTGGCATTGTG CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	NM_031144
Slc2a2 (GLUT2)	AAAGCCCCAGATACCTTTACCT TGCCCCTTAGTCTTTTCAAGC	NM_012879
Prkaa1 (AMPK- α 1)	GAAGTCAAAGCCGACCCAAT AGGGTTCCTTCCTTCGCACAC	NM_019142
Prkaa2 (AMPK- α 2)	ATGATGAGGTGGTGGAGCAG GTGAATGGTTCTCGGCTGTG	NM_023991
Slc5a1 (SGLT1)	GAAGGGTGCATCGGAGAAG CAATCAGCACGAGGATGAAC	NM_013033.2
Pck1 (PEPCK)	ATACGGTGGGAACCTCACTGC AGTTATGCCCAGGATCAGCA	NM_198780
Gapdh (GAPDH)	TGCCCCATGTTTGTGATG GCTGACAATCTTGAGGGAGTTGT	NW_0476961
Slc2a4 (GLUT4)	CGAGTCACTCGCTGCTGA TTGCGATGCCTGAGTCTTCTT	NM_012751.1

6.2.9 Carbohydrate-metabolism related enzymatic activity

Intestinal α -glucosidase (GLY, EC 3.2.1.48) activity was measured as performed by Gopal *et al.* (2017) [38] with minor modifications. Intestinal homogenate was prepared freshly in a 0.9% saline with a glass homogenizer. Enzymatic activity was assayed in a sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8). The α -glucosidase activity was measured in a spectrophotometer (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA) at 400 nm by the formation of p-nitrophenol from 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (3 mM) during a 40-min reaction at 37 °C. The results were expressed as nmol of p-nitrophenol/min/mg of protein.

Glucokinase (GK, EC 2.7.1.2) and hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) activity were determined as described by Mosa *et al.* (2015) [39], with some modifications. Briefly, frozen liver and muscle tissues were homogenized at 4°C in a 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15mM 2-mercaptoethanol and 250mM sucrose buffer solution (pH 7.5), in a proportion of 1:5 (w/v).

After, the homogenates were centrifuged at 1,000g at 4°C for 10 min. Twenty-five microliters of supernatant were used to determine GK and HK activity in a final reaction volume of 500 μ L, containing 50 μ L phosphate buffer (100 mM, pH 7.4, 2 mM EDTA), 100 mM MgCl₂, 5 or 100 mM glucose, 15 mM ATP, 10 mM NADP⁺, the reaction was initiated by addition of 5 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase and incubated for 30 s at room temperature. The reaction was monitored at 340 nm for 3 min at 10 s interval (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A). Hexokinase enzyme activity was taken as the amount of NADPH formed in the presence of 5 mM of glucose. Glucokinase activity was estimated calculating the difference between the formation of NADPH in the presence of 100 and 5 mM of glucose. Total protein content in each homogenate was determined using the HARTREE (1972) method [40]. The results were expressed as nmol of NADPH/min/mg of protein.

Glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity in the liver was measured spectrophotometrically (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA) at 840 nm by the formation of molybdate – phosphorus complex, as described by Baginski *et al.* (1974) [41] with modifications. Liver was homogenized at 4°C in a 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ buffer solution using an electric homogenizer, in a proportion of 1:10 (w/v). After centrifugation at 11,000g at 4°C for 10 min the supernatant was transferred to another tube and centrifuged at 105,000g at 4°C for 60 min. The pellet was dissolved in a solution of sucrose/EDTA (0.25

M/1mM) in a proportion of 2:1 (weight of homogenized tissue/volume of sucrose/EDTA) and used to determine G6Pase activity. The microsomal fraction was then diluted 5x and 50 μ L was used to determine G6Pase activity in a final reaction volume of 200 μ L, containing 50 μ L homogenization buffer, 50 μ L of 100 mM glucose-6-phosphate, 50 μ L 0.25 M sucrose/1 mM EDTA. The reaction mixture was incubated at 37 °C / 10 min and 1 mL of ascorbic acid/trichloroacetic acid 2%/10% (w/v) was added to stop the reaction. The mixture was centrifuged at 3,000g for 3 min and 100 μ L of supernatant, 50 μ L of 1% (w/v) ammonium molybdate and 100 μ L of 2%/2% (w/v) arsenite/citrate were added to a 96 well plate. The reaction was incubated at room temperature for 15 min and the absorbance read at 840 nm. A 1.5 mM phosphate standard solution was submitted to the same procedures described above and a negative control reaction was performed adding the sample after the ascorbic acid/trichloroacetic solution. Total protein content in each homogenate was determined using the HARTREE (1972) method [40]. The results were expressed as nmol of Pi/min/mg of protein.

Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was determined as described by Hayanga *et al.* (2016) [42]. Liver was homogenized at 4°C in a 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2,5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ buffer solution using an electric homogenizer, in a proportion of 1:10 (w/v). After centrifugation at 11,000g, at 4°C for 30 min the supernatant was transferred to another tube and centrifuged at 105,000g, at 4°C for 60 min. The cytosolic fraction (supernatant) was used to measure the enzyme activity, in a final reaction volume of 300 μ L, containing 50 mM HEPES/KOH, 1 mM MgCl₂, 10 mM IDP, 1 mM dithiothreitol, 0.25 mM NADH, 2 mM phosphoenolpyruvate, 50 mM Na₂CO₃ and 10U/ml of malate dehydrogenase. The absorbance of the reaction was monitored at 340 nm for 3 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA). The rate of NADH oxidation was calculated using a molar extinction coefficient of 6.22 mM/cm. One unit of NADH oxidized was the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of NADH/min/mg of protein.

Enzymatic activity of phosphofructokinase-1 (PFK1) activity was quantified as described by Coelho *et al.* (2007) [43] with modifications. Briefly, frozen liver and muscle tissues were homogenized at 4°C in a 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15mM 2-mercaptoethanol and 250mM sucrosebuffer solution (pH 7.5), in a proportion of 1:5 (w/v). After, the homogenates were centrifuged at 1,000g at 4°C for 10 min. Thereafter, 6 μ L of the supernatant was used to determine PFK1 activity in a final reaction volume of 300 μ L, containing 50 mM Tris HCl pH

7.4, 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM fructose-6-phosphate, 1 mM ATP, 0.5 mM NADH, 2 U/mL aldolase, 2 U/mL triose phosphate isomerase and 2 U/mL alpha-glycerophosphate dehydrogenase. After the incubation at room temperature for 25 min, the absorbance of the reaction was monitored at 340 nm for 20 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, California, USA). The results were expressed as the oxidation of NADH per milligram of protein / min.

6.2.10 Statistical analysis

Comparisons among Control group (CT) versus iron supplemented (+Fe), tucum-do-cerrado (Tuc) and tucum-do-cerrado + iron supplemented (Tuc + Fe) groups, and between +Fe versus Tuc + Fe groups were tested using One-Way ANOVA with Bonferroni correction using SPSS version 17 software (SPSS Inc., Chicago, USA). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. All values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

6.3 RESULTS

Final body weight, food intake, daily energy intake, food and energy efficiency ratio

After 12 weeks of treatment, no differences in final body weight, food intake, daily energy intake, food and energy efficiency ratio were shown between any groups (table 02).

Table 02. Effect of tucum-do-cerrado and iron supplementation in final body weight, food intake, daily energy intake, food efficiency ratio and energy efficiency ratio after 12-week treatment.

