



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE NITRATO  
INORGÂNICO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA  
EM MODELO DE OBESIDADE ANIMAL**

**Aluno: Larissa Pereira Caetano**

**Orientador: Profº. Dr. Foued Salmen Espíndola**

**Co-Orientador: Profª. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho**

**UBERLÂNDIA - MG**  
**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE NITRATO  
INORGÂNICO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA  
EM MODELO DE OBESIDADE ANIMAL**

**Aluna:** Larissa Pereira Caetano

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Foued Salmen Espíndola

**Co-Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área: Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG**  
**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C128e  
2017 Caetano, Larissa Pereira, 1991  
O efeito da suplementação crônica de nitrato inorgânico  
concomitante a uma dieta hiperlipídica em modelo de obesidade animal  
/ Larissa Pereira Caetano. - 2017.  
69 p. : il.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Coorientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.759>

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Stress oxidativo -  
Teses. 4. Nitratos - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Botelho,  
Françoise Vasconcelos. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE NITRATO  
INORGÂNICO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA  
EM MODELO DE OBESIDADE ANIMAL**

**ALUNA:** Larissa Pereira Caetano

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Profº Dr. Foued Salmen Espíndola (Orientador)

**Examinadores:**

---

---

---

---

**Data da Defesa:** 31/07/2017

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Profº. Dr. Foued Salmen Espíndola

*“Somos livres para decidir os nossos atos, muito embora  
nos tornemos escravos de suas consequências.”*

## AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos primeiramente à Deus, pai de infinita bondade, que me concedeu o dom da vida terrestre, guiando-me sempre em minhas caminhadas.

À minha amada família, não consigo mensurar a importância de vocês na minha vida. Sempre apoiando as minhas decisões, sempre acreditando na minha capacidade, sempre me aconselhando a seguir em frente. Mamãe, papai, vovó Izaira, Thais, Thalita, Tarcísio, Marco Aurélio, Marco Túlio e a todos os Nunes: muito obrigada pela confiança.

À minha segunda família, àquela que construí com os laços fraternos da amizade: o labibi (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular). Durante esses dois anos de mestrado estive muito tempo compartilhando experiências, conhecimento, muitas risadas e até mesmo frustrações com os membros do laboratório. Cada um me ensinando a ser uma pessoa melhor, me mostrando o tanto que o trabalho em equipe é engrandecedor. Cada um me estendendo uma mão amiga, uma palavra de consolo. Vocês são feras! Um agradecimento especial aos meus amigos Adriele e Douglas, por terem participado ativamente deste trabalho e por estarem sempre de prontidão para ouvir as minhas murmúrias e me trazerem um pouco de paz.

Aos demais irmãos que a vida me deu: Homero e Maria Cecília. Vocês estiveram comigo desde o início do projeto, sempre solícitos e atenciosos. Agradeço ainda todos os conselhos e encontros maravilhosos que tivemos.

Aos meus professores orientadores, Dr. Foued Salmen Espíndola e Dra. Françoise Vasconcelos Botelho por terem aberto às portas do laboratório para mim. Obrigada por permitirem que eu fizesse parte desse grupo. Obrigada pela troca de experiências, pela confiança e por fazerem parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Núcleo de Pesquisas em Eletroanalítica (NuPe) do Instituto de Química da UFU, em particular aos professores Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz e Eduardo Matias Richter pela parceria com o nosso trabalho e os discentes Ana Paula de

Lima e Thiago Tormin que me auxiliaram durante todas as análises, sempre com muito carinho, afincos e determinação.

Aos membros do Laboratório de Biologia Vascular da Universidade Federal de Minas Gerais por todo o carinho e experiências compartilhadas.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, pelo espaço físico, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, especialmente à coordenação e à secretaria pela atenção e instrução e a todos os professores pelo exemplo e inspiração.

À banca examinadora, pelo aceite em participar da comissão dessa dissertação. Com toda certeza, vocês enriquecerão este trabalho.

Aos órgãos de fomento que financiaram o projeto de pesquisa, todo o aparato necessário para a concretização desse estudo e pela concessão da minha bolsa de mestrado (CNPq, FAPEMIG e CAPES).

Aos amigos de longa data, aos amigos da faculdade e a todos àqueles que se interessaram pela leitura deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBESIDADE E INFLAMAÇÃO.....	1
1.1.1. Tecidos adiposos.....	1
1.1.1.1. Tecido adiposo branco.....	2
1.1.1.2. Tecido adiposo marrom.....	3
1.1.1.3. Tecido adiposo bege.....	3
1.1.2. Adiposidade e inflamação.....	4
1.2. OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	5
1.3. OBESIDADE E NITRATO INORGÂNICO.....	6
1.3.1. Fisiologia do nitrato.....	7
1.3.1.1. <i>Geração de NO• independente de NOS</i> .....	8
1.3.1.2. <i>Circulação entero-salivar do nitrato</i> .....	9
1.3.1.3. <i>Papel mecanicista do óxido nítrico</i> .....	10
1.4. NITRATO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais, delineamento experimental e dietas.....	14
3.2. Evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico.....	16
3.3. Amostra de sangue e tecidos.....	16
3.4. Avaliação do perfil lipídico plasmático.....	17
3.4.1. Determinação da concentração de triglicerídeos.....	17
3.4.2. Determinação da concentração de colesterol total.....	18
3.4.3. Determinação da concentração do colesterol-HDL.....	19
3.4.4. Determinação da concentração do colesterol não-HDL.....	20
3.5. Avaliação da homeostase da glicose.....	20
3.5.1. Determinação da glicemia de jejum.....	20
3.5.2. Teste oral de tolerância à glicose.....	20
3.6. Extração e determinação de lipídeos fecais e hepáticos.....	21



3.7.	Quantificação de proteínas totais.....	21
3.8.	Avaliações do estresse oxidativo.....	22
3.8.1.	<i>FRAP (Capacidade antioxidante total)</i> .....	22
3.8.2.	<i>Sulfidrilas totais</i> .....	23
3.8.3.	<i>Glutathiona reduzida</i> .....	23
3.8.4.	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	24
3.8.5.	<i>Catalase (CAT)</i> .....	24
3.8.6.	<i>TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)</i> .....	25
3.8.7.	<i>Proteína carbonilada</i> .....	25
3.9.	Análises histológicas e morfométricas.....	26
3.10.	Avaliação de citocinas inflamatórias.....	26
3.11.	Análise estatística.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1.	Evolução ponderal e adiposidade.....	28
4.2.	Consumo alimentar.....	29
4.3.	Consumo hídrico.....	30
4.4.	Avaliação dos parâmetros de bioquímica sanguínea.....	31
4.4.1.	<i>Triglicerídeos, colesterol total e frações de lipoproteínas</i> .....	31
4.4.2.	<i>Homeostase de glicose</i> .....	32
4.4.3.	<i>Teste oral de tolerância à glicose</i> .....	34
4.5.	Lipídeos fecais e hepáticos.....	35
4.5.1.	<i>Dosagem de colesterol e triglicerídeos fecais e hepáticos</i> .....	36
4.6.	Biomarcadores do estresse oxidativo.....	36
4.6.1.	Avaliação do potencial antioxidante.....	36
4.6.1.1.	<i>FRAP</i> .....	37
4.6.1.2.	<i>Sulfidrilas totais</i> .....	38
4.6.1.3.	<i>Glutathiona reduzida</i> .....	39
4.6.2.	Avaliação de enzimas antioxidantes.....	40
4.6.2.1.	<i>Superóxido dismutase</i> .....	40
4.6.2.2.	<i>Catalase</i> .....	41
4.6.3.	Indicadores de dano oxidativo.....	42
4.6.3.1.	Carbonilação de proteínas.....	42
4.6.3.2.	Peroxidação lipídica.....	43

4.7.	Análises histológicas.....	44
4.7.1.	Análise histológica do fígado.....	44
4.7.2.	Análise histológica e morfológica do tecido adiposo epididimal.....	45
4.8.	Avaliação de citocinas inflamatórias.....	46
5.	Discussão.....	48
6.	Conclusão.....	55
7.	Referências.....	56
8.	ANEXOS.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IMC	Índice de massa corporal
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	Proteína quimotática de monócitos 1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
$\text{O}_2$	Oxigênio
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
PGC1- $\alpha$	Co-ativador 1- $\alpha$ do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UCP-1	Proteína desaclopadora 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
XOR	Xantina oxidoreductase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de produção de óxido nítrico.....	9
Figura 2: Principais funções do óxido nítrico no organismo.....	11
Figura 3: Desenho experimental dos animais tratados com nitrato de sódio ou placebo, 2mM, por um período experimental de treze semanas.....	15
Figura 4: Evolução ponderal dos camundongos da linhagem C57BL/6 durante treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.). Teste ANOVA two-way post-test de Tukey.....	27
Figura 5: (A) Ganho de peso corporal e (B) Adiposidade relativa do tecido adiposo epididimal dos camundongos da linhagem C57BL/6. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; & $p < 0.05$ vs PN. ....	29
Figura 6: Consumo alimentar dos camundongos da linhagem C57BL/6 expresso pela média de gramas (A) e (B) calorias ingeridas por animal. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). Teste: (A) ANOVA two-way post-test de Dunn's e (B) ANOVA one-way post-test de Tukey # $p < 0.05$ vs PP; & $p < 0.05$ vs PN.....	30
Figura 7: Consumo hídrico dos camundongos da linhagem C57BL/6 expresso pela média ingerida por animal, em mililitros. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA two-way post-test de Tukey # $p < 0.05$ vs PP; & $p < 0.05$ vs PN.....	31

Figura 8: Glicemia dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao longo das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (S.E.M) Teste: ANOVA two-way post-test de Dunn's.....32

Figura 9: Glicemia final dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA one-way post-test de Tukey #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.....33

Figura 10: (A) Teste de tolerância oral à glicose realizado nos camundongos da linhagem C57BL/6. (B) Área sobre a curva do teste de tolerância oral à glicose realizado nos camundongos da linhagem C57BL/6. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: (A) ANOVA two-way post-test de Tukey e (B) ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.....34

Figura 11: Capacidade antioxidante total (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.....37

Figura 12: Conteúdo de sulfidrilas totais (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.....38

Figura 13: Atividade da glutatona reduzida (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; \$ $p < 0.05$ vs HP.....	39
Figura 14: Atividade da superóxido dismutase (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; & $P < 0.05$ vs PN; \$ $p < 0.05$ vs HP.....	40
Figura 15: Atividade da catalase (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; \$ $p < 0.05$ vs HP.....	41
Figura 16: Teor de proteína carbonilada (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; & $p < 0.05$ vs PN; \$ $p < 0.05$ vs HP.....	42
Figura 17: Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. # $p < 0.05$ vs PP; & $p < 0.05$ vs PN; \$ $p < 0.05$ vs HP.....	43

Figura 18: Alterações histopatológicas no fígado. Fotografia representativa da coloração de H & E (magnitude 40 x) de seções de fígado de cada grupo de animais: (A) PP Dieta padrão placebo, (B) PN Dieta padrão nitrato, (C) HP Dieta hiperlipídica placebo (D) HN Dieta hiperlipídica nitrato após treze semanas experimentais.....44

Figura 19: Histologia dos adipócitos. Fotografia representativa da coloração de H & E (magnitude 10 x) de seções do tecido adiposo epididimal de cada grupo de animais: (A) PP Dieta padrão placebo, (B) PN Dieta padrão nitrato, (C) HP Dieta hiperlipídica placebo (D) HN Dieta hiperlipídica nitrato após treze semanas experimentais.....45

Figura 20: Área dos adipócitos dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.....46

Figura 21: Quantificação de citocinas inflamatórias do tecido adiposo epididimal dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. (A) TNF- $\alpha$ , (B) MCP-1/CCL-2, (C) IL-6 e (D) IL-10. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.....47



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição energética das dietas confeccionadas.....	16
Tabela 2: Variação do perfil lipídico plasmático, em mg/dL, durante treze semanas experimentais.....	32
Tabela 3: Extração de lipídeos fecais e hepáticos, em mg, durante e ao final das treze semanas experimentais.....	35
Tabela 4: Conteúdo de colesterol total e triglicérides fecais e hepáticos, em mg/g, durante e ao final das treze semanas experimentais.....	36

## RESUMO

A obesidade é uma doença que vem ganhando destaque na pesquisa científica, tendo em vista que é fator de risco para o desenvolvimento de outras comorbidades. Com o aumento do consumo de dietas hiperlipídicas, a obesidade tem tomado proporções pandêmicas na sociedade moderna. O nitrato inorgânico tem ganhado destaque por meio de uma via alternativa de liberação de óxido nítrico, indispensável sob condições em que via endógena está comprometida pelos efeitos da obesidade. Assim, para compreender como o nitrato atua em importantes vias de sinalização nós utilizamos um modelo de obesidade animal induzida por dieta hiperlipídica e a administração de nitrato na água durante treze semanas experimentais. O nitrato não alterou a massa corporal e adiposidade, consumo calórico e hídrico, colesterol total e triglicerídeos, mas elevou a concentração de HDL-c e reduziu lipídeos totais no fígado. Além disso, aumentou a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e músculo gastrocnêmio ao passo que reduziu os danos oxidativos (TBARS e carbonilação de proteínas) nesses tecidos. No tecido adiposo, embora não tenha sido observado mudanças na liberação de citocinas pró-inflamatórias, o nitrato elevou os níveis de IL-10 e reduziu a hipertrofia dos adipócitos causada pela dieta hiperlipídica.

**Palavras-chave:** obesidade, nitrato inorgânico, estresse oxidativo.

## **ABSTRACT**

Obesity is a disease that has been gaining attention in scientific research, considering that it is a risk factor for the development of other comorbidities. With increasing consumption of hyperlipidic diets, obesity has reached pandemic proportions in modern society. Inorganic nitrate has gained prominence through an alternative route of nitric oxide release, indispensable under conditions in which the endogenous pathway is compromised by the effects of obesity. Thus, in order to understand the role of nitrate in important signaling pathways we used a model of animal obesity induced by a hyperlipid diet with nitrate administration in the water during thirteen experimental weeks. Nitrate did not alter body weight and adiposity, caloric and water intake, total cholesterol and triglycerides, but increased HDL-c levels and reduced total lipids in the liver. In addition, nitrate increased the activity of antioxidant enzymes in the liver and gastrocnemius muscle while reduced oxidative damage (TBARS and protein carbonylation) in these tissues. In adipose tissue, although no changes in the release of pro-inflammatory cytokines have been observed, nitrate increased IL-10 levels and reduced adipocyte hypertrophy caused by the hyperlipidic diet.

**Key words:** obesity, inorganic nitrate, oxidative stress.

## **1. INTRODUÇÃO**

A obesidade é uma doença alarmante que está atingindo dimensões pandêmicas. Estima-se que em todo o mundo tenha 2,1 bilhões de pessoas acima do peso, o que representa quase 30% da população (MARIE *et al.*, 2014).

A obesidade surge como resultado de um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas, criando um excedente de energia e um estado de balanço de energia positiva, resultando em excesso de peso corporal (HRUBY & HU, 2015). É caracterizada como estado inflamatório crônico de baixo grau e um componente chave para o desenvolvimento de outras comorbidades, como a síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (ROBERTS *et al.*, 2015; VERNOCHE *et al.*, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública atualmente. A projeção é que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos. No Brasil, acredita-se que mais de 50% da população adulta e aproximadamente 15% das crianças estejam acima do peso (WHO, 2014).

Embora o Índice de Massa Corporal apresente limitações quanto à indistinção da massa magra e da gordura e à distribuição dessa gordura no corpo, ainda é um parâmetro utilizado pela OMS para a classificação dos indivíduos em eutróficos (IMC 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>), com sobrepeso (IMC 25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) e obesos (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) (MANNA & JAIN, 2015; WOOD *et al.*, 2012).

### **1.1. OBESIDADE E INFLAMAÇÃO**

#### **1.1.1. Tecidos adiposos**

O tecido adiposo representa a principal fonte de ácidos graxos para o organismo. É um tecido heterogêneo, sendo constituído de adipócitos, pré-adipócitos, células vasculares e células imunes (LAFONTAM, 2014).

Nos mamíferos são encontrados dois tipos: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM), cuja composição, localização e função diferem entre si (BALISTRERI, *et al.*, 2010). Mais recentemente, foi descoberto um terceiro tipo de tecido adiposo formado por adipócitos denominados “*brite*” ou bege (PEIRCE *et al.*, 2014).

Anatomicamente, os tecidos adiposos são distribuídos em tecidos adiposos centrais - gorduras subcutâneas abdominais e viscerais superiores - e tecidos adiposos periféricos - gorduras de quadril e gluteofemoral (NOROUZIRAD *et al.*, 2017; PEIRCE *et al.*, 2014).

#### **1.1.1.1. Tecido adiposo branco**

O tecido adiposo branco constitui o principal tecido adiposo do corpo, contém a maior parte da gordura corporal total e é fonte de ácidos graxos livres, os quais são utilizados como substratos para a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, além de armazenar o excedente calórico na forma de triacilgliceróis (GESTA *et al.*, 2007).

No entanto, o papel do tecido adiposo branco vai além de um tecido que armazena e distribui lipídeos. Ele é visto como um órgão endócrino e heterogêneo, capaz de produzir i) moléculas sinalizadoras conhecidas como adipocinas, nas quais destacam-se: a leptina, adiponectina, resistina, apelina, quemerina, visfatina, entre outras e ii) citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1 ou CCL2), proteína ativadora de plasminogênio (PAI) e uma diversidade de interleucinas (JUGE-AUBRY *et al.*, 2005; WOZNIAK *et al.*, 2009).

O tecido adiposo branco está disperso em diferentes locais no corpo. Seus grandes depósitos são intra-abdominal, áreas perirrenais e intestinais, e subcutâneo nas nádegas, coxas e abdômen (GESTA *et al.*, 2007; JUGE-AUBRY *et al.*, 2005).

### **1.1.1.2. Tecido adiposo marrom**

O tecido adiposo marrom dissipa energia e atua como produtor de calor. Suas células produzem a proteína de desacoplamento 1 (UCP1) também conhecida como termogenina, expressa na membrana mitocondrial interna, que ao criar um vazamento de prótons, esgota o gradiente eletroquímico necessário para a fosforilação oxidativa, promovendo a termogênese ao invés da produção de ATP (REDINGER, 2009).

Ao contrário do TAB, o tecido adiposo marrom apresenta menor número de células de gordura, com maior vascularização e elevado número de mitocôndrias, responsáveis pela sua coloração marrom (VIRTANEN *et al.*, 2009).

Dessa forma, o tecido adiposo marrom em mamíferos tem função diferente em relação ao adiposo branco, sendo responsável pelo calor da febre, estado de hibernação e termogênese induzida pelo frio (REDINGER, 2009).

Nos seres humanos, acreditava-se que o tecido adiposo marrom era atrofiado depois do período pós-natal. No entanto, técnicas de tomografia mostraram claramente depósitos metabolicamente ativos desse tipo tecidual em adultos nas regiões cervicais, supraclaviculares, axilares e paraventrals (FRÜHBECK *et al.*, 2009).

### **1.1.1.3. Tecido adiposo bege**

Um terceiro tipo de tecido adiposo é formado pelos adipócitos bege ou “*brite*”. As células bege compartilham algumas características tanto das células do tecido adiposo marrom como das células do tecido adiposo branco (GESTA *et al.*, 2007).

Normalmente, as células bege são formadas pela indução de intermediários, como é o caso de segundos mensageiros (adenosina monofosfato e guanosina monofosfato cíclicos - AMPc e GMPc), capazes de desenvolver fenótipo de adipócito marrom em adipócitos brancos. A expressão de termogenina induzida por AMPc e o GMPc promove a produção de calor e, conseqüentemente a dissipação de energia química, tornando-se uma alternativa interessante no combate à obesidade (FRÜHBECK *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2016).

Nesse contexto, Roberts e colaboradores (2015) tem mostrado que o nitrato inorgânico ativa, *in vitro* e *in vivo*, uma via de sinalização via GMPc capaz de induzir a expressão gênica e proteica de componentes do programa termogênico (como UCP1 e PGC1- $\alpha$ ) em adipócitos brancos .

### **1.1.2. Adiposidade e inflamação**

Como já mencionado, o tecido adiposo é constituído de adipócitos, estromas, células endoteliais, imunológicas. Em condições fisiológicas normais, os adipócitos regulam a homeostase energética e os macrófagos residentes do tecido, com fenótipo do tipo M2, liberam citocinas anti-inflamatórias (ZEYDA & STULNIG, 2007).

Na obesidade, o tecido adiposo branco torna-se inflamado, admitindo um estado de desequilíbrio entre adipócitos e macrófagos. O estado inflamatório relacionado à obesidade leva à remodelação da composição do tecido adiposo, por meio do aumento no número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) dos adipócitos e pela infiltração de macrófagos (BALISTRERI, *et al.*, 2010; STRISSEL *et al.*, 2007).

A hipertrofia dos adipócitos é caracterizada pelo aumento do depósito de gordura em adipócitos diferenciados e pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios. Dessa forma, os adipócitos hipertrofiados mudam o equilíbrio imune para a produção de moléculas pró-inflamatórias. Essa mudança no perfil de citocinas no tecido é responsável pela modificação do tipo de macrófagos, isto é, ativação de macrófagos (M1) pró-inflamatórios (GORDON, 2007).

O descontrole na produção de citocinas pró-inflamatórias decorrente da obesidade pode afetar o organismo de forma sistêmica. No fígado, por exemplo, pode provocar mudanças na produção e liberação de lipoproteínas e moléculas inflamatórias. Em particular, elas induzem o aumento de lipoproteínas de baixa densidade (como LDL e VLDL), apolipoproteína B (apoB) e secreção de triglicerídeos (MATHIEU *et al.*, 2009).

Assim, a adiposidade em excesso tem sido fortemente associada ao aumento na liberação de citocinas inflamatórias, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia, câncer e doenças coronarianas, contribuindo com o aumento da morbidade e mortalidade (ASHOR, *et al.*, 2016; PIVA *et al.*, 2013).

## 1.2. OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

Basicamente, o estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's, do inglês *reactive oxygen species*) e a capacidade antioxidante celular devido à geração aumentada de ERO's e /ou disfunção do sistema antioxidante (CHEN *et al.*, 2012).

A produção de ERO's é vista como um processo biológico vital, já que participa de diferentes vias de sinalização bem como do sistema de defesa do hospedeiro. No entanto, quando em excesso pode gerar uma reação em cadeia capaz de danificar moléculas e comprometer progressivamente a fisiologia celular (CHEN *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo é um processo deletério, pois as espécies reativas excedentes podem reagir com uma variedade de alvos biológicos, podendo alterar carboidratos, proteínas, lipídeos, lipoproteínas e ácidos nucleicos. (PIVA *et al.*, 2013; VASSALLE *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo e a obesidade relacionam-se de maneira recíproca. A adiposidade excedente é vista como fator de risco para o estresse oxidativo por meio de alguns mecanismos bioquímicos exacerbados, como a geração de superóxido a partir da NADPH oxidase, a fosforilação oxidativa, a auto-oxidação de gliceraldeído, a ativação de proteína quinase C, entre outros. Por outro lado, estudos mais recentes têm mostrado que o estresse oxidativo também pode desencadear comorbidades associadas à obesidade por estimular a deposição de gordura no tecido adiposo branco e alterar a ingestão alimentar (MANNA & JAIN, 2015; SAVINI, *et al.*, 2013).

De maneira geral, o estresse oxidativo desempenha importante papel no desenvolvimento da obesidade e de complicações associadas à ela. Durante o processo de ganho de peso, os indivíduos podem apresentar um descompasso no sistema de defesa oxidante, o que pode acelerar ou até mesmo facilitar o desenvolvimento da obesidade (SAVINI *et al.*, 2013). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o estresse oxidativo pode desencadear o aumento da proliferação de pré-adipócitos, bem como da diferenciação e tamanho de adipócitos maduros (HIGUCHI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2009).



Dentre os fatores que corroboram com o estresse oxidativo na patogênese da obesidade destacam-se: hiperglicemia, elevados níveis de lipídeos teciduais, inflamação, hiperleptinemia, disfunção endotelial, diminuição da função mitocondrial e até mesmo o tipo da dieta, capaz de provocar lipotoxicidade e glicotoxicidade (MANNA & JAIN, 2015). O estresse oxidativo também tem sido responsável pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (PIVA *et al.*, 2013).

### 1.3. OBESIDADE E NITRATO INORGÂNICO

O nitrato era conhecido primariamente como produto metabólico inativo da oxidação do óxido nítrico (HORD *et al.*, 2009; MONCADA & HIGGS; 1993). No entanto, alguns estudos têm mostrado outras vertentes acerca do seu papel no organismo (BRYAN *et al.*, 2005; JANSSON *et al.*, 2008). Os efeitos positivos do nitrato agem por meio de uma via denominada via do nitrato-nitrito-NO<sup>\*</sup>, em que o nitrato atua como substrato para formação de óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>) (LARSEN *et al.*, 2006).

Devido às sinalizações que intermedeia nos tecidos, o óxido nítrico tem sido visto como potencial modulador de doenças cardiovasculares e disfunções metabólicas (HUANG, 2009; ROBERTS *et al.*, 2015 ; MONTI *et al.*, 2003 ; TANG *et al.*, 2011).

Pesquisas com roedores têm mostrado que o nitrato apresenta características antiobesidade e está envolvido na perda de peso, redução da gordura corporal, reversão da lipodistrofia, além de melhorias na homeostase da glicose e da insulina (CARLSTRÖM *et al.*, 2010; ROBERTS *et al.*, 2015).

Outra abordagem do nitrato inorgânico tem sido o seu papel na modulação da função mitocondrial em modelo animal, por meio do aumento da expressão de genes termogênicos no próprio tecido adiposo marrom e, ainda, a indução de um fenótipo marrom no tecido adiposo branco - denominado "*browning*" - pela expressão de genes e proteínas específicos dos adipócitos marrons (ROBERTS *et al.*, 2014; ROBERTS *et al.*, 2015; ). A mudança fenotípica "*brown adipocyte-like*" do tecido adiposo branco leva à ativação do programa de termogênese mitocondrial,

o que confere um potencial terapêutico para o tratamento da obesidade e síndrome metabólica (ROBERTS *et al.*, 2015).