	CT	+Fe	Tuc	Tuc+Fe
Final body weight (g)	471.0 \pm 41.6	479.1 \pm 40.2	436.3 \pm 39.6	445.2 \pm 55.1
Body weight gain (g)	218.7 \pm 29.2	223.8 \pm 26.8	195.3 \pm 31.4	197.2 \pm 39.8
Food intake (g/day)	19.4 \pm 1.3	20.4 \pm 0.5	18.7 \pm 0.9	20.2 \pm 1.8
Daily energy intake (kcal/day)	69.1 \pm 4.6	72.7 \pm 1.9	66.8 \pm 3.2	69.9 \pm 8.2
Food efficiency ratio (%)	13.7 \pm 1.1	13.6 \pm 1.2	12.7 \pm 1.6	12.2 \pm 1.4
Energy efficiency ratio (g/Kcal)	0.039 \pm 0.003	0.038 \pm 0.003	0.036 \pm 0.004	0.034 \pm 0.004

CT = Control diet; +Fe = Iron supplemented diet; Tuc = tucum-do-cerrado supplemented diet; Tuc+Fe = Iron and tucum-do-cerrado supplemented diet. Data correspond to average \pm standard deviation (n = 6). * Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$).

Muscle oxidative damage

After 12-weeks of treatment, iron-enriched (+Fe) diet increased muscle lipid peroxidation compared to the control group ($p = 0.011$), while tucum-do-cerrado and its with the iron-enriched diet did not alter muscle MDA levels compared to CT, +Fe or Tuc groups (figure 01). Muscle carbonyl levels were higher in rats treated with iron-enriched diet (+Fe) in relation to the control diet ($p = 0.003$). The Tuc+Fe group showed higher muscle carbonyl levels compared with the Tuc group ($p = 0.010$; figure 01).

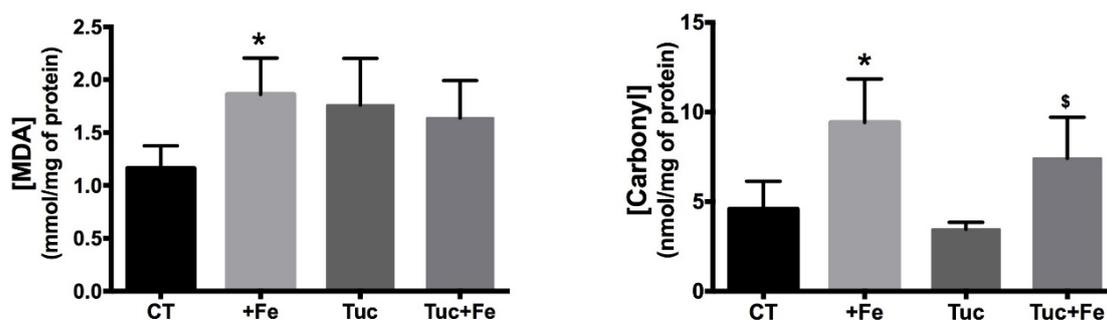


Figure 01: Lipid peroxidation and carbonyl content in the muscle of rats treated with control diet (CT), iron-enriched diet (+Fe), tucum-do-cerrado diet (Tuc) and the association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe) for 12 weeks of treatment. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). * Statistical difference compared to CT group ($p < 0.05$). \$ Statistical difference compared to TUC group ($p < 0.05$). MDA: malondialdehyde. Carbonyl: Carbonylated proteins.

Antioxidant enzymes specific activities

The activity of antioxidant enzymes in muscle are shown in table 03. Neither tucum-do-cerrado consumption (Tuc), iron supplementation (+Fe) nor the association of tucum-do-cerrado with the iron-enriched diet (Tuc+Fe) altered the specific activities of CAT, GPX, GR, GST and SOD in muscle (all $p > 0.05$).

Table 03. Effect of tucum-do-cerrado consumption on the specific activity of antioxidant enzymes in muscle of rats supplemented or not supplemented with iron for 12-weeks.

Enzyme	CT	+Fe	Tuc	Tuc+Fe
SOD	2.52 \pm 0.3	2.51 \pm 0.5	3.1 \pm 1.1	2.5 \pm 0.8
CAT	2.1 \pm 0.6	2.1 \pm 0.6	2.1 \pm 0.6	2.7 \pm 0.8

GST	7.6 ± 0.9	6.8 ± 1.7	7.1 ± 2.0	9.1 ± 1.9
GR	15.8 ± 3.2	21.4 ± 5.8	13.8 ± 4.7	21.3 ± 6.7
GPx	85.2 ± 28.5	114.6 ± 28.0	79.0 ± 19.1	85.6 ± 19.4

CT = Control diet; +Fe = Iron supplemented diet; Tuc = tucum-do-cerrado supplemented diet; Tuc+Fe = Iron and tucum-do-cerrado supplemented diet. CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione S transferase; SOD, superoxide dismutase. Data correspond to average ± standard deviation (n = 6).

Glycemia and insulin

No differences were shown in the levels of blood glycemia and serum insulin between treatment groups (all p > 0.05) (Table 04).

Table 04. Effect of tucum-do-cerrado and/or iron supplementation in the glycemia, insulin and HOMA-IR of rats treated for 12 weeks.

	CT	+Fe	Tuc	Tuc+Fe
Glycaemia (mg/dL)	125.6 ± 12.2	122.2 ± 9.76	113.8 ± 13.6	116.8 ± 13.9
Insulin (ng/mL)	1.09 ± 0.2	2.36 ± 1.7	1.23 ± 0.4	0.59 ± 0.0

CT = Control diet; +Fe = Iron supplemented diet; Tuc = tucum-do-cerrado supplemented diet; Tuc+Fe = Iron and tucum-do-cerrado supplemented diet. Data correspond to average ± standard deviation (n = 6).

Glycogen concentration in liver and muscle

Liver and muscle glycogen concentration are shown in figure 02. Although the iron-enriched diet (+Fe) and tucum-do-cerrado consumption (Tuc) did not change glycogen concentration in the liver, the association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe) promoted a marginal decrease in hepatic glycogen concentration in relation to the control group (p = 0.054) and a significant decrease compared to the Tuc group (p = 0.003). There were no differences between any treatment in muscle glycogen concentration.

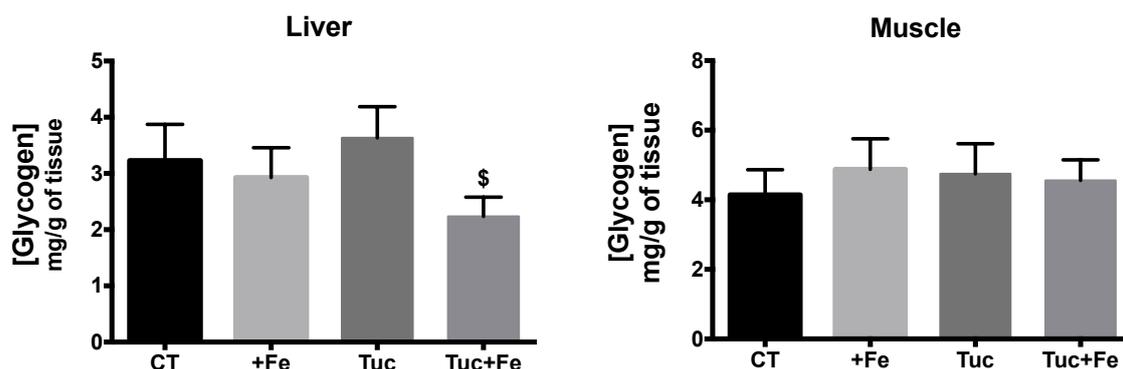


Figure 02: Muscle and liver glycogen concentration in rats treated with control diet (CT), iron-enriched diet (+Fe), tucum-do-cerrado diet (Tuc) and the association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe) for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation (n = 6). \$ Statistical difference compared to Tuc group (p < 0.05).