### 1.3.1. Fisiologia do nitrato

Existem duas principais fontes de produção de óxido nítrico no organismo: a via endógena, a partir do aminoácido L-arginina e a via exógena, por meio do nitrato inorgânico da dieta, presente nos vegetais verde-folhosos (KAPIL *et al.*, 2010 (LUNDBERG & GOVONI; 2004). O NO<sup>•</sup> produzido pela via endógena é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo oxidado no sangue e nos tecidos e culminando na formação dos compostos nitrosos: nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

A bioativação do nitrato dietético ou de fontes endógenas requer a sua redução inicial a nitrito (BRYAN *et al.*, 2005). Em mamíferos essa conversão ocorre principalmente por meio de bactérias comensais presentes na cavidade oral e no trato gastrointestinal ou pela ação de enzimas específicas da redutase do nitrato denominadas xantina oxidoredutases (XOR). Uma vez que o nitrito é formado, existem algumas vias no corpo para a sua redução para NO<sup>•</sup>, envolvendo uma série de enzimas nitrito redutases: a hemoglobina, mioglobina e outras globinas heme, xantina oxidoredutase, ascorbato e enzimas da cadeia transportadora de elétrons (GLADWIN *et al.*, 2005; GODBER *et al.*, 2000; IGNARRO, 2002).

Os níveis plasmáticos de nitrato compreendem a faixa de 20-40 µM, enquanto os níveis de nitrito são substancialmente menores, 50-300 nM. Entretanto, essas concentrações no sangue podem variar de acordo com as situações do organismo (HORD *et al.*, 2009; LARSEN *et al.*, 2006).

Por um tempo, o nitrato e, conseqüentemente o nitrito, foram vistos como vilões para a saúde, sugerindo que eles poderiam ser agravantes no desenvolvimento de câncer por meio da formação de N-nitrosamidas; entretanto estudos não evidenciaram ligação entre os compostos nitrosos com o risco de câncer (van LOON *et al.*, 1998; PANNALA *et al.*, 2003; RASSAF *et al.* 2002). Inclusive, segundo a Organização de Comitê Mundial de Saúde e Aditivos

Alimentares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), até então, não há evidências científicas da carcinogenicidade induzida por nitrato.

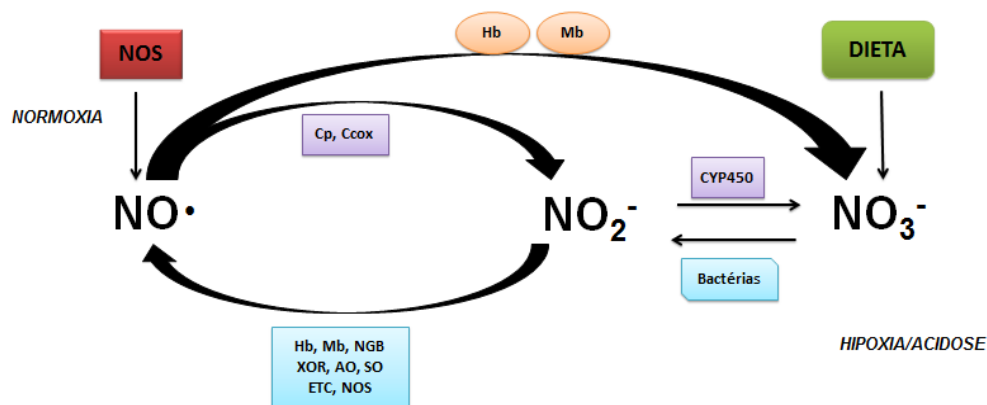
Alimentos folhosos são ricos em nitratos e os estudos têm sugerido outra proposta: o consumo desses alimentos tem reduzido o risco de câncer e de outras morbidades, agindo de maneira profilática e terapêutica (BRYAN *et al.*, 2007; LUNDBERG *et al.*, 2008).

As beterrabas, a alface, a acelga, a rúcula e os espinafres são os vegetais que contém a maior quantidade de nitrato, maior ou igual a 250 miligramas de nitrato a cada 100 gramas. Dentre estes, a beterraba é um dos vegetais, particularmente mais ricos em nitrato inorgânico, contendo uma média de 2056 mg de nitrato em um cultivo tradicional (d'EL-REI *et al.*, 2016).

#### **1.3.1.1. Geração de NO<sup>\*</sup> independente de NOS**

A via dependente de NOS utiliza como reagentes a L-arginina e o oxigênio para produzir NO<sup>\*</sup>. Em contrapartida, uma via alternativa (via nitrato-nitrito-NO<sup>\*</sup>) é gradualmente ativada em condições mínimas de oxigênio e, portanto, é caracterizada pela geração de NO<sup>\*</sup> independente de NOS. Neste sentido, a formação de NO<sup>\*</sup>, independente de NOS, pode ser visto como um sistema de segurança para assegurar que haja formação de óxido nítrico suficiente mesmo quando o fornecimento de O<sub>2</sub> é limitado (GAGO *et al.*, 2007; OESTERGAARD *et al.*, 2007), como representado na **Figura 1**.

A geração de NO<sup>\*</sup> pela via alternativa é bastante reforçada durante a hipóxia e a acidose, garantindo assim a produção ativa dessa molécula em situações para as quais as atividades enzimáticas NOS-dependentes de oxigênio estão comprometidas (BRYAN *et al.*, 2005; OESTERGAARD *et al.*, 2007). A redução de nitrito à NO<sup>\*</sup> e as proteínas modificadas durante a hipóxia parecem contribuir para a sinalização fisiológica nessas condições de baixa de oxigênio, propiciando a vasodilatação, a modulação da respiração celular e a resposta celular ao estresse isquêmico (COSBY *et al.*, 2003; NAGABABU *et al.*, 2003; SHIVA *et al.*, 2007).



**Figura 1:** Vias de produção de óxido nítrico. Em normoxia, a NOS é funcional e gera  $\text{NO}\cdot$ , que é oxidado por Mb e Hb à nitrato e pela citocromo-oxidase (Ccox) e ceruloplasmina (Cp) à nitrito. O nitrato também pode ser derivado da dieta bem como da oxidação de nitrito por enzimas do citocromo P450 (CYP450). Em hipóxia, o nitrato é reduzido à nitrito pelas bactérias comensais anaeróbicas e nitrito é reduzido à óxido nítrico bioativo por uma série de enzimas nitrito redutases de mamífero, incluindo hemoglobina (Hb), mioglobina (Mb), neuroglobina (NGB), xantina oxidorreductase (XOR), aldeído oxidase (AO), oxidase sulfito (SO) e componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ETC) e mais raramente por algumas NOS. Fonte: Modificado LUNDBERG *et al.*, 2008.

A manutenção do óxido nítrico no organismo é de suma importância tendo em vista que, fisiologicamente, o  $\text{NO}\cdot$  é um regulador crucial da homeostase vascular, da neurotransmissão e da defesa do hospedeiro (LUNDBERG & GOVONI, 2004).

### 1.3.1.2. Circulação entero-salivar do nitrato

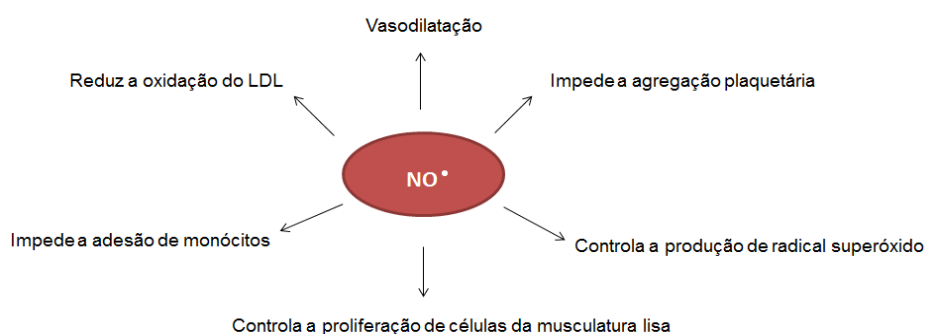
Dois possibilidades de segregação de nitrato/nitrito independentemente da geração de óxido nítrico são descritos em humanos: a intragástrica e a salivar. Em conjunto, envolvem um processo que não requer a atividade de NOS, denominado circulação entero-salivar de nitrato inorgânico (LUNDBERG *et al.*, 2008).

Na boca, como as células de mamíferos não conseguem metabolizar efetivamente o nitrato inorgânico ingerido de fontes dietéticas, as bactérias anaeróbicas facultativas comensais o reduzem de maneira eficaz em nitrito, pela ação das enzimas nitrato redutases. O ânion é rapidamente absorvido no trato

gastrointestinal, especialmente no intestino delgado. No estômago, o nitrito é decomposto espontaneamente para formar óxido nítrico e outros óxidos de nitrogênio bioativos, os quais regulam funções fisiológicas importantes. O nitrato e nitrito remanescentes são absorvidos a partir do intestino para a circulação (GAGO *et al.*, 2007; IGNARRO *et al.*, 2002; LUNDBERG & GOVONI, 2004). Nessas condições, as concentrações plasmáticas de nitrato e também de nitrito aumentam significativamente e permanecem elevados durante um período prolongado de tempo, já que a meia-vida plasmática desses compostos varia de 5 a 6 horas. Além do mais ainda no plasma, misturam-se com o nitrato formado a partir das enzimas NOS, podendo converter-se em óxido nítrico bioativo no sangue e nos tecidos sob hipóxia fisiológica (GLADWIN *et al.*, 2005; JANSSON *et al.*, 2008; KLEINBIOGARD *et al.*, 2006).

### 1.3.1.3. *Papel mecanicista do óxido nítrico*

A geração de óxido nítrico, inclusive pela via nitrato-nitrito-NO<sup>\*</sup>, desempenha algumas funções no organismo, como mostrado na **Figura 2**.



**Figura 2:** Principais funções do óxido nítrico no organismo.

A **Figura 2** ilustra que o NO<sup>\*</sup> atua na i) vasodilatação: aumenta a área do vaso e como tal, aumenta o fluxo de sangue para os órgãos essenciais, tais como o coração; ii) rompe a agregação plaquetária, impedindo o acúmulo de plaquetas no sangue; iii) controla a produção de radicais superóxido, os quais contribuem para o desenvolvimento de doenças e atuam no processo de envelhecimento decorrente

do estresse oxidativo; iv) atua nas células do músculo liso: a proliferação destas células faz com que a artéria fique mais estreita, de modo que menos sangue possa fluir para os órgãos; v) impede a adesão de monócitos e, por consequência, bloqueia a inflamação e, assim, diminui a progressão de doenças cardiovasculares; vi) e reduz a oxidação de LDL: a oxidação torna o LDL-colesterol agressivo nos vasos sanguíneos, o NO<sup>\*</sup> reduz essa oxidação. (LUNDBERG *et al.*, 2008; KAPIL *et al.*, 2010).

A maior parte do NO<sup>\*</sup> é produzido pelo endotélio, por isso quando vasos sanguíneos se tornam revestidos com o acúmulo de placa aterosclerótica a sua produção é significativamente reduzida. Menor biossíntese de NO<sup>\*</sup> pode ocorrer quando o tecido endotelial é danificado por idade, falta de atividade física, doença, entre outros (HORD *et al.*, 2009; IGNARRO *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2011). Contudo, fatores externos, como a dieta afetam diretamente a capacidade ou incapacidade do nosso organismo de sintetizar óxido nítrico (KAPIL *et al.*, 2010).

O óxido nítrico sintetizado na camada mais interna do endotélio dos vasos sanguíneos, transmite um sinal para as células vizinhas (por meio da ativação da guanilato ciclase e conversão de GTP em GMPc), se espalhando rapidamente através das membranas celulares para as células musculares subjacentes, propiciando a dilatação das paredes da artéria. Esse relaxamento auxilia diretamente na regulação da pressão arterial, aumentando o fluxo sanguíneo para órgãos vitais (GLADWIN *et al.*, 2005; LARSEN *et al.*, 2006). Essas mensagens biológicas influenciam praticamente todos os órgãos do corpo, incluindo os pulmões, fígado, estômago, órgãos genitais e os rins. Assim, quando o endotélio está saudável, o óxido nítrico é produzido e liberado na corrente sanguínea e distribuído para os órgãos do corpo (CARLSTRÖM *et al.*, 2010; KAPIL *et al.*, 2010).

Recentemente, modelos experimentais e estudos clínicos demonstraram que a redução na biodisponibilidade de óxido nítrico desempenha papel central na fisiopatologia da disfunção metabólica. Portanto, o nitrato dietético ou inorgânico tem sido amplamente estudado em ensaios clínicos como alternativa da via clássica de produção NO<sup>\*</sup>, especialmente em situações de hipóxia (d'EL-REI *et al.*, 2016).

#### 1.4. NITRATO E ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de ERO's está envolvida na patogênese de várias doenças. Em suma, as ERO's incluem formas parcialmente reduzidas de oxigênio, com é o caso do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), o ânion superóxido, ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entre outros (LUBOS *et al.*, 2009).

O ânion superóxido é gerado pela redução do oxigênio por um elétron, sendo essa reação catalisada pela NADPH oxidase, respiração mitocondrial ou ainda pelas oxidorreduções. A sua produção exacerbada nas células pode desencadear dano oxidativo, alteração na transcrição gênica, modificação pós-traducional e inativação de óxido nítrico (WHITE *et al.*, 1994).

O acúmulo de ERO's pode ser acompanhado pela formação de espécies reativas ao nitrogênio (ERN's), como é o caso do peroxinitrito, um ânion altamente reativo formado pela reação entre o superóxido e o óxido nítrico. Dessa maneira, o oxigênio ou os radicais derivados do oxigênio podem modular a bioatividade do óxido nítrico (KOJDA & HARRISON, 1999).

Contudo, a relação entre a ingestão crônica de nitrato inorgânico e sua conversão à nitrito e óxido nítrico, em modelo animal de obesidade, os danos oxidativos e processos inflamatórios decorrentes da obesidade ainda não estão bem esclarecidos, sendo portanto, tema dessa dissertação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar o efeito da suplementação de nitrato de sódio durante o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ❖ Comparar o progresso da obesidade pela evolução ponderal, percentual de adiposidade, consumo alimentar e análises histológicas do tecido adiposo em animais obesos e não obesos tratados ou não com nitrato de sódio;
- ❖ Avaliar o efeito da ingestão de nitrato inorgânico nos parâmetros de bioquímica sanguínea, lipídeos circulantes e homeostasia da glicose;
- ❖ Analisar o perfil lipídico das fezes e do fígado;
- ❖ Verificar possíveis alterações morfológicas no fígado dos grupos obesos tratados e não tratados;
- ❖ Compreender a ação do nitrato no balanço redox do fígado, rim e músculo gastrocnêmio;
- ❖ Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2) no tecido adiposo epididimal.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

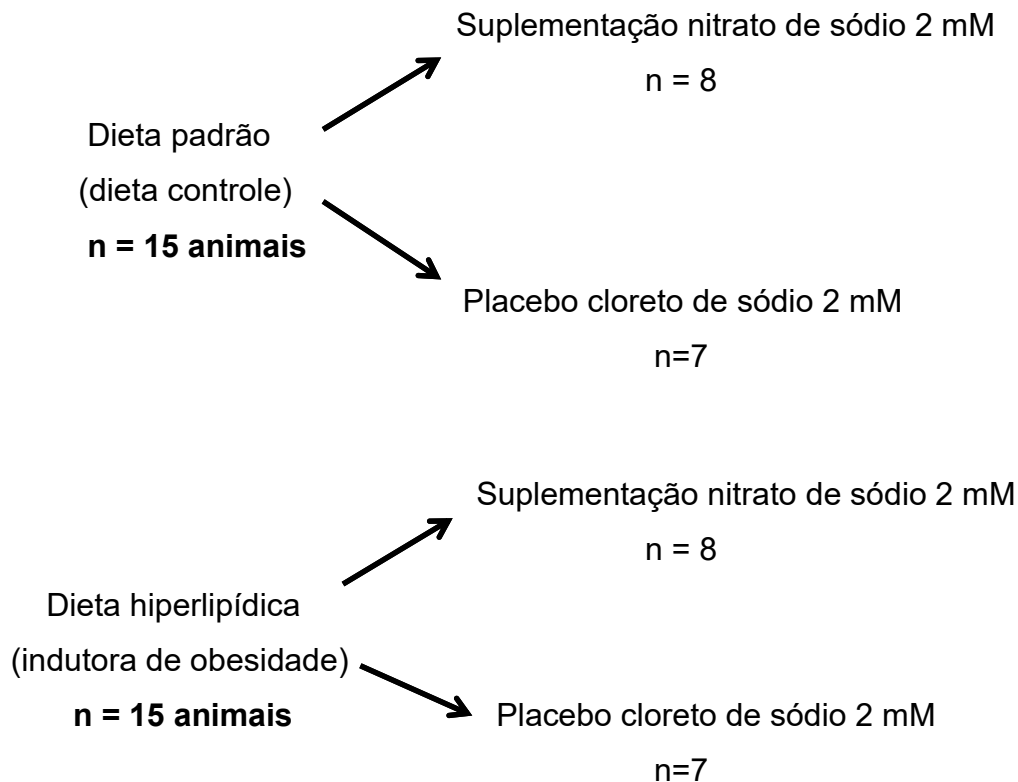
#### 3.1. Animais, delineamento experimental e dietas

Trinta camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6 com 10 semanas de idade foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU, nº 128/15 (**Anexo 1**).

Os animais foram inicialmente pesados, distribuídos em gaiolas de dimensões de 30x20x13cm para até seis animais e alojados no CBEA por um período de 13 semanas, onde foram submetidos a um ciclo de 12/12 horas claro e escuro. Semanalmente era feita a pesagem dos animais e do restante de comida presente nas gaiolas, além da medição do volume remanescente de água das mamadeiras. Em sequência, era feita a troca das gaiolas bem como de água e comida, adicionando um volume fixo de água e pesando uma quantidade de ração. Quinzenalmente eram coletadas as fezes das gaiolas para estudo de parâmetros lipídicos. A cada três semanas, coletávamos sangue em capilares heparinizados para análises bioquímicas através de um corte na cauda do animal (**Anexo 2**).

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais conforme o tipo de dieta e suplementação: dieta padrão ou dieta hiperlipídica e solução de nitrato de sódio ou placebo de cloreto de sódio. Por conseguinte, o desenho experimental foi composto por um grupo de oito animais que receberam dieta padrão e suplementação de nitrato; um grupo de oito animais alimentados com dieta hiperlipídica e suplementação de nitrato; um terceiro grupo de sete animais em que foi administrada a dieta padrão e uma solução placebo; e um grupo de sete animais que foram alimentados com dieta hiperlipídica e também receberam o placebo (**Figura 3**).

A suplementação do nitrato de sódio ou da solução placebo foi adicionada à mamadeira, à concentração final de 2 mM em um volume de 250 mL de água. Tanto a água quanto a comida foram ofertados *ad libitum*. É importante ressaltar que a suplementação de nitrato ou placebo foi realizada de forma concomitante à indução da obesidade.



**Figura 3:** Desenho experimental dos animais tratados com nitrato de sódio ou placebo, 2mM, por um período experimental de treze semanas.

A dieta padrão foi composta de: amido de milho (46,5%), maltodextrina (15,5%), caseína (14%), sacarose (10%), óleo de soja (4%), celulose (5%), mistura de minerais (3,5%), mistura de vitaminas (1%), metionina (0,18%), bitartarato de colina (0,25%), hidroxitolueno butilado – BHT (0,0008%).

A dieta indutora de obesidade (DIO) foi composta de: amido de milho (6,2%), caseína (20%), óleo de soja (2%), celulose (5%), mistura de minerais (3,5%), mistura de vitaminas (1%), metionina (0,3%), bitartarato de colina (0,25%), hidroxitolueno butilado - BHT (0,0014%), banha de porco (35,5%), groselha (31%). As dietas foram manipuladas no laboratório e as composições energéticas das dietas estão descritas na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Composição energética das dietas confeccionadas.

	<b>Padrão</b>	<b>DIO</b>
Carboidrato	77 %	42,2 %
Proteína	14 %	20 %
Gordura total	4 %	37,5 %
Calorias g/dieta	3,17 kcal/g	5,21 kcal/g

### **3.2. Evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico**

Para acompanhamento da evolução da obesidade, avaliamos semanalmente a evolução ponderal, o consumo alimentar e hídrico.

O consumo alimentar foi monitorado pela diferença entre a ração ofertada e a ração ingerida, levando em consideração a quantidade de animais por gaiola para a obtenção do consumo médio diário por animal.

A avaliação do consumo hídrico foi um parâmetro crucial para o trabalho, tendo em vista que tanto a suplementação quanto o placebo foram adicionados à água. A concentração escolhida, 2 mM (170 mg/L), foi pautada em valores próximos aos encontrados nos alimentos (d'EL-REI *et al.*, 2016).

Uma vez na semana era medido o volume de água que sobrava na mamadeira. A diferença entre o volume fixo adicionado (250 mL) e o volume restante era dividida pelo número de animais na gaiola a fim de se estimar o consumo médio diário por animal.

### **3.3. Amostras de sangue e tecidos**

As amostras de sangue, para posteriores dosagens bioquímicas, foram coletadas após jejum de 10 horas, a cada três semanas. Ao término do experimento (13ª semana) os animais foram eutanasiados com 80 mg/kg do anestésico cetamina e 10 mg/kg do analgésico xilazina diluídos em tampão fosfato de sódio

pH 7,3. O sangue foi coletado da artéria braquial em tubos heparinizados, imediatamente centrifugado a 3000 rpm, 4 °C, por 10 minutos e o plasma armazenado no ultrafreezer - 80 °C para posteriores análises. Anteriormente à coleta dos órgãos, os animais foram perfundidos com solução tampão fosfato (PBS 1X) pH 7,3 no coração, mais especialmente no ventrículo esquerdo.

O fígado foi coletado e fragmentado em três porções: i) Uma porção foi armazenada em tubos com formalina 10% para as análises histológicas; ii) O lóbulo maior foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C para as avaliações de estresse oxidativo; iii) O lóbulo menor foi também congelado e armazenado no ultrafreezer para avaliação dos lipídeos totais pelo método de Folch (1957).

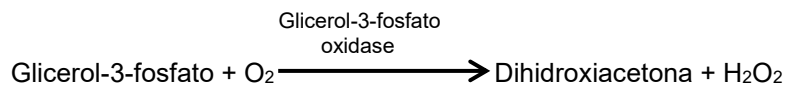
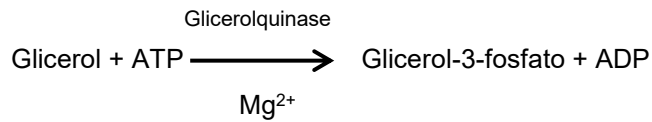
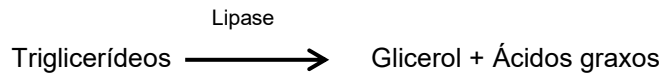
O tecido adiposo epididimal dos animais foi retirado, pesado para cálculo da porcentagem de adiposidade epididimal e fragmentado, sendo uma parte destinada à histologia e a outra congelada e armazenada no ultrafreezer à - 80°C, sendo, posteriormente utilizado para a quantificação de citocinas inflamatórias por Elisa (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*).

Tanto o rim quanto o músculo gastrocnêmio dos animais foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados à - 80°C para posteriores avaliações do estresse oxidativo.

### **3.4. Avaliação do perfil lipídico plasmático**

#### **3.4.1. Determinação da concentração de triglicerídeos**

Para a dosagem de triglicerídeos foi utilizado o kit Triglicérides Liquiform-Labtest, um sistema enzimático que visa à quantificação por reação de ponto final. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre, o qual é fosforilado pela glicerol quinase. O produto sofre ação glicerol 3-fosfato oxidase, na presença do oxigênio, produzindo peróxido de hidrogênio. Este, sob ação de uma peroxidase e o reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com absorção a 500 nm. As reações são descritas a seguir:

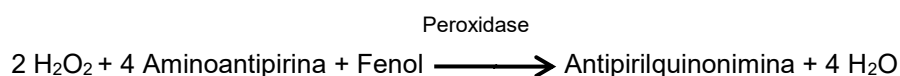
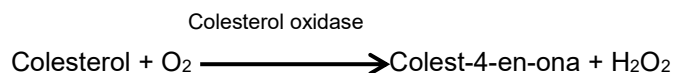
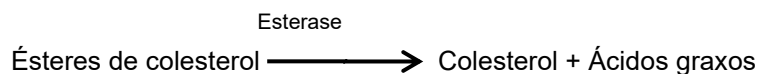


Para a construção da curva padrão, o padrão 200 mg/dL foi submetido a quatro diluições, resultando nas seguintes concentrações: 1 mg/dL, 2 mg/dL, 4 mg/dL e 8 mg/dL. As amostras de plasma também foram diluídas (1:25 ou 1:40, dependendo da amostra). Foi adicionado 100 µL das soluções padrão, 100 µL das amostras diluídas e 100 µL do reagente de cor em uma microplaca de 96 poços. A concentração de triglicerídeos na amostra foi determinada a partir da curva padrão, sendo a intensidade da cor formada diretamente proporcional à concentração. A leitura da absorbância foi realizada à 500 nm em espectrofotômetro.

### **3.4.2. Determinação da concentração de colesterol total**

Para a dosagem do colesterol total foi utilizado o kit Colesterol Liquiform-Labtest, um sistema enzimático colorimétrico que visa à quantificação por reação de ponto final. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase

em presença de fenol e 4-aminoantipirina, forma um cromóforo róseo avermelhado com absorção máxima a 500 nm. As reações são descritas a seguir:



Para a construção da curva padrão, o padrão 200 mg/dL foi submetido a quatro diluições, resultando nas seguintes concentrações: 1 mg/dL, 2 mg/dL, 4 mg/dL e 8 mg/dL. As amostras de plasma também foram diluídas (1:40). Foi adicionado 100 µL das soluções padrão, 100 µL das amostras diluídas e 100 µL do reagente de cor em uma microplaca de 96 poços. A concentração de colesterol total na amostra foi determinada a partir da curva padrão, sendo a intensidade da cor formada diretamente proporcional à concentração. A leitura da absorbância foi realizada à 500 nm em espectrofotômetro.

### **3.4.3. Determinação da concentração do colesterol-HDL**

As concentrações do colesterol-HDL foram obtidas através do kit Colesterol HDL, cujo princípio baseia-se na precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por reação de ponto final. As amostras de plasma foram homogeneizadas com o reagente precipitante (contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L) e centrifugadas a 12.000 rpm à 4 °C durante 4 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a determinação do HDL e o precipitado descartado.

Além do reagente precipitante, o kit é composto de um padrão 20 mg/dL (contém colesterol 0,52 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L). Tanto o padrão como os sobrenadantes coletados foram pipetados em duplicata (10 µL/poço) na microplaca de 96 poços com 200 µL de reagente de cor, o mesmo utilizado na dosagem de colesterol total. A seguir, foi feita a incubação por 15 minutos à 37 °C e a leitura espectrofotométrica à 492 nm no espectrofotômetro.