Carbohydrate-metabolism related markers in the intestine

The iron-enriched diet (+Fe) did not alter intestinal Slc5a1 mRNA levels, while tucum-do-cerrado consumption (Tuc) significantly increased intestinal Slc5a1 mRNA levels in relation to CT (p = 0.004). No difference was observed in the Slc5a1 mRNA levels in the intestine comparing Tuc+Fe group to the Tuc and +Fe groups. Iron supplementation (+Fe) promoted a significant decrease in Slc2a2 mRNA levels in the intestine compared to the control diet (p = 0.049). Although tucum-do-cerrado consumption did not alter intestinal Slc2a2 mRNA levels, the association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet increased Slc2a2 mRNA levels in the intestine compared with +Fe diet (p = 0.010). No differences were shown in intestinal α -glucosidase activity between any group (figure 03).

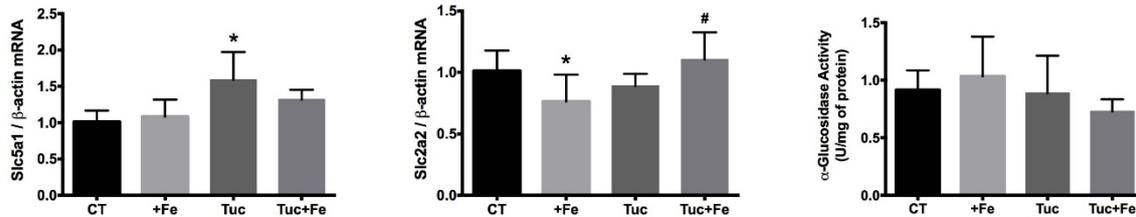


Figure 03: Intestinal mRNA levels of Slc5a1 (SGLT1) and Slc2a2 (GLUT2) and α -glucosidase activity in rats treated with control diet (CT), iron-enriched diet (+Fe), tucum-do-cerrado diet (Tuc) and association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe), for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation (n = 6). * Statistical difference compared to CT group and # statistical difference compared to +Fe group (p < 0.05).

Carbohydrate-metabolism related markers in the liver

In the liver (figure 04), Tuc increased hepatic mRNA levels of Slc2a2 compared to CT (p = 0.002). Although iron supplementation did not change hepatic mRNA levels of Slc2a2 compared to CT, Tuc+Fe marginally improved hepatic mRNA levels of Slc2a2 in relation to +Fe diet (p = 0.071).

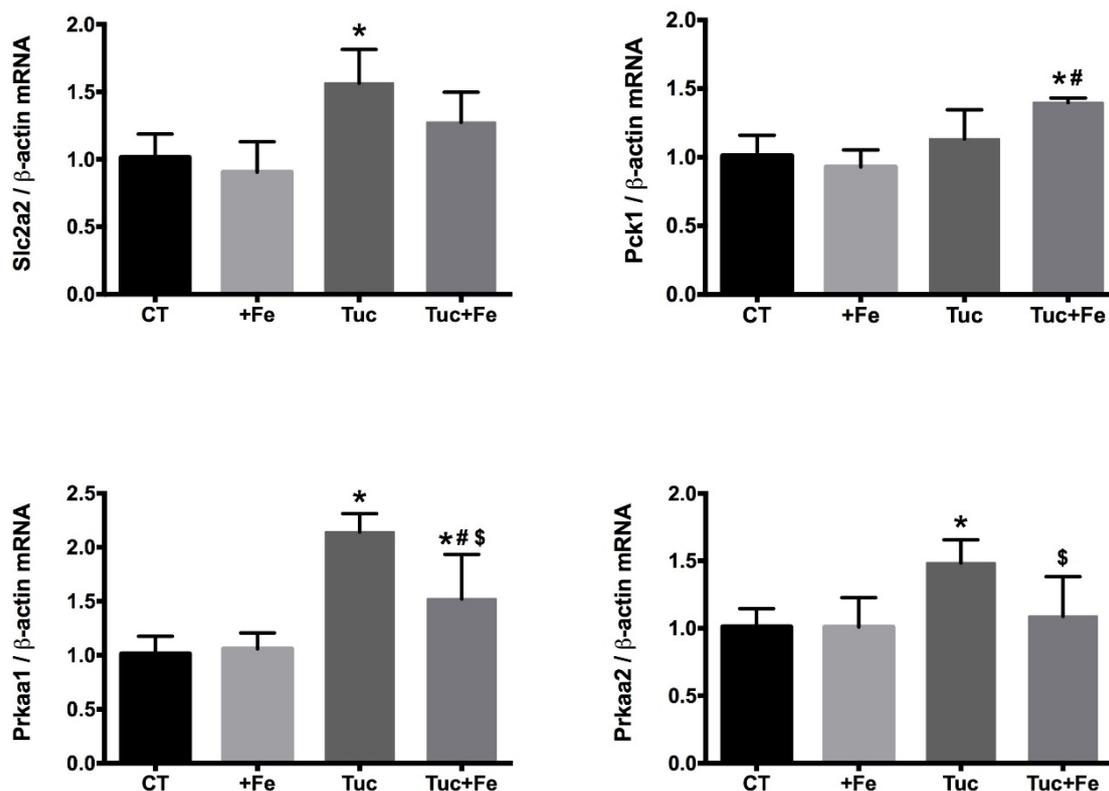


Figure 04: The mRNA levels of Slc2a2 (GLUT2), Prkaa1 (AMPK- α 1), Prkaa2 (AMPK- α 2) and Pck1 (Pepck1) in the liver of rats treated with control diet (CT), iron-enriched diet (+Fe), tucum-do-cerrado diet (Tuc) and association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe), for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation (n = 6). * Statistical difference compared to CT group, # compared to +Fe group and \$ compared to Tuc group and (p < 0.05). Although iron supplementation (+Fe) and tucum-do-cerrado consumption (Tuc) did not alter mRNA levels of Pck1 in the liver in relation to the control group (figure 4), the association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe) significantly increased hepatic Pck1 mRNA levels compared to control (p = 0.006) and +Fe (p = 0.001), and marginally increased compared with the Tuc group (p = 0.089).

Regarding mRNA levels of the protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (Prkaa1) and alpha 2 (Prkaa2) in the liver (figure 04), tucum-do-cerrado consumption (Tuc), as well as its association with iron supplementation (Tuc+Fe), increased the Prkaa1 mRNA levels in relation to control group (p < 0.001 and 0.016). The hepatic Prkaa1 mRNA levels of Tuc+Fe group were higher than +Fe (p = 0.031) and lower than the Tuc group (p = 0.004). Iron supplementation (+Fe group) did not alter Prkaa1 mRNA levels in relation to the control group.

Tucum-do-cerrado consumption (Tuc) increased the hepatic Prkaa2 mRNA levels in relation to control diet (p = 0.009), while the association of tucum-do-cerrado with iron-

enriched diet (Tuc+Fe) promoted a decrease in these levels compared to the tucum-do-cerrado diet (Tuc; $p = 0.048$), but not with +Fe diet. Iron supplementation (+Fe) did not alter hepatic Prkaa2 mRNA levels in relation to both control and Tuc+Fe diets (figure 04).

To investigate the modulation of glycolysis and gluconeogenic metabolic pathways by tucum-do-cerrado and iron supplementation, the specific activity of some rate limiting enzymes were evaluated (figure 05). Hepatic glucokinase (GK) and phosphofructokinase-1 (PFK1) activities were significantly increased for +Fe compared to CT ($p = 0.014$ and 0.026 , respectively), but Tuc and Tuc+Fe did not alter hepatic GK and PFK1 activity compared to CT (figure 05). GK and PFK1 hepatic activity in the Tuc+Fe was not different from +Fe and Tuc groups. Iron supplementation (+Fe), tucum-do-cerrado consumption (Tuc) and the association of both (Tuc+Fe) promoted a decrease in hepatic glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity in relation to CT group ($p = 0.037$; 0.011 and < 0.001 , respectively; figure 05). The Tuc+Fe group also showed lower G6Pase activity in the liver compared to +Fe and Tuc groups (0.008 and 0.024 , respectively). No differences were shown in hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity in any group.