#### **3.4.4. Determinação da concentração do colesterol não-HDL**

O colesterol não-HDL (LDL colesterol e VLDL colesterol) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e o HDL colesterol.

### **3.5. Avaliação da homeostase da glicose**

#### **3.5.1. Determinação da glicemia de jejum**

A cada três semanas (t = 0, t = 3, t = 6, t = 9 e t = 12) os animais eram submetidos a um jejum de 10 horas para a avaliação da glicemia. Com o auxílio de um glicosímetro (Bayer) e de fitas medidoras correspondentes era coletada uma gota de sangue de aproximadamente 10 µL da cauda do animal para a medição da glicose sanguínea.

#### **3.5.2. Teste oral de tolerância à glicose**

Na 12<sup>a</sup> semana os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose. O teste consiste na determinação da glicemia antes e após a ingestão de uma solução conhecida de glicose (0,30 g/mL), a qual foi administrada por gavagem de acordo com a massa do animal (2g/kg de peso corporal), conforme realizado por Hezel e colaboradores (2015). Os animais foram submetidos ao jejum por 6 horas e, em seguida, foi realizada a primeira coleta através de um corte na cauda (tempo

zero) para a dosagem da glicemia. Coletas sucessivas foram feitas após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose (SILVA *et al.*, 2017).

### **3.6. Extração e determinação de lipídeos fecais e hepáticos**

Os lipídeos totais das fecais e hepáticos foram extraídos segundo o método de Folch (1957). Foram pesados 100 miligramas de fígado e de fezes em tubos de ensaio para homogeneização com uma solução de clorofórmio: metanol (2:1), com subsequente adição de metanol e centrifugação à 3.000 rpm à 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado em novos tubos e a ele foi adicionado clorofórmio e solução de NaCl a 0,73% . Após homogeneização, nova centrifugação foi realizada utilizando os mesmos parâmetros. Desprezou-se a fase superior e foi feita a lavagem do conteúdo com solução de clorofórmio, deixando secar à 37 °C. A diferença entre o peso dos tubos após a secagem com o peso dos tubos limpos remete à quantidade de lipídeos extraídos. Para a dosagem de colesterol total e triglicerídeos presentes é feita uma ressolubilização em isopropanol e a utilização dos métodos já mencionados.

### **3.7. Quantificação de proteínas totais**

Para a dosagem de proteínas totais presente nos tecidos coletados foi escolhido o método de Bradford. Trata-se de uma quantificação que envolve a ligação do corante "*Comassie Brilliant Blue*" às proteínas da amostra, sendo lida espectrofotometricamente à 595 nm (BRADOFORD, 1976).

Uma solução estoque de soro albumina bovino (BSA) 2mg/mL foi utilizada para a construção da curva padrão (0,1 – 1,4 µg/µL) para a determinação de proteínas das amostras por regressão linear. Tanto a curva como as amostras foram incubadas com o reagente de Bradford em microplaca durante 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica foi feita em 595 nm.



### **3.8. Avaliações do Estresse Oxidativo**

Para as análises de estresse oxidativo, fígado, rim e músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM pH 7,4 na proporção de 1:10 (tecido:tampão). Fígado e rim foram centrifugados à 800xg à 4°C durante 10 minutos e o músculo foi centrifugado à 10.000xg 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para as medições e o *pellet* descartado.

#### **3.8.1. FRAP (Capacidade antioxidante total)**

A técnica denominada FRAP é determinada pelo potencial antioxidante redutor férrico. Neste ensaio, as espécies antioxidantes presentes na amostra reduzem  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Para isso, o ferro é quelado em 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando  $Fe^{3+}$ -TPTZ. O complexo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina é reduzido para a forma ferrosa, a qual apresenta coloração azul intensa, determinada espectrofotometricamente à 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

Os sobrenadantes coletados foram incubados por 10 minutos à 37 °C com o reagente de FRAP (tampão acetato 0,3 M pH 3,6, solução de TPTZ 10 mM e solução de cloreto férrico 20 mM) e submetidos à leitora de microplacas para quantificação no comprimento de onda mencionado. Os cálculos foram obtidos através de uma curva padrão de trolox (10 – 200  $\mu$ M), um análogo da vitamina E, por regressão linear.

#### **3.8.2. Sulfidrilas totais**

O conteúdo de sulfidrilas determina os tióis totais de uma amostra. Trata-se de um método cujo reagente de cor, o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB)

também conhecido como reagente de Ellman's, é reduzido por tióis, gerando um derivado amarelo, o 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), lido espectrofotometricamente à 412 nm (AKSENOV et al., 2001).

São adicionadas ao sobrenadante dos tecidos analisados, tampão fosfato (PBS) com EDTA 1 mM pH 7,4 e o reagente DTNB 10 mM preparado em solução de fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0. Após incubação no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente, é feita a leitura espectrofotométrica à 412 nm por reação de ponto final em microplacas. O conteúdo de sulfidrilas totais são calculados descontando-se os valores do branco do reagente e da amostra.

### **3.8.3. Glutathiona reduzida (GSH)**

A glutathiona é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) com atividade antioxidante capaz de desempenhar importante papel na prevenção de danos causados por radicais livres, agindo como co-substrato de algumas enzimas antioxidantes (glutathiona peroxidases e glutathiona S-transferases). Além disso, a glutathiona pode reagir com o óxido nítrico gerando S-nitrosoglutathiona (GSNO) e evitando a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (BROWNE & ARMSTRONG, 1998).

Inicialmente o conteúdo proteico do sobrenadante foi precipitado com ácido metafosfórico (MPA) na proporção de 1:1 (homogeneizado / MPA). As amostras foram centrifugadas a 7000xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as medições. O GSH reage com orto-ftalaldeído (OPT 1 mg / mL de metanol) diluído em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 M com EDTA 0,005 M pH 8,0. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi construída para quantificar GSH nas amostras usando regressão linear. A leitura foi feita em um fluorímetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

### **3.8.4. Superóxido dismutase (SOD)**

A SOD é a enzima que catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo portanto a defesa primária

contra o estresse oxidativo, tendo em vista que o radical superóxido é um forte iniciador de reações em cadeia. O método de avaliação da SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Como o superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico, a SOD presente na amostra compete pelo radical. A auto-oxidação do pirogalol leva a formação de um composto colorido, detectado no espectrofotômetro à 420 nm (MARKLUND, 1985).

Para avaliar a atividade enzimática da SOD, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações da enzima a partir de um estoque com tampão Tris 50 mM com EDTA 1 mM pH 8,2 (tampão SOD), SOD 10 U/mL e pirogalol 24 mM preparado em HCl 10 mM. As amostras de sobrenadante foram pipetadas na microplaca com tampão SOD e pirogalol. A leitura cinética ocorreu em microplacas à 420 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

### **3.8.5. Catalase (CAT)**

A catalase é uma enzima produzida pelo peroxissomo cuja função é converter o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em água e oxigênio. A atividade da catalase foi medida através da degradação do  $H_2O_2$  pela variação de absorbância a 240nm (AEBI 1984).

Os sobrenadantes foram incubados com Triton 10% no gelo por 15 minutos. Em seguida foi adicionada peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 10 mM. A leitura cinética foi realizada em microplacas específicas para ultravioleta, aplicando um comprimento de onda de 240 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

### **3.8.6. TBARS (Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)**

A peroxidação lipídica é um processo decorrente da reação dos radicais livres com os lipídeos de membrana com consequente formação de malondialdeído. Esta substância aquecida na presença do ácido tiobarbitúrico

(TBA) forma um composto de coloração rosada o qual é medido espectrofotometricamente à 532 nm (YAGI, 1998).

Os sobrenadantes foram incubados com ácido tricloroacético (TCA 10%) e TBA 0,67%, sendo posteriormente agitados e aquecidos em banho-maria por 2 horas à 40 °C. Após resfriadas, as amostras foram misturadas com butanol e centrifugadas à 5000xg por 3 minutos e o sobrenadante avaliado em um fluorímetro a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão. Uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametroxipropano (TMP) em tampão fosfato de sódio com KCl pH 7,4 foi preparada e submetida aos mesmos procedimentos que as amostras.

### **3.8.7. Proteína Carbonilada**

Os radicais livres estão entre os principais mecanismos de modificação oxidativa de proteínas. Neste contexto, a formação de carbonilas pode ser um marcador precoce de dano proteico. Nesse ensaio, a detecção de grupos carbonílicos em proteínas envolve a reação do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), o que leva à formação de um produto estável, o dinitrofenil (DNP), quantificado espectrofotometricamente à 370 nm (REZNICK & PACKER, 1994).

O sobrenadantes foram incubados com DNPH 10 mM em HCl 2,5 N ou com apenas HCl 2,5 N (branco da amostra) no escuro durante 1 hora, sendo agitadas em vórtex a cada 15 minutos. Logo em seguida, foi adicionado TCA 20%, deixando em gelo por 10 minutos. Após centrifugação à 9000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol-acetato de etila (1:1) e homogeneizado em vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições para a ressuspensão do *pellet* em guanidina 6 M solubilizada em HCl 2,5 N e aquecimento em banho-maria à 37 °C por 5 minutos. Uma curva padrão de albumina (BSA) foi construída para à quantificação das proteínas presentes à 280 nm. Para determinar a carbonilação foi realizada a leitura na microplaca UV à 370 nm.

### **3.9. Análises histológicas e morfométricas**

Os tecidos coletados para as análises histológicas (fígado e tecido adiposo) foram imediatamente mantidos em formalina 10% e depois por 24 horas em etanol 70%. Posteriormente aos procedimentos de desidratação em álcool etílico, os tecidos foram diafanizados em xilol e emblocados em parafina líquida à 56 °C. Foram feitos cortes de 5 µm para a fixação dos tecidos em lâminas pré-tratadas com gelatina 0,2%. Após hidratação as secções foram imersas em solução de hematoxilina e eosina.

A análise morfológica do fígado e do tecido adiposo epididimal foi realizada em um microscópio óptico e as fotomicrografias obtidas nas objetivas de 10 e 40x, respectivamente. A morfometria do tecido adiposo foi avaliada pelo ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*), medindo-se a área e diâmetro de 25 adipócitos por lâmina.

### **3.10. Avaliação de citocinas inflamatórias**

As concentrações de quatro importantes citocinas inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 MCP-1/CCL-2 foram quantificadas no tecido adiposo epididimal, utilizando kits de ELISA específicos para camundongos, conforme instruções (DuoSet Elisa R&D Systems Europe, Ltd).

Foram pesados 70 mg de tecido adiposo epididimal, sendo o mesmo homogeneizado em solução para extração de citocinas e centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O infranadante foi coletado e utilizado para as análises.

### 3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e erro padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal das amostras. A diferença entre os grupos foi analisada por: i) ANOVA *One-Way* com post test de Tukey para análises paramétricas ou ii) ANOVA *Two-Way*, seguida do post test de Tukey para testes paramétricos e ANOVA *Two-Way*, seguida do post test de Dunn's para testes não-paramétricos . As análises foram realizadas através do *software* prisma (GraphPad Software, San Diego California – EUA), versão 6.0 e o nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Símbolos diferentes significam  $p < 0,05$ .

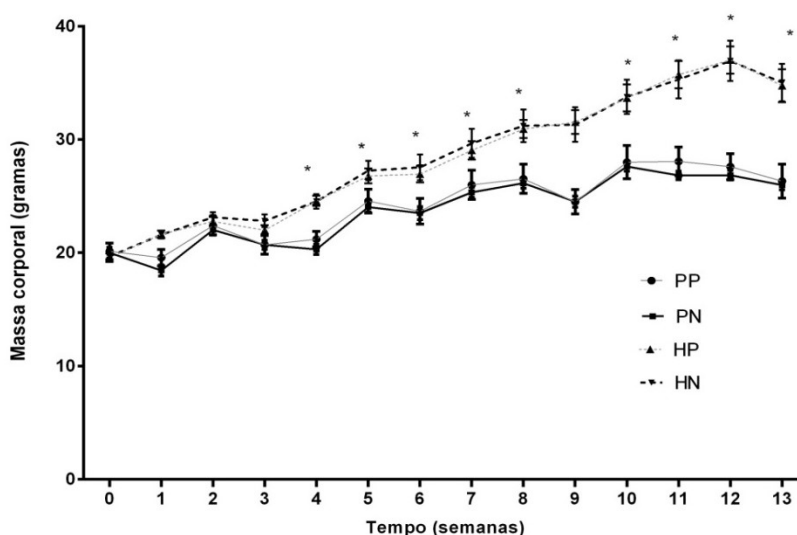
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evolução ponderal e adiposidade

Os camundongos foram disponibilizados pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal com 10 semanas de idade apresentando, em média, massa corporal de  $19,8 \pm 1,15$  gramas.

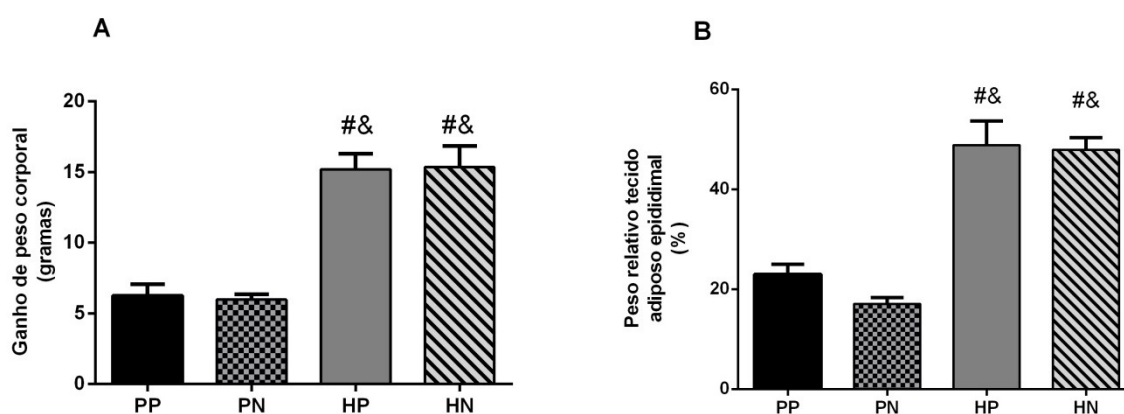
Como já mencionado, a evolução ponderal foi monitorada ao longo do tempo, uma vez por semana. Foi observado que os animais alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram maior massa corporal quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão.

Tal diferença foi significativa a partir da quarta semana nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, independente da suplementação, e manteve-se até o final do experimento (**Figura 4**). Mais especificamente, na semana 4, 5 e 6, os animais do grupo HP e HN apresentaram maior peso em relação ao grupo PN. A partir da semana 8 até o final do experimento, PN continuou apresentando menor massa corporal, diferindo-se dos demais grupos, ao passo que os grupos HP e HN mantiveram o ganho de peso, apresentando maior massa corporal.



**Figura 4:** Evolução ponderal dos camundongos da linhagem C57BL/6 durante treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). Teste ANOVA two-way post-test de Tukey. \*  $p < 0,05$  diferença estatística entre os grupos.

O ganho de peso, obtido pela diferença do peso corporal ao final e ao início do experimento e a adiposidade, isto é, o peso relativo do tecido adiposo epididimal estão expressos na **Figura 5**. Em média, os grupos alimentados com uma dieta rica em lipídeos saturados tiveram ganho de 10 gramas em relação à dieta controle (PP:  $6,25 \pm 0,80$ ; PN:  $5,97 \pm 0,36$ ; HP:  $15,19 \pm 1,10$ ; HN:  $15,35 \pm 1,49$ ) ao final do experimento e aumento da gordura epididimal em cerca de 50%.



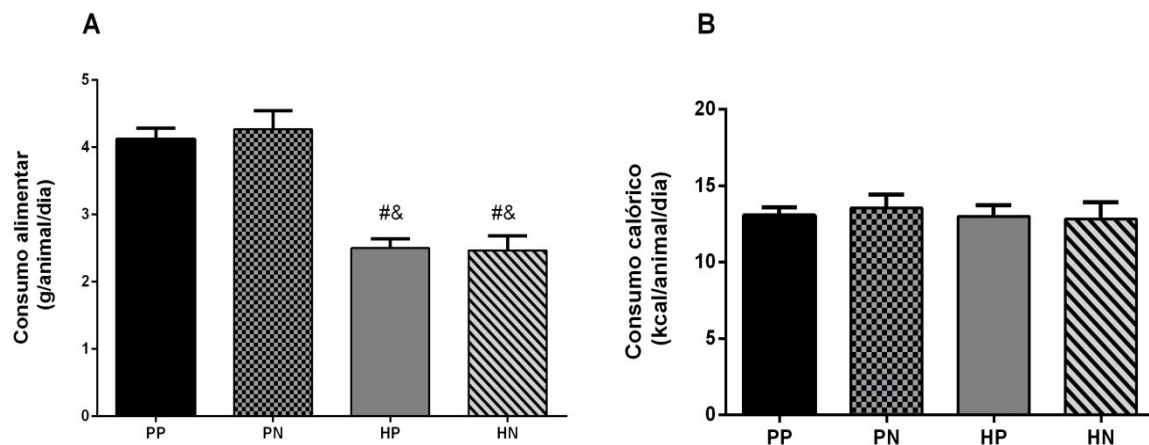
**Figura 5:** (A) Ganho de peso corporal e (B) Adiposidade relativa do tecido adiposo epididimal dos camundongos da linhagem C57BL/6. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

#### 4.2. Consumo alimentar

O consumo alimentar obtido semanalmente foi expresso pela média de gramas consumidas por animal e as calorias correspondentes, como mostra a **Figura 6**. A média da ração consumida em gramas/animal/dia dos grupos PP, PN, HP e HN foram:  $4,11 \pm 0,16$ ;  $4,26 \pm 0,27$ ;  $2,49 \pm 0,14$ ;  $2,46 \pm 0,21$ ; respectivamente.

É possível observar claramente a influência da dieta no estudo em questão, tendo em vista que, embora os animais submetidos a uma dieta hiperlipídica tiveram uma ingestão alimentar menor em comparação àqueles com uma dieta padrão, houve maior ganho de massa nesses grupos. Quanto às calorias ingeridas não foram observadas diferenças entre esses grupos (**Figura 6B**).

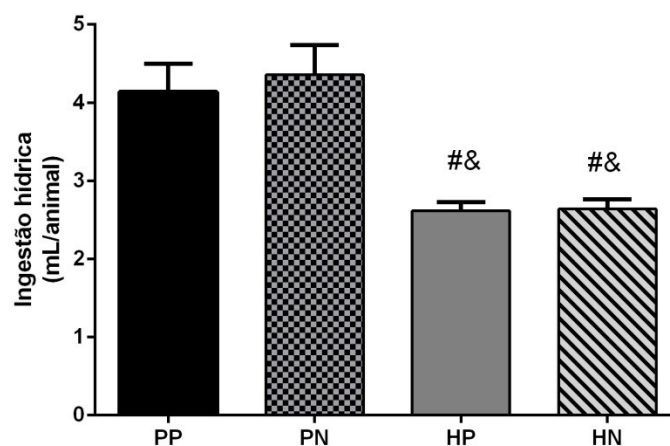




**Figura 6:** Consumo alimentar dos camundongos da linhagem C57BL/6 expresso pela média de gramas (A) e (B) calorias ingeridas por animal. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: (A) ANOVA two-way post-test de Dunn's e (B) ANOVA one-way post-test de Tukey #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

### 4.3. Consumo hídrico

Outro parâmetro também avaliado semanalmente foi a ingestão hídrica em mL/diária/por animal, já que a suplementação foi adicionada à água. A **Figura 7** traz que a média consumida por animal nos grupos que receberam uma dieta padrão foi em torno de 4,2 mL, enquanto nos grupos obesos essa ingestão foi em torno de 2,6 mL, especificamente  $4,13 \pm 0,36$ ;  $4,35 \pm 0,37$ ;  $2,61 \pm 0,11$  e  $2,63 \pm 0,12$  para os animais do grupo PP, PN, HP e HN, respectivamente.



**Figura 7:** Consumo hídrico dos camundongos da linhagem C57BL/6 expresso pela média ingerida por animal, em mililitros. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA two-way post-test de Tukey #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

#### 4.4. Avaliação dos parâmetros de bioquímica sanguínea

##### 4.4.1. Triglicerídeos, Colesterol total e frações de lipoproteínas

Os resultados dos triglicerídeos plasmáticos, colesterol total, colesterol da fração HDL e colesterol não-HDL dos animais durante as treze semanas experimentais estão dispostos na **Tabela 2**.

É possível observar que não houve diferença entre os grupos estudados quanto à concentração de colesterol total e triglicerídeos. Em contrapartida, dentre os grupos alimentados com dieta hiperlipídica, houve aumento na concentração de HDL colesterol no grupo que foi suplementado com nitrato de sódio (HN). Em adição, o grupo HP apresentou os maiores valores de não-HDL colesterol em relação aos grupos de dieta padrão: PP e PN.

**Tabela 2:** Variação do perfil lipídico plasmático, em mg/dL, durante treze semanas experimentais.

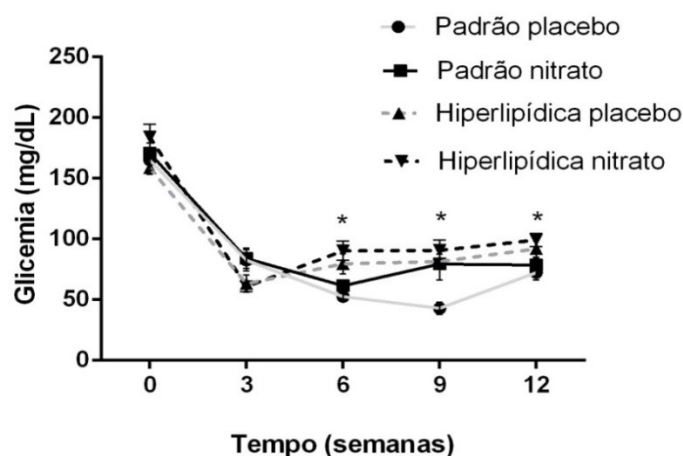
Concentração (mg/mL)	PP	PN	HP	HN	Valor de p
Triglicérides	80,18±19,31	86,63±11,03	65,79±7,71	87,63±13,17	p>0,05
Colesterol total	129,0±31,77	111,6±5,06	137,2±10,55	132,2±8,07	p>0,05
HDL-colesterol	59,43±5,19	51,42±6,85	38,37±7,36	69,93±7,12 \$	p<0,05
não-HDL colesterol	47,34±4,30	56,05±6,38	84,57±9,17 #&	67,18±8,79	p<0,05

Valores expressos como média ± desvio padrão da média (S.E.M). Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média ± erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA two-way post-test de Tukey # p < 0.05 vs PP; & p < 0.05 vs PN; \$ p < 0.05 vs HP.

#### 4.4.2. Homeostase de glicose

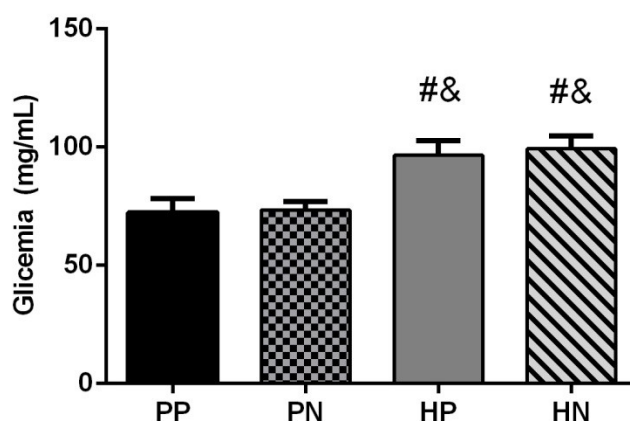
Como já descrito, a glicose sanguínea dos animais foi mensurada a cada três semanas (t = 0, 3, 6, 9 e 12). Os valores de glicemia durante todos esses tempos estão expostos na **Figura 8**.

Nota-se que os grupos não diferiram entre si durante as três primeiras semanas de dieta e suplementação. No entanto, na 6ª semana, o grupo HN apresentou maior valor glicêmico em comparação ao PN e ao HP. Na Semana 9, o grupo padrão placebo apresentou a menor glicemia em relação a todos os outros grupos. Por fim, na 12ª semana o grupo alimentado com dieta hiperlipídica concomitante à suplementação de nitrato apresentou glicose elevada quando comparada ao grupo PP.



**Figura 8:** Glicemia dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao longo das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA two-way post-test de Dunn's. \*  $p < 0.05$  diferença estatística entre os grupos.

A glicemia ao final do experimento aumentou nos grupos de animais que consumiram a dieta hiperlipídica (**Figura 9**). O gráfico nos mostra claramente que a suplementação de nitrato não alterou a glicemia, havendo apenas interferência da dieta. Os valores de glicose no sangue foram:  $72,30 \pm 5,97$  mg/mL para o grupo PP;  $73,43 \pm 3,57$  para o grupo PN;  $96,50 \pm 6,21$  para os animais do grupo HP e  $99,25 \pm 5,44$ .

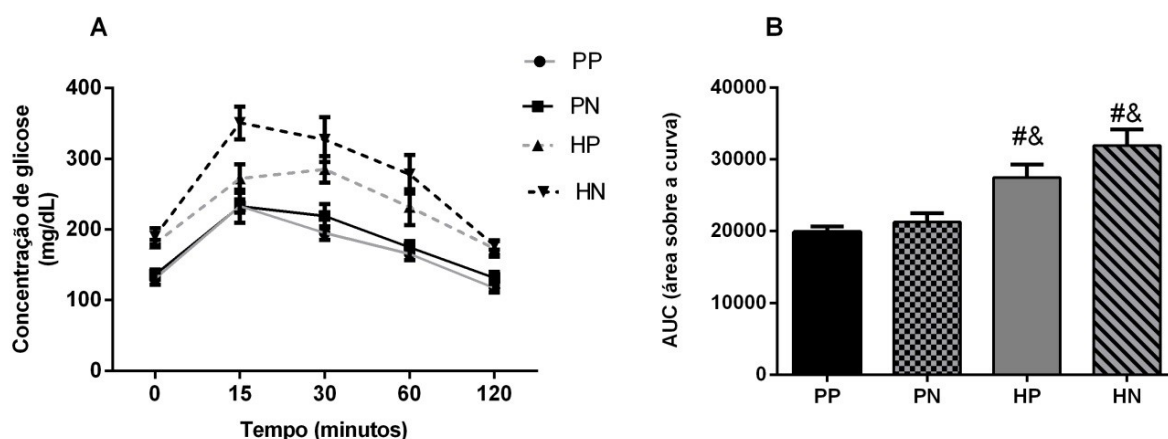


**Figura 9:** Glicemia final dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

#### 4.4.3. Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose foi realizado na semana anterior à eutanásia dos animais. Trata-se de um teste relevante para a compreensão dos efeitos da dieta e/ou suplementação na resistência à insulina.