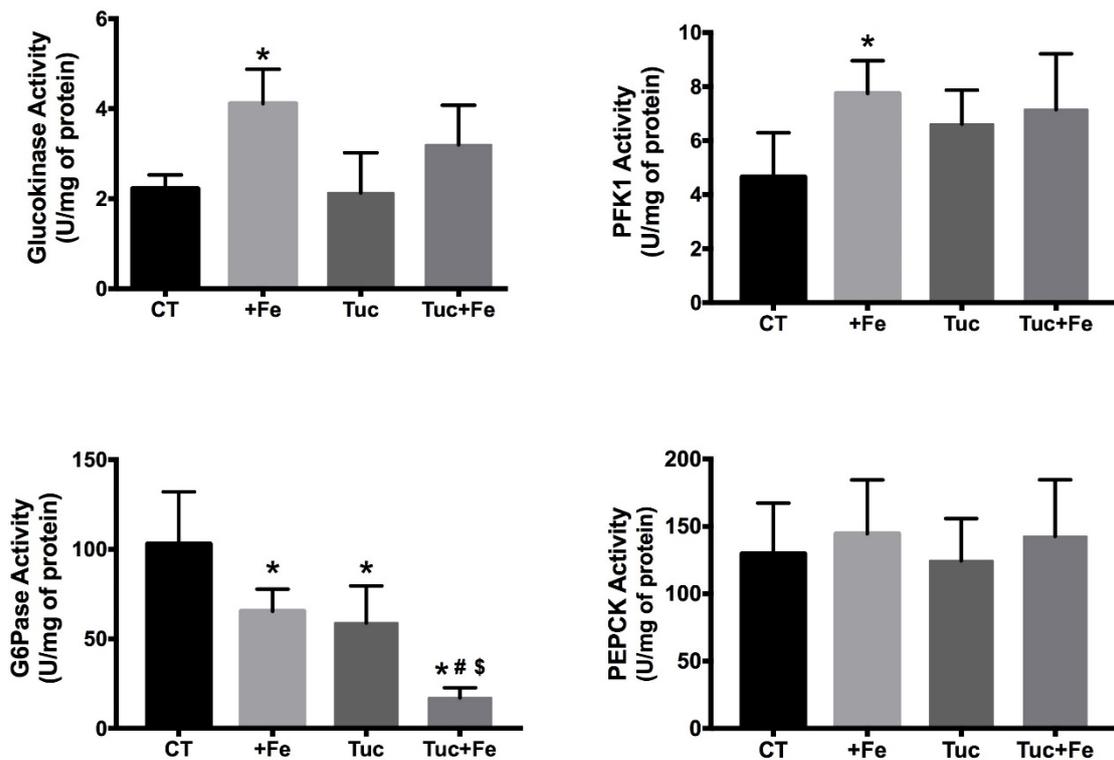


Figure 05: Glucokinase (GK), phosphofructokinase 1 (PFK1), Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) specific activity in rats liver treated with control diet (CT), tucum-do-cerrado diet (Tuc), iron-enriched diet (+Fe) and

association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe), for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation (n = 6). * Statistical difference compared to CT group (p < 0.05), # compared to +Fe group and \$ compared to Tuc group (p < 0.05).

Carbohydrate metabolism related markers in muscle

In muscle, all treatments decreased Slc2a4 mRNA levels (GLUT4) compared to CT (all $p < 0.0001$; figure 06). No differences were observed in Prkaa1 mRNA levels. Prkaa2 muscle mRNA levels were lower in +Fe, Tuc and Tuc+Fe compared to CT ($p = 0.002, 0.024$ and 0.001 , respectively).

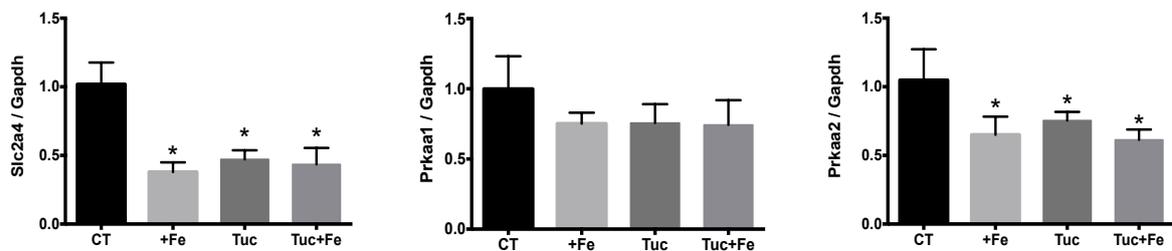


Figure 06: The mRNA levels of Slc2a4 (GLUT4), Prkaa1 (AMPK- α 1) and Prkaa2 (AMPK- α 2) in the muscle of rats treated with control diet (CT), iron-enriched diet (+Fe), tucum-do-cerrado diet (Tuc) and association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe), for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). * Statistical difference compared to CT group, # compared to +Fe group and \$ compared to Tuc group ($p < 0.05$).

In relation to the glycolytic enzymes activities, no statistical differences were obtained between groups for muscle hexokinase (HK) and phosphofructokinase (PFK1) activity (figure 07).

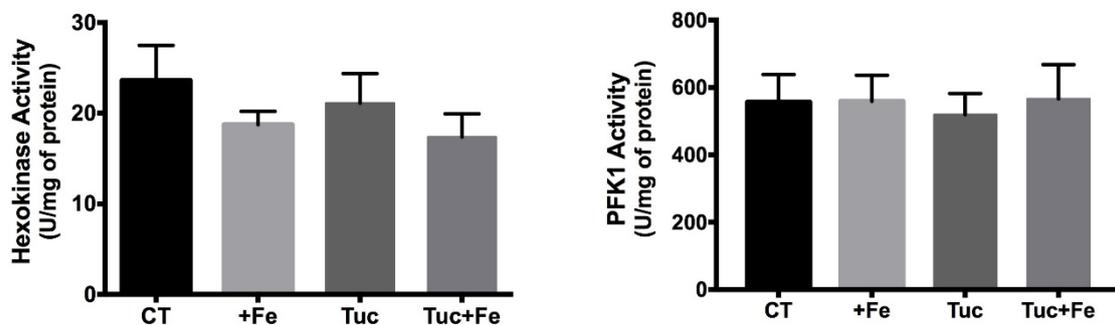


Figure 07: Hexokinase (HK) and phosphofructokinase (PFK1) specific activity in muscle in muscle of rats treated with control diet (CT), tucum-do-cerrado diet (Tuc), iron-enriched diet (+Fe) and association of tucum-do-cerrado with iron-enriched diet (Tuc+Fe), for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$).

6.4 DISCUSSION

Iron-excess is tightly associated to ROS generation, mitochondrial dysfunction and major disturbance in carbohydrate metabolism [10,12]. As expected the consumption of iron-enriched diet (+Fe; 350 mg/kg) promoted tissues and serum iron increment (Figure Supplementary 1 and Table Supplementary 1), which results in an increase in oxidative damage to hepatic proteins (data from other experiments conducted in these rats; ^[27]) and to muscle protein and lipids compared with control.

Contrary to some studies [44,45], in the present study, the consumption of the iron-enriched diet (350 Fe mg/kg) did not alter glucose homeostasis, since blood glucose, insulin and muscle and liver glycogen concentration were similar to the control. These contradictory findings may be attributed to the different levels of iron administrated, as well as the different routes of administration. Choi *et al.* (2013) [44] and Dongiovanni *et al.* (2013) [45] in their study models administrated 2% and 3% of carbonyl iron, expressively high amounts compared to the standard diets employed (0.02% and 8 mg/kg, respectively), as well as to the level used in our study (+Fe = 350 mg/kg, Control = 35 mg/kg). The detrimental effect of iron excess in glycemic homeostasis seems to be present in models associated to obesity such as in treatments with high fat diet. Taken together these results suggest that the changes in the antioxidant/oxidant response promoted by the level of iron supplementation administrated in the present study is not sufficient to disturb glycemic and insulinemic responses in normal rats.

Several studies indicate that polyphenols as well as fruits rich in polyphenols (apple, berries, grape) are inversely associated with lower risk of TD2. Polyphenols seem to modulate glucose metabolism by different mechanisms of action, impairing glucose digestion and absorption, improving tissue glucose uptake and decreasing glucose release from liver [46]. The enzymes α -amylase and α -glucosidase and the glucose transporters (SGLT1, GLUT2, and GLUT4) play essential roles in the absorption and fluxes of glucose in the body [47]. In the present study, tucum-do-cerrado consumption appeared to improve both glucose absorption and hepatic glucose uptake, since the mRNA levels of intestinal Slc5a1 (SGLT1) and hepatic Scl2a2 (GLUT2) in the Tuc group were higher than control. Although GLUT2 transports glucose through the liver plasma membrane in a bidirectional way [48], in the present study the increase of hepatic Scl2a2 mRNA levels may indicate an increase in glucose uptake by the liver rather than exportation, as gluconeogenic enzyme activity of glucose-6-phosphatase (G6Pase) was significantly inhibited in the liver of Tuc group compared to control, suggesting that intracellular glucose levels were sufficient. However, unlike observed in G6Pase activity no

difference was obtained in the hepatic activity of the gluconeogenic enzyme, PEPCK, between Tuc and Control group. The similar blood glucose level between the Tuc group and control corroborates this hypothesis. Unexpectedly, glycogen concentration and glucokinase activity (GK) in the Tuc group remained similar to the control.

Similar to our result, Gezgin-Oktayoglu *et al.* (2014) [49] observed that the administration of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) extract to hyperglycemic rats significantly increased GLUT2 synthesis in the hepatocytes, decreasing fasting blood glucose levels and improving hepatic glycogen content. The treatment of type II diabetic rats with a polyphenolic extract of *Cassia auriculata* flowers promoted an increase in the mRNA levels of hepatic GLUT2 in relation to T2D control [50].

The effect of iron excess on glucose homeostasis is widely studied in hepatic and muscle tissues [12,44,45]. As far as we know, no study had associated iron excess with intestinal expression of glucose transporters SGLT1 and GLUT2. In the present study, the iron-enriched diet (+Fe) downregulated *Slc2a2* mRNA levels (GLUT2) in the intestine compared to control, but this response was lost when tucum-do-cerrado was associated with the iron-enriched diet, since Tuc+Fe group had higher *Slc2a2* mRNA levels than +Fe and similar to the control. In rats with iron-deficiency anemia, there was a significant decrease in the transepithelial transport of glucose; however, no difference was observed in GLUT2 mRNA levels in all segments of the small intestine [51]. Considering that GLUT2 mediates the efflux of glucose from the enterocytes into blood; our results suggest a possible inhibitory effect of iron excess on the intestinal glucose efflux, though further analyses of GLUT2 protein levels are necessary.

The effect of polyphenols on intestinal glucose transporters SGLT-1 and GLUT-2 is controversial [52–55]. Chronic treatment of Caco-2 cells with a berry extract rich in anthocyanins promoted an inhibition of glucose uptake, and decreased the mRNA levels of GLUT-2 and SGLT-1 and the protein levels of GLUT-2 [54]. On the other hand, Caco-2 cells treated with bitter-masking flavanone homoeriodictyol, present in *Yerba Santa*, increased glucose uptake, while hesperitin, which differs only in the position of the -OH and -OCH₃ residues on the B-ring, promoted a decrease of glucose uptake [56]. These contradictory effects of polyphenols on intestinal glucose fluxes might be related to differences in the structure of these compounds, as well as their mechanisms of action. Polyphenol glucosides seem to modulate sodium-depend transport and their aglycones facilitate transport, while the mechanism of action involves both physical interaction and genomic modulation [54]. Therefore, the phytochemicals of tucum-do-cerrado modulate the expression of intestinal

Slc5a1 transporter but not Slc2a2. Considering that after 12 weeks of treatment blood glucose and glycogen levels in the liver and muscle was not altered, it is possible that tucum-do-cerrado consumption did not alter the level of protein SGLT-1 in the plasma membrane of enterocytes.

Considering that AMPK is a cellular energy sensor [11], we investigated the effect of iron supplementation and tucum-do-cerrado consumption on the gene expression of AMPK α 1 and AMPK α 2 subunits in liver and muscle. In agreement with the literature [10,23], consumption of tucum-do-cerrado promoted an increase in Prkaa1 and Prkaa2 mRNA levels in the liver. Kurimoto *et al.* (2013) [56] showed that the black soybean (*Glycine max* L.), which is rich in anthocyanins and procyanidins, reduced blood glucose levels in type 2 diabetic mice, and significantly activated AMPK by inducing its phosphorylation in the liver and muscle. Muscle AMPK activation resulted in higher GLUT-4 exposure in the plasma membrane, and subsequent glucose uptake in an insulin-independent manner, and inhibited hepatic gluconeogenesis, since mRNA levels of G6Pase were significantly reduced in the liver. Although we evaluated only Prkaa1 and Prkaa2 mRNA levels, our results suggest that tucum-do-cerrado was able to induce the AMPK pathway due to the inhibition of the gluconeogenic enzyme activity, G6Pase, since AMPK activation inhibits gluconeogenesis [11]. Similar responses were shown even in the presence of iron supplementation (Tuc+Fe).

Although most studies have shown that iron excess induces gluconeogenic enzymes (G6Pase and PEPCK) and inhibits glycolytic enzymes (GK and PFK1) in the liver [10,44], we showed that the consumption of the iron-enriched diet for 12 weeks promoted a significant decrease in hepatic G6Pase and PEPCK specific activity and an increase in GK and PFK-1 activity. Therefore, contrary to our initial hypothesis, these results suggest that iron supplementation inhibits gluconeogenesis and stimulates glycolysis in the liver, promoting a positive metabolic response. Similar to our results, Huang *et al.* (2013) [12] showed that treatment of mice with a high iron diet (20 g carbonyl iron/kg diet) for 2 months activates AMPK by phosphorylation, which suppresses G6Pase mRNA levels in liver. The authors also demonstrated that AMPK phosphorylation was improved by an increase of AMP/ATP rate in both liver and muscle. According to the authors, although most of the studies use the same dose of iron supplementation (20 g/kg diet), these contradictory results might be related to the use of elemental iron for supplementation instead of iron salts, and to the association of iron excess treatment with obesity or high fat diets, conditions already associated with insulin resistance.

Contrary to what was shown in the liver, iron supplementation (+Fe) and tucum-do-cerrado consumption (Tuc), as well as their co-ingestion (Tuc+Fe), promoted a reduction in

Slc2a4 mRNA levels in the muscle. Although we did not evaluate GLUT4 protein concentration and its presence in plasma membrane, our results suggest that the level of iron supplemented and the consumption of tucum-do-cerrado may diminished glucose uptake in muscle, and this response may be associated with the downregulation of Prkaa2 mRNA levels.

In summary, our results suggest that tucum-do-cerrado consumption might induce Prkaa1 α and Prkaa2 α expression, which may inhibit gluconeogenic rate limiting enzyme, G6Pase and upregulates GLUT2 hepatic glucose uptake. In addition, moderate iron supplementation improves intracellular hepatic glucose response, stimulating the glycolytic rate limiting enzymes GK and PFK1 while inhibiting gluconeogenic enzyme G6Pase.