A **Figura 10A** representa os valores glicêmicos no decorrer do tempo. É perceptível que os animais alimentados com uma dieta de alto teor de gordura saturada são intolerantes à glicose, já que apresentam glicemia elevada durante todo o teste (igual ou maior que 200 mg/dL), inclusive após 2 horas da ingestão da solução de açúcar.



**Figura 10:** (A) Teste de tolerância oral à glicose realizado nos camundongos da linhagem C57BL/6. (B) Área sobre a curva do teste de tolerância oral à glicose realizado nos camundongos da linhagem C57BL/6. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Teste: (A) ANOVA two-way post-test de Tukey e (B) ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.

Por meio do gráfico obtido pela concentração de glicose *versus* o tempo decorrido no TOTG, pôde-se calcular a área sobre a curva (**Figura 10B**), a qual apresentou os seguintes resultados: média de  $19892 \pm 758,6$  para o grupo PP;  $21253 \pm 1280$  para o PN;  $27466 \pm 1825$  para o HP e  $31905 \pm 2271$  para o grupo HN. Igualmente ao que ocorreu nas medições da glicose sanguínea durante as treze

semanas experimentais, nota-se que apenas a dieta foi critério de diferença quanto à sensibilidade a insulina.

#### 4.5. Lipídeos fecais e hepáticos

As fezes, coletadas a cada duas semanas, e uma fração do fígado, coletado no momento da eutanásia, foram destinados à extração de lipídeos totais pelo método de Folch, como já mencionado. Os resultados estão expostos na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Extração de lipídeos fecais e hepáticos, em mg, durante e ao final das treze semanas experimentais.

	PP	PN	HP	HN	Valor de p
<b>Lipídeos fecais (mg)</b>	2,33±0,42	1,11±0,31 #	2,99±0,45 &	2,98±0,58 &	p<0,05
<b>Lipídeos hepáticos (mg)</b>	8,00±0,50	7,05±0,42	11,50±0,50 #&	7,93±0,44 \$	p<0,05

Valores expressos como média ± desvio padrão da média (S.E.M). Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média ± erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA two-way post-test de Tukey e ANOVA one-way post-test de Tukey. # p < 0.05 vs PP; & p < 0.05 vs PN; \$ p < 0.05 vs HP.

Estatisticamente, o grupo de animais alimentados com dieta padrão e suplementados com nitrato de sódio apresentou menor quantidade de lipídeos fecais em relação aos demais grupos.

Em adição, nota-se que o grupo HP apresentou maior quantidade lipídeos no fígado, em comparação aos demais grupos. Esse resultado traz uma relevância da suplementação, visto que a mesma diminuiu os níveis de lipídeos totais no fígado mesmo em condições de dieta hiperlipídica.

#### 4.5.1. Dosagem de colesterol e triglicerídeos fecais e hepáticos

A partir da extração dos lipídeos pelo ensaio de Folch foi possível dosar o conteúdo de colesterol total e triglicerídeos presentes nas fezes e no fígado, como representado na **Tabela 4**. Embora tenha sido notada diferença na quantificação de lipídeos totais, os resultados de colesterol e triglicérideos não diferiram entre os grupos.

**Tabela 4:** Conteúdo de colesterol total e triglicerídeos fecais e hepáticos, em mg/g, durante e ao final das treze semanas experimentais.

	PP	PN	HP	HN	Valor de p
<b>Colesterol total fecal (mg/g fezes)</b>	3,05±0,40	2,37±0,36	3,92±0,29	4,19±0,83	p>0,05
<b>Triglicerídeos fecal (mg/g fezes)</b>	2,98±0,10	2,76±0,52	3,17±0,56	3,57±0,68	p>0,05
<b>Colesterol total hepático (mg/g tecido)</b>	2,88±0,13	2,62±0,10	3,44±0,65	2,78±0,15	p>0,05
<b>Triglicerídeos hepático (mg/g tecido)</b>	14,170±0,675	11,690±1,114	13,540±1,149	10,990±0,734	p>0,05

Valores expressos como média ± desvio padrão da média (S.E.M). Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média ± erro padrão da média (S.E.M). Teste: ANOVA one-way post-test de Tukey.

#### 4.6. Biomarcadores do estresse oxidativo

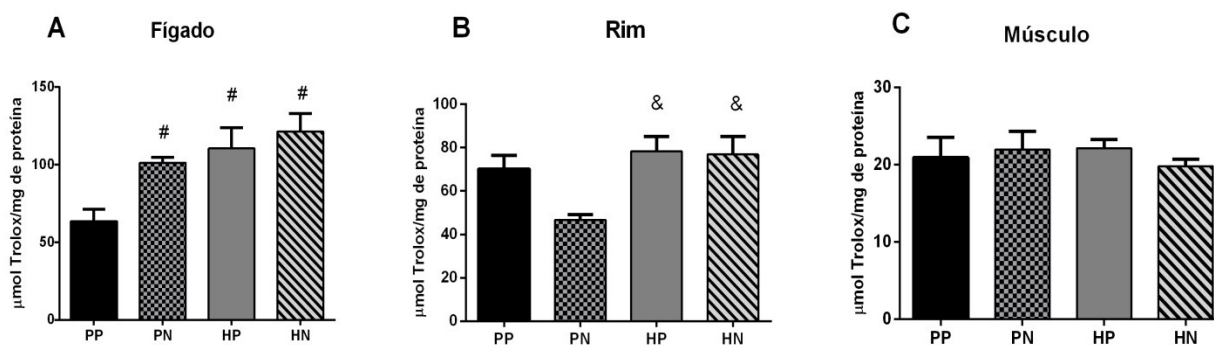
##### 4.6.1. Avaliação do potencial antioxidante

#### 4.6.1.1. FRAP

Os resultados mostram maior capacidade antioxidante total no fígado dos animais da dieta padrão tratados com nitrato ( $101,3 \pm 3,41 \mu\text{mol}$  de equivalente ao trolox) e, curiosamente, também dos animais da dieta hiperlipídica em relação à dieta padrão sem diferença entre os grupo de animais suplementados com nitrato (HP:  $110,5 \pm 13,30$  e HN:  $121,4 \pm 11,65 \mu\text{mol}$  de equivalente ao trolox).

No rim foi observado uma menor capacidade antioxidante total nos animais da dieta padrão ( $46,69 \pm 2,55 \mu\text{mol}$ ) que receberam nitrato e uma maior capacidade antioxidante total nos rins dos animais da dieta hiperlipídica ( $78,27 \pm 6,96 \mu\text{mol}$  para o HP e  $76,89 \pm 8,25 \mu\text{mol}$  para o HN).

No músculo gastrocnêmio, a capacidade antioxidante total não diferiu entre os grupos estudados, independente da dieta e da suplementação ofertada. As médias, em  $\mu\text{mol}$  de equivalente ao trolox, foram:  $20,92 \pm 0,839$  para o grupo PP,  $21,95 \pm 0,908$  para o grupo PN,  $22,14 \pm 0,518$  para o HP e  $19,82 \pm 0,316$  para o HN.



**Figura 11:** Capacidade antioxidante total (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

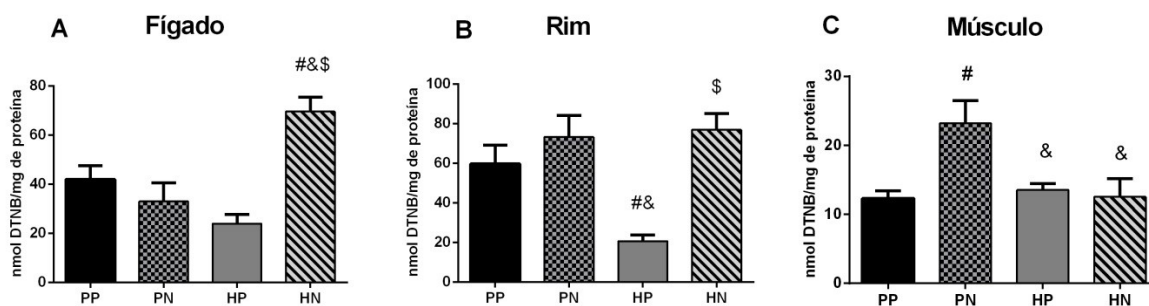


#### 4.6.1.2. Sulfidrilas totais

O conteúdo hepático de sulfidrilas no grupo suplementado com uma dieta hiperlipídica mais nitrato mostrou-se surpreendentemente maior, com média de  $69,56 \pm 5,85$  nmolDTNB/mg de proteína. Os demais grupos não diferiram entre si, apresentando uma média de  $41,87 \pm 5,57$  para o PP;  $32,99 \pm 7,60$  para o grupo PN e  $23,87 \pm 3,81$  nmol para o HP.

No rim, não houve diferença na concentração de sulfidrilas totais entre os grupos PP ( $59,72 \pm 9,57$ ), PN ( $73,27 \pm 10,86$ ) e HN ( $76,92 \pm 8,26$ ), no entanto o grupo HP apresentou o menor conteúdo de sulfirilas ( $20,67 \pm 3,04$ ), como ilustrado na **Figura 12**.

No músculo gastrocnêmio, os níveis de sulfidrilas totais aumentaram com a suplementação de nitrato nos animais alimentados com uma dieta padrão. Dessa forma, houve diferença em relação ao controle não suplementado ( $12,31 \pm 1,107$  para o PP vs  $23,21 \pm 3,314$  para o PN) e ainda em relação aos animais obesos (HP:  $13,54 \pm 0,947$  e HN:  $12,54 \pm 2,636$ ).



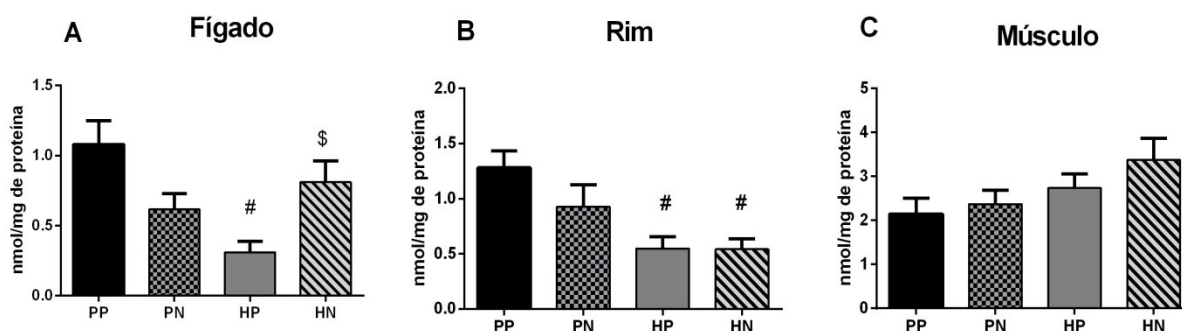
**Figura 12:** Conteúdo de sulfidrilas totais (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.

#### 4.6.1.3. Glutaciona reduzida

Os valores médios da glutaciona reduzida no fígado foram:  $1,079 \pm 0,170$  (PP),  $0,616 \pm 0,113$  (PN),  $0,309 \pm 0,079$  (HP) e  $0,8109 \pm 0,151$  nmol/mg de proteína (HN). Esses dados revelam que o grupo HP apresentou níveis menores de GSH, diferenciando estatisticamente com os grupos PP e HN, como ilustrado na **Figura 13**.

A GSH renal foi claramente menor nos animais alimentados com uma dieta hiperlipídica, independente da suplementação, em comparação ao grupo PP. Os resultados para os grupos PP, PN, HP e HN foram respectivamente  $1,281 \pm 0,154$ ;  $0,927 \pm 0,200$ ;  $0,549 \pm 0,106$ ;  $0,542 \pm 0,095$  nmol/mg.

Já no músculo gastrocnêmio, os valores da GSH foram:  $2,150 \pm 0,350$  para o PP,  $2,373 \pm 0,315$  para o PN,  $2,740 \pm 0,315$  para o HP e  $3,378 \pm 0,486$  nmol/mg para o HN. Esses resultados não evidenciaram significância estatística entre os grupos.



**Figura 13:** Concentração de glutaciona reduzida (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; \$  $p < 0.05$  vs HP.