6.5 REFERENCES

ABELES, R. H. Contributors BT - Methods of Enzymatic Analysis (Second English Edition). In: [s.l.] Academic Press, 1974. p. XVII–XXXIII.

ALZAID, F.; CHEUNG, H.-M.; PREEDY, V.; SHARP, P. Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78932, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3827299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ARRUDA, L. F.; ARRUDA, S. F.; CAMPOS, N. A.; DE VALENCIA, F. F.; SIQUEIRA, E. M. de A. Dietary Iron Concentration May Influence Aging Process by Altering Oxidative Stress in Tissues of Adult Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

BJØRKLUND, G.; CHIRUMBOLO, S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. **Nutrition**, v. 33, p. 311–321, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.07.018>>.

CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 4, p. 708–713, 2008.

CASTRO-ACOSTA, M. L.; STONE, S. G.; MOK, J. E.; MHAJAN, R. K.; FU, C. I.; LENIHAN-GEELS, G. N.; CORPE, C. P.; HALL, W. L. Apple and blackcurrant polyphenol-rich drinks decrease postprandial glucose, insulin and incretin response to a high-carbohydrate meal in healthy men and women. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 49, p. 53–62, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.013>>.

CHOI, J. S.; KOH, I.-U.; LEE, H. J.; KIM, W. H.; SONG, J. Effects of Excess Dietary Iron and Fat on Glucose and Lipid Metabolism. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1634–1644, set. 2013.

COELHO, W. S.; COSTA, K. C.; SOLA-PENNA, M. Serotonin Stimulates Mouse Skeletal Muscle 6-Phosphofructo-1-Kinase through Tyrosine-Phosphorylation of the Enzyme Altering Its Intracellular Localization. **Molecular genetics and metabolism**, v. 92, n. 4, p. 364–370, dez. 2007.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTÍN, M. ángeles; ESCRIVÁ, F.; ÁLVAREZ, C.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 704–712, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.01.009>>.

DA CUNHA, M.; ARRUDA, S. Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) May Promote Anti-Aging Effect by Upregulating SIRT1-Nrf2 Pathway and Attenuating Oxidative Stress and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1243, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/9/11/1243>>.

DA CUNHA, M. S. B.; SIQUEIRA, E. M. A.; TRINDADE, L. S.; ARRUDA, S. F. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1035–1044, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.005>>.

DE SIQUEIRA, E. M. A.; ROSA, F. R.; FUSTINONI, A. M.; DE SANT'ANA, L. P.; ARRUDA, S. F. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 2–8, 2013.

DONGIOVANNI, P.; RUSCICA, M.; RAMETTA, R.; RECALCATI, S.; STEFFANI, L.; GATTI, S.; GIRELLI, D.; CAIRO, G.; MAGNI, P.; FARGION, S.; VALENTI, L. Dietary Iron Overload Induces Visceral Adipose Tissue Insulin Resistance. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 6, p. 2254–2263, jun. 2013.

GEZGINCI-OKTAYOGLU, S.; SACAN, O.; BOLKENT, S.; IPCI, Y.; KABASAKAL, L.; SENER, G.; YANARDAG, R. Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. Cicla) Extract Ameliorates Hyperglycemia by Increasing GLUT2 through Akt2 and Antioxidant Defense in the Liver of Rats. **Acta histochemica**, v. 116, n. 1, p. 32–39, jan. 2014.

GOPAL, S. S.; LAKSHMI, M. J.; SHARAVANA, G.; SATHAIAH, G.; SREERAMA, Y. N.; BASKARAN, V. Lactucaxanthin - a Potential Anti-Diabetic Carotenoid from Lettuce (*Lactuca Sativa*) Inhibits Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Activity in Vitro and in Diabetic Rats. **Food & function**, v. 8, n. 3, p. 1124–1131, mar. 2017.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). **Methods in enzymology**, v. 77, p. 218–231, 1981.

HARDIE, D. G. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 4, 2011.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.

HAYANGA, J. A.; NGUBANE, S. P.; MURUNGA, A. N.; OWIRA, P. M. O. Grapefruit Juice Improves Glucose Intolerance in Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing Hepatic Gluconeogenesis. **European journal of nutrition**, v. 55, n. 2, p. 631–638, mar. 2016.

HENI, M.; HERZBERG-SCHÄFER, S.; MACHICAO, F.; HARING, H. U.; FRITSCHKE, A.

Dietary fiber intake modulates the association between variants in TCF7L2 and weight loss during a lifestyle intervention. **Diabetes Care**, v. 35, n. 3, p. 7903146, 2012.

HUANG, J.; SIMCOX, J.; MITCHELL, T. C.; JONES, D.; COX, J.; LUO, B.; COOKSEY, R. C.; BOROS, L. G.; MCCLAIN, D. A. Iron regulates glucose homeostasis in liver and muscle via AMP-activated protein kinase in mice. **FASEB Journal**, v. 27, n. 7, p. 2845–2854, 2013.

JOANISSE, D. R.; STOREY, K. B. Oxidative Damage and Antioxidants in *Rana Sylvatica*, the Freeze-Tolerant Wood Frog. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. R545-53, set. 1996.

JOHNSTON, K.; SHARP, P.; CLIFFORD, M.; MORGAN, L. Dietary Polyphenols Decrease Glucose Uptake by Human Intestinal Caco-2 Cells. **FEBS letters**, v. 579, n. 7, p. 1653–1657, mar. 2005.

KELLETT, G. L. The Facilitated Component of Intestinal Glucose Absorption. **The Journal of physiology**, v. 531, n. Pt 3, p. 585–595, mar. 2001.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, jan. 2016.

KURIMOTO, Y.; SHIBAYAMA, Y.; INOUE, S.; SOGA, M.; TAKIKAWA, M.; ITO, C.; NANBA, F.; YOSHIDA, T.; YAMASHITA, Y.; ASHIDA, H.; TSUDA, T. Black Soybean Seed Coat Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via the Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5558–5564, jun. 2013.

LEE, H. J.; CHOI, J. S.; LEE, H. J.; KIM, W. H.; PARK, S. I.; SONG, J. Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1414–1423, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.008>>.

LEEM, K. H.; KIM, M. G.; HAHM, Y. T.; KIM, H. K. Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* is due to enhanced peripheral glucose uptake through activation of AMPK/p38 MAPK pathway. **Nutrients**, v. 8, n. 12, 2016.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M.; STOLARCZYK, E.; TOBIN, V. The Role of GLUT2 in Dietary Sugar Handling. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 529–537, dez. 2005.

LI, J.; CAO, Y. Serum ferritin as a biomarker for diabetes and insulin resistance: a further study. **Acta Diabetologica**, v. 52, n. 2, p. 417–419, 2015.

LIEDER, B.; HOI, J. K.; HOLIK, A.-K.; GEISSLER, K.; HANS, J.; FRIEDL, B.; LISZT, K.;

KRAMMER, G. E.; LEY, J. P.; SOMOZA, V. The Flavanone Homoeriodictyol Increases SGLT-1-Mediated Glucose Uptake but Decreases Serotonin Release in Differentiated Caco-2 Cells. **PLoS one**, v. 12, n. 2, p. e0171580, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of Glycogen in Small Tissue Samples. **Journal of applied physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–236, fev. 1970.

MAHER, M. A.; BANZ, W. J.; TRUETT, G. E.; ZEMEL, M. B. Dietary Fat and Sex Modify Heterozygote Effects of the Rat Fatty (Fa) Allele. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 10, p. 2487–2493, out. 1996.

MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and Phenolic Acids from Strawberry and Apple Decrease Glucose Uptake and Transport by Human Intestinal Caco-2 Cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 12, p. 1773–1780, dez. 2010.

MCCORD, J. M. Analysis of Superoxide Dismutase Activity. **Current protocols in toxicology**, v. Chapter 7, p. Unit7.3, maio 2001.

MERRILL, J. F.; THOMSON, D. M.; HARDMAN, S. E.; HEPWORTH, S. D.; WILLIE, S.; HANCOCK, C. R. Iron deficiency causes a shift in AMP-activated protein kinase (AMPK) subunit composition in rat skeletal muscle. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 104, 2012. Disponível em: <<http://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-9-104>>.

MOHD FAUZI, F.; JOHN, C. M.; KARUNANIDHI, A.; MUSSA, H. Y.; RAMASAMY, R.; ADAM, A.; BENDER, A. Understanding the Mode-of-Action of Cassia Auriculata via in Silico and in Vivo Studies towards Validating It as a Long Term Therapy for Type II Diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 197, p. 61–72, fev. 2017.

MONTONEN, J.; BOEING, H.; STEFFEN, A.; LEHMANN, R.; FRITSCHKE, A.; JOOST, H.-G.; SCHULZE, M. B.; PISCHON, T. Body Iron Stores and Risk of Type 2 Diabetes: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2613–2621, out. 2012.

MOSA, R. A.; CELE, N. D.; MABHIDA, S. E.; SHABALALA, S. C.; PENDUKA, D.; OPOKU, A. R. In Vivo Antihyperglycemic Activity of a Lanosteryl Triterpene from *Protorhus Longifolia*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 7, p. 13374–13383, jul. 2015.

PECHLANER, R.; WEISS, G.; BANSAL, S.; MAYR, M.; SANTER, P.; PALLHUBER, B.; NOTDURFTER, M.; BONORA, E.; WILLEIT, J.; KIECHL, S. Inadequate Hepcidin Serum

Concentrations Predict Incident Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, n. 30, p. 13–23, fev. 2014. Disponível em: <<http://libweb.anglia.ac.uk/>>.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75–100, 2009.

RAJPATHAK, S.; MA, J.; MANSON, J.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Iron Intake and the Risk of Type 2 Diabetes in Women: A Prospective Cohort Study. **Diabetes care**, v. 29, n. 6, p. 1370–1376, jun. 2006.

REEVES; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RICHERT, S.; WEHR, N. B.; STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Assessment of Skin Carbonyl Content as a Noninvasive Measure of Biological Age. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 397, n. 2, p. 430–432, jan. 2002.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, dez. 2001.

SANTHAKUMAR, A. B.; BULMER, A. C.; SINGH, I. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, n. 1, p. 1–21, 2014.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–80, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4398902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

THORENS, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 58, n. 2, p. 221–232, 2014.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; BARRETT, M. L. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, p. 45, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VLAVCHESKI, F.; NAIMI, M.; MURPHY, B.; HUDLICKY, T.; TSIANI, E. Rosmarinic Acid, a Rosemary Extract Polyphenol, Increases Skeletal Muscle Cell Glucose Uptake and Activates AMPK. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1669, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1669>>.

WANG, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHEN, L.; MO, H.; SHASTRI, A.; SU, R.; BAPAT, P.; KWUN, I. S.; SHEN, C. L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>>.

WAYHS, M. L. C.; DE MORAIS, M. B.; MACHADO, U. F.; NASSAR, S. M.; NETO, U. F.; AMANCIO, O. M. S. Transepithelial Transport of Glucose and mRNA of Glucose Transporters in the Small Intestine of Rats with Iron-Deficiency Anemia. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 27, n. 1, p. 111–115, jan. 2011.

YAMANE, T.; KOZUKA, M.; KONDA, D.; NAKANO, Y.; NAKAGAKI, T.; OHKUBO, I.; ARIGA, H. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 31, p. 106–112, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.02.004>>.

ZHANG, A. J.; RIMANDO, A. M.; MIZUNO, C. S.; MATHEWS, S. T. α -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.05.008>>.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - DISSERTAÇÃO

ADISAKWATTANA, Sirichai et al. In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 110, 2012.

AL-ASRI, Jamil et al. From carbohydrates to drug-like fragments: Rational development of novel α -amylase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 20, p. 6725-6732, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes, 2015. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/>>. Acessado em 02 de fevereiro de 2016.

ARRUDA, Lorena Fernandes et al. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61058, 2013.

ASHCROFT, Frances M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2047, 2005.

ASLANI, B. A.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sci**, Jan 11 2016.

BARCLAY, A. W. et al. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk--a meta-analysis of observational studies. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 3, p. 627-37, Mar 2008.

BERDOUKAS, V.; COATES, T. D.; CABANTCHIK, Z. I. Iron and oxidative stress in cardiomyopathy in thalassemia. **Free Radic Biol Med**, v. 88, n. Pt A, p. 3-9, Nov 2015.

BERG JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 16.2, The Glycolytic Pathway Is Tightly Controlled.

BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomed Pharmacother**, v. 74, p. 101-10, Aug 2015.

BOGDAN, A. R. et al. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 3, p. 274-86, Mar 2016.

BOKARE, A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. **J Hazard Mater**, v. 275, p. 121-35, Jun 30 2014.

BOKARE, A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. **J Hazard Mater**, v. 275, p. 121-35, Jun 30 2014.

BONOMO LDE, F. et al. Iron overload potentiates diet-induced hypercholesterolemia and reduces liver PPAR- α expression in hamsters. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 26, n. 6, p. 224-9, Jun 2012.

BRAR, Sonia et al. Iron accumulation in the substantia nigra of patients with Alzheimer disease and parkinsonism. **Archives of neurology**, v. 66, n. 3, p. 371-374, 2009.

BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica., 2008. 210 p.

CASTELLANI, Rudy J. et al. The role of iron as a mediator of oxidative stress in Alzheimer disease. **Biofactors**, v. 38, n. 2, p. 133-138, 2012.

CHOI, J. S. et al. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 9, p. 1634-44, Sep 2013.

DALVI, Luana Taquette. Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido elágico in vitro e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e deficiente em superóxido dismutase 1. 2014. xiii, 100 f., il. Tese (Doutorado em Nutrição Humana)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic Res**, v. 46, n. 4, p. 382-419, Apr 2012.

DONGIOVANNI, P. et al. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. **Am J Pathol**, v. 182, n. 6, p. 2254-63, Jun 2013.

FENTON, H. J. H.; JONES, H. O. VII.-The oxidation of organic acids in presence of ferrous iron. Part I. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 77, n. 0, p. 69-76, 1899.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 9 2000.

FIorentino, T. V. et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 32, p. 5695-703, 2013.

FUSTINONI-REIS, Adriana M. et al. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 38, 2016.

GANDHI, Gopalsamy Rajiv et al. Polyphenols-rich *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. beans show hypoglycemic and β -cells protective effects in type 2 diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 358-365, 2014.

GANZ, T.; NEMETH, E. Heparin and iron homeostasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1434-43, Sep 2012.

GAO, M. et al. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. **Mol Cell**, v. 59, n. 2, p. 298-308, Jul 16 2015.

GOZZELINO, R.; AROSIO, P. Iron Homeostasis in Health and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 1, 2016.

GUAL, Philippe; LE MARCHAND-BRUSTEL, Yannick; TANTI, Jean-François. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99-109, 2005.

GUEVARA, C. et al. Global protein oxidation profiling suggests efficient mitochondrial proteome homeostasis during ageing. **Mol Cell Proteomics**, Feb 16 2016

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Arch Toxicol**, v. 86, n. 3, p. 345-91, Mar 2012.

GUO, Shaodong. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1-T23, 2014.

GUPTA, R. K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 11, p. 4405-9, 2014.

HARDIE, D. Grahame; ROSS, Fiona A.; HAWLEY, Simon A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 251-262, 2012.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul 1956.

HENKLER, F.; BRINKMANN, J.; LUCH, A. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. **Cancers (Basel)**, v. 2, n. 2, p. 376-96, 2010.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: Functional Metabolism: Regulation and adaptation. Cap. 12, pp.319-368, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004.

HUANG, J. et al. Iron overload and diabetes risk: a shift from glucose to Fatty Acid oxidation and increased hepatic glucose production in a mouse model of hereditary hemochromatosis. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 80-7, Jan 2011.

INDO, H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, n. 1, p. 1-7, Jan 2015.

JOSHI, Shashank R. et al. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 13, p. 1959-1981, 2015.

KATZ, A. et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 7, p. 2402-10, Jul 2000.

KAUPPILA, J. H.; STEWART, J. B. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. **Biochim Biophys Acta**, v. 1847, n. 11, p. 1354-61, Nov 2015.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 4, p. 325-40, Dec 2015.

KODYDKOVA, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biol (Praha)**, v. 60, n. 4, p. 153-67, 2014.

KUHRE, Rune Ehrenreich et al. Glucose stimulates neurotensin secretion from the rat small intestine by mechanisms involving SGLT1 and GLUT2, leading to cell depolarization and calcium influx. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 12, p. E1123-E1130, 2015.

KUMARATHASAN, P. et al. Nitrate stress, oxidative stress and plasma endothelin levels after inhalation of particulate matter and ozone. **Part Fibre Toxicol**, v. 12, p. 28, 2015.

KWON, B. et al. Nano-Fenton Reactors as a New Class of Oxidative Stress Amplifying Anticancer Therapeutic Agents. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 8, n. 9, p. 5887-97, Mar 9 2016.

LEE, H. J. et al. Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 12, p. 1414-23, Dec 2015.

LEE, Y. M. et al. Bioactives in Commonly Consumed Cereal Grains: Implications for Oxidative Stress and Inflammation. **J Med Food**, v. 18, n. 11, p. 1179-86, Nov 2015.

LIGHTHART, S. et al. Lifetime risk of developing impaired glucose metabolism and eventual progression from prediabetes to type 2 diabetes: a prospective cohort study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, n. 1, p. 44-51, Jan 2016.

LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science**, v. 78, p. A18-A25, Jun 2013.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol**, v. 28, n. 2, p. 234-6, Feb 1970.

LUNT, Sophia Y.; VANDER HEIDEN, Matthew G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 27, p. 441-464, 2011.

MA, R. C.; LIN, X.; JIA, W. Causes of type 2 diabetes in China. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 12, p. 980-91, Dec 2014.

MANGANARIS, George A. et al. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 825-833, 2014.

MANHEIMER, E. W. et al. Paleolithic nutrition for metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, v. 102, n. 4, p. 922-32, Oct 2015.

MARGINA, D. et al. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from and. **Exp Ther Med**, v. 10, n. 5, p. 1681-1688, Nov 2015.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 378-400, 2015.

MARTIN-GALLAN, P. et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 12, p. 1563-74, Jun 15 2003.

MARTINI, L. A.; CATANIA, A. S.; FERREIRA, S. R. Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus. **Nutr Rev**, v. 68, n. 6, p. 341-54, Jun 2010.

MATHER, K. Surrogate measures of insulin resistance: of rats, mice, and men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 2, p. E398-9, Feb 2009.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-9, Jul 1985..

MICHEL, Camilia George; NESSEEM, Demiana Ibrahim; ISMAIL, Manal Fouad. Anti-diabetic activity and stability study of the formulated leaf extract of *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd with the influence of seasonal variation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 53-62, 2011.

MILNEROWICZ, H.; KOWALSKA, K.; SOCHA, E. Paraoxonase activity as a marker of exposure to xenobiotics in tobacco smoke. **Int J Toxicol**, v. 34, n. 3, p. 224-32, May-Jun 2015.

NARAYAN, K. M. et al. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. **JAMA**, v. 290, n. 14, p. 1884-90, Oct 8 2003.

OH, Kyoung-Jin et al. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. **BMB Rep**, v. 46, n. 12, p. 567-74, 2013.

OKAR, David A. et al. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. 1, p. 30-35, 2001.

OPINTO, Giuseppina; NATALICCHIO, Annalisa; MARCHETTI, Piero. Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 119, n. 4, p. 170-178, 2013.

PANENI, F.; COSTANTINO, S.; COSENTINO, F. Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. **World J Diabetes**, v. 6, n. 2, p. 326-32, Mar 15 2015.

PELUSI, C. et al. Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis. **Journal of endocrinological investigation**, p. 1-11, 2016.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 605-20, Jul 2014.

PIETRANGELO, A. Iron and the liver. **Liver Int**, v. 36 Suppl 1, p. 116-23, Jan 2016.

PINGITORE, A. et al. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 916-22, Jul-Aug 2015.

QUAN, W.; JO, E. K.; LEE, M. S. Role of pancreatic beta-cell death and inflammation in diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v. 15 Suppl 3, p. 141-51, Sep 2013.

RICHERT, Susann et al. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 397, n. 2, p. 430-432, 2002.

RÖDER, Pia V. et al. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89977, 2014.

RUHALA, P.; NEMETH, E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 3, p. 155-61, Mar 2014.

SCHULZE, M. B. et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. **JAMA**, v. 292, n. 8, p. 927-34, Aug 25 2004.

SEGHROUCHNI, I. et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clin Chim Acta**, v. 321, n. 1-2, p. 89-96, Jul 2002

SILVA, M. et al. Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. **Nutr Res**, v. 28, n. 6, p. 391-8, Jun 2008.

SIQUEIRA, E. M. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.

SLIMEN, I. B. et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **Int J Hyperthermia**, v. 30, n. 7, p. 513-23, Nov 2014.

STELMAŃSKA, E. [The important role of GLUT2 in intestinal sugar transport and absorption]. **Postepy biochemii**, v. 55, n. 4, p. 385-387, 2008.

SUBASH, Selvaraju et al. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 16, p. 1557, 2014.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456-80, Apr 15 2015.

TESFAY, Lia et al. Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. **Cancer research**, v. 75, n. 11, p. 2254-2263, 2015.

TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 342-355, May 2013.

TUOMILEHTO, J.; BAHIJRI, S. Epidemiology: Lifetime risk of diabetes mellitus - how high? **Nat Rev Endocrinol**, Jan 4 2016.

UDANI, Jay K. et al. Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

VAN DE LAAR, Floris A. et al. α -Glucosidase Inhibitors for Patients With Type 2 Diabetes Results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. **Diabetes care**, v. 28, n. 1, p. 154-163, 2005.

VARVAROVSKA, J. et al. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. **J Diabetes Complications**, v. 17, n. 1, p. 7-10, Jan-Feb 2003.

VECCHI, C. et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. **Science**, v. 325, n. 5942, p. 877-80, Aug 14 2009.

VECCHI, C. et al. Gluconeogenic signals regulate iron homeostasis via hepcidin in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 4, p. 1060-9, Apr 2014.

VILLEGAS, R. et al. Fish, shellfish, and long-chain n-3 fatty acid consumption and risk of incident type 2 diabetes in middle-aged Chinese men and women. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 2, p. 543-51, Aug 2011.

WANG, Dan et al. Age-related iron deposition in the basal ganglia of controls and Alzheimer disease patients quantified using susceptibility weighted imaging. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 59, n. 2, p. 439-449, 2014.

WANG, S. et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 1, p. 1-18, Jan 2014.

WOLPAW, A. J. et al. Modulatory profiling identifies mechanisms of small molecule-induced cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 39, p. E771-80, Sep 27 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes factsheet, number 312, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

XIE, Y. et al. Ferroptosis: process and function. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 3, p. 369-79, Mar 2016.

XU, Jia; JI, Jian; YAN, Xiang-Hua. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 5, p. 373-381, 2012.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 3, p. 165-76, Mar 2016.

ZHUANG, T.; HAN, H.; YANG, Z. Iron, oxidative stress and gestational diabetes. **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3968-80, Sep 2014.