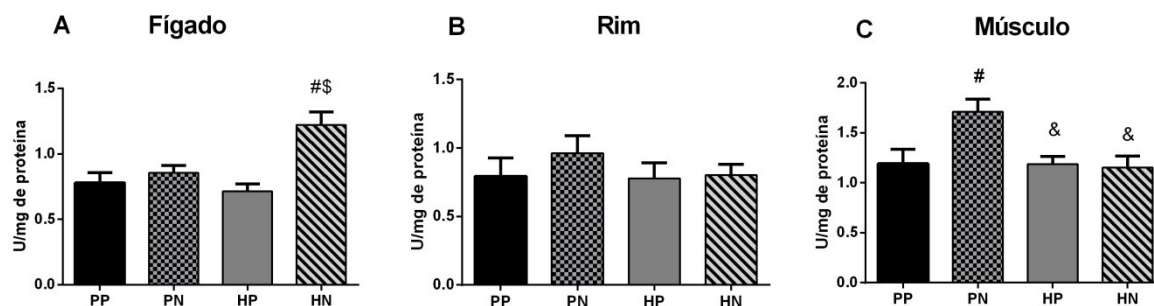
## 4.6.2. Avaliação de enzimas antioxidantes

### 4.6.2.1. Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase hepática foi elevada nos animais do grupo HN, com média de  $1,221 \pm 0,097$ . No entanto, a estatística não o diferiu entre todos os outros grupos, mas apenas, em relação aos placebos, sendo os valores das médias de  $0,780 \pm 0,078$  para o grupo PP,  $0,856 \pm 0,056$  para o PN e  $0,7142 \pm 0,057$  para o HP (**Figura 14**).

No rim, a atividade da SOD não mostrou alterações entre os grupos. Os valores médios, expressos em U/mg de proteína, foram  $0,792 \pm 0,134$  para o PP,  $0,963 \pm 0,127$  para o PN,  $0,778 \pm 0,113$  para o HP e  $0,803 \pm 0,075$  para HN.

Por fim, no músculo gastrocnêmio a SOD aumentou no grupo padrão nitrato ( $1,712 \pm 0,123$ ) em relação ao seu controle placebo ( $1,190 \pm 0,146$ ). Além disso, ambos os grupos que receberam uma dieta hiperlipídica tiveram uma redução da atividade enzimática (HP =  $1,188 \pm 0,073$  e HN =  $1,154 \pm 0,114$ ).



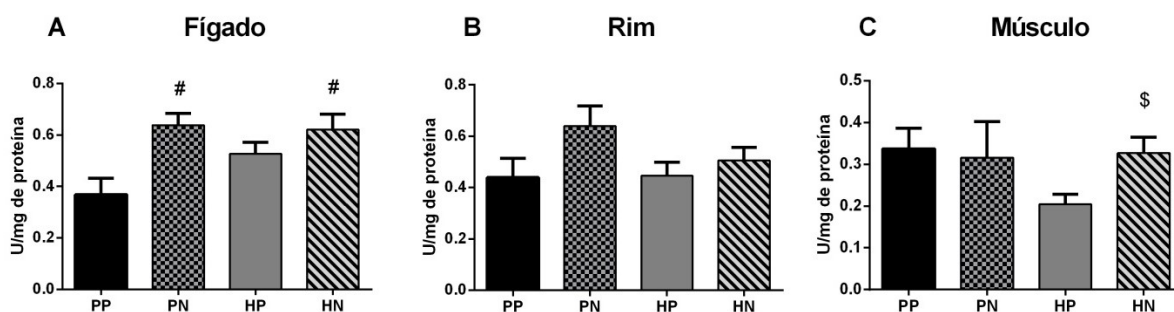
**Figura 14:** Atividade da superóxido dismutase (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0,05$  vs PP; &  $P < 0,05$  vs PN; \$  $p < 0,05$  vs HP.

#### 4.6.2.2. Catalase

A atividade da catalase, expressa em U/mg de proteína, foi maior em ambos os grupos suplementados com nitrato (PN:  $0,638 \pm 0,045$  e HN:  $0,621 \pm 0,059$ ), mostrando resultados significativos em relação ao grupo padrão placebo ( $0,368 \pm 0,063$ ). No entanto, não houve diferença entre os grupos suplementados e o HP ( $0,526 \pm 0,045$ ), como representado na **Figura 15**.

A catalase não se alterou no tecido renal com a dieta e a suplementação. O grupo PP apresentou média de  $0,439 \pm 0,074$ ; o grupo PN de  $0,639 \pm 0,078$ ;  $0,446 \pm 0,051$  para o HP e para o HN  $0,505 \pm 0,051$ .

Em relação à atividade da catalase muscular, não houve diferença quanto à suplementação com a oferta de uma dieta padrão (PP =  $0,337 \pm 0,048$  e PN =  $0,316 \pm 0,085$ ). Em contrapartida, a suplementação concomitante a ingestão de uma dieta rica em lipídeos propiciou aumento da atividade enzimática quando comparação ao seu placebo (HP =  $0,204 \pm 0,024$  e HN =  $0,326 \pm 0,038$ ).



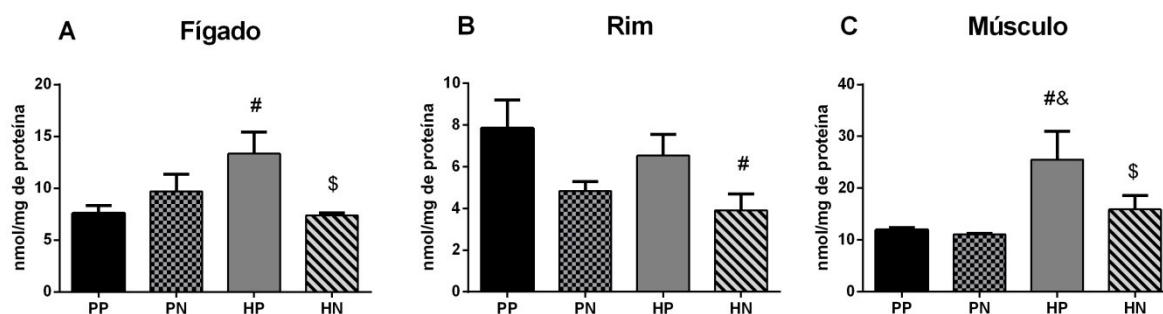
**Figura 15:** Atividade da catalase (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0,05$  vs PP; \$  $p < 0,05$  vs HP.

### 4.6.3. Indicadores de dano oxidativo

#### 4.6.3.1. Carbonilação de proteínas

Quanto ao teor de proteína carbonilada hepática, uma avaliação de dano protéico, não houve diferença entre os grupos cuja alimentação foi normocalórica, com média de  $7,572 \pm 0,754$  nmol/mg de proteína para o PP e  $9,686 \pm 1,674$  para o PN. No entanto, o grupo ofertado com uma dieta rica em lipídeos sem suplementação apresentou maior dano protéico, com média de  $13,340 \pm 2,070$ , mostrando diferença estatística com o PP e com o grupo dieta hiperlipídica suplementado ( $7,374 \pm 0,241$ ), **Figura 16**.

A avaliação de proteína carbonilada renal não mostrou variação entre os grupos PP ( $7,850 \pm 1,363$ ), PN ( $4,841 \pm 0,449$ ) e HP ( $6,541 \pm 1,024$ ). Entretanto a suplementação de nitrato concomitante a ingestão de uma dieta hipercalórica reduziu a carbonilação proteica quando comparada ao grupo PP ( $3,916 \pm 0,792$ ). Dentre os grupos estudados, àquele que apresentou maiores níveis de proteína carbonilada no músculo foi o HP, com média de  $25,51 \pm 5,511$  nmol/mg de proteína. Esse valor mostrou-se estatisticamente elevado em relação aos grupos alimentados com uma dieta padrão (PP =  $11,92 \pm 0,466$  e PN =  $11,09 \pm 0,183$ ) e ao grupo com dieta hiperlipídica nitrato (HN =  $15,92 \pm 2,717$ ).



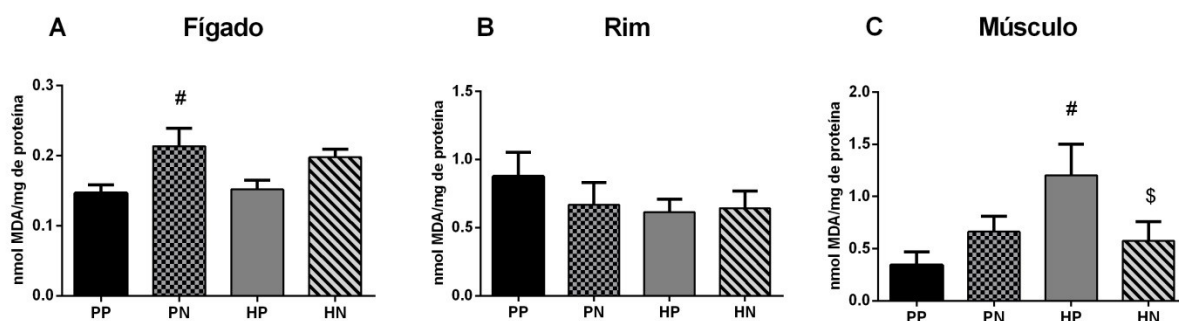
**Figura 16:** Teor de proteína carbonilada (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0,05$  vs PP; &  $p < 0,05$  vs PN; \$  $p < 0,05$  vs HP.

#### 4.6.3.2. Peroxidação lipídica

Em relação ao ensaio de dano lipídico hepático pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi observado que o grupo com maior média foi o PN ( $0,213 \pm 0,025$ ), mas diferiu apenas com o grupo PP ( $0,146 \pm 0,011$ ). Os grupos HP ( $0,151 \pm 0,013$ ) e HN ( $0,197 \pm 0,011$ ) não divergiram entre si e nem mesmo com os demais grupos analisados, como representado na **Figura 17**.

A quantificação de TBARS no rim não revelou diferença relacionada à dieta tampouco com a suplementação. As médias dos animais nos grupos PP, PN, HP e HN foram nessa ordem:  $0,876 \pm 0,176$ ;  $0,669 \pm 0,162$ ;  $0,614 \pm 0,096$  e  $0,643 \pm 0,124$  nmol.

A peroxidação lipídica muscular mostrou-se maior no grupo HP ( $1,203 \pm 0,296$ ) em detrimento do grupo PP ( $0,345 \pm 0,043$ ) e do HN ( $0,575 \pm 0,064$ ), mas não diferiu dos animais suplementados com nitrato e dieta controle ( $0,661 \pm 0,056$ ).



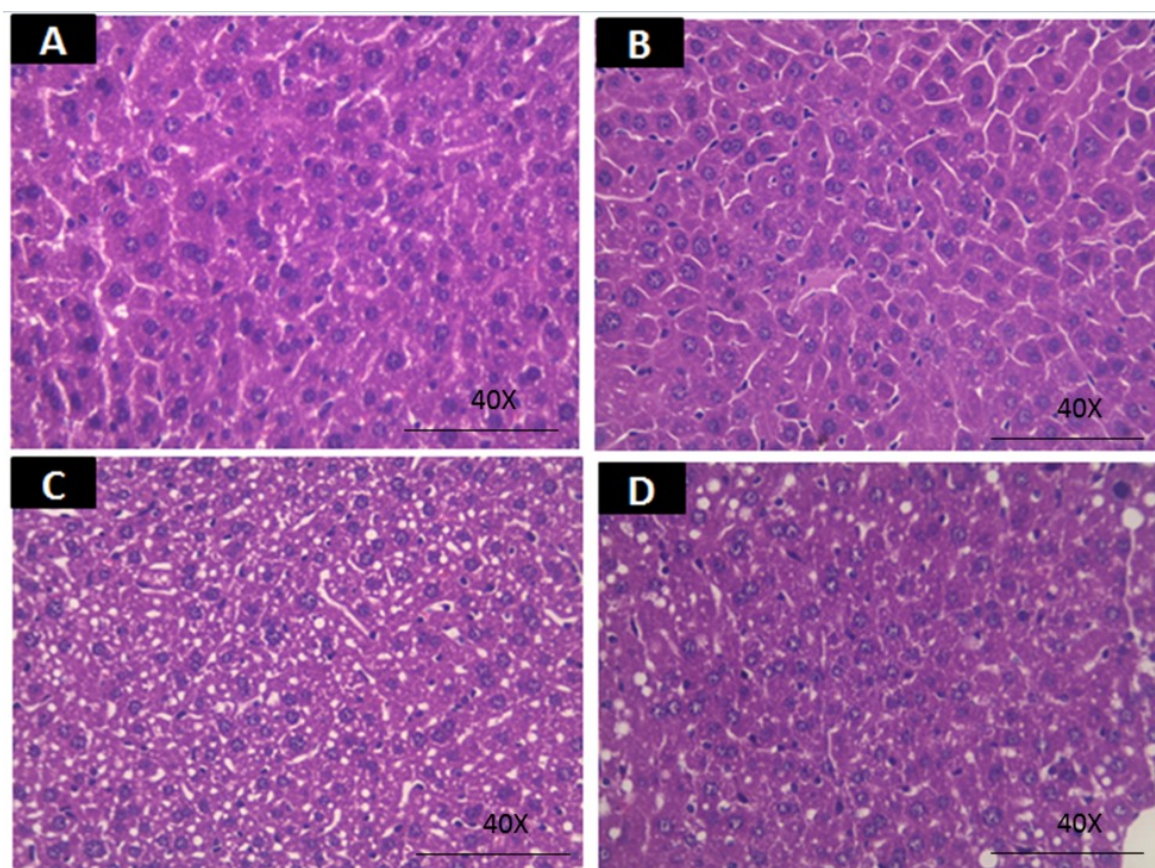
**Figura 17:** Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (A) hepática, (B) renal e (C) muscular dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0,05$  vs PP; &  $p < 0,05$  vs PN; \$  $p < 0,05$  vs HP.

## 4.7. Análises histológicas

### 4.7.1. Análise histológica do fígado

No intuito de relacionar o perfil lipídico com possíveis alterações morfológicas no fígado, foram realizadas lâminas histológicas hepáticas de cada grupo experimental.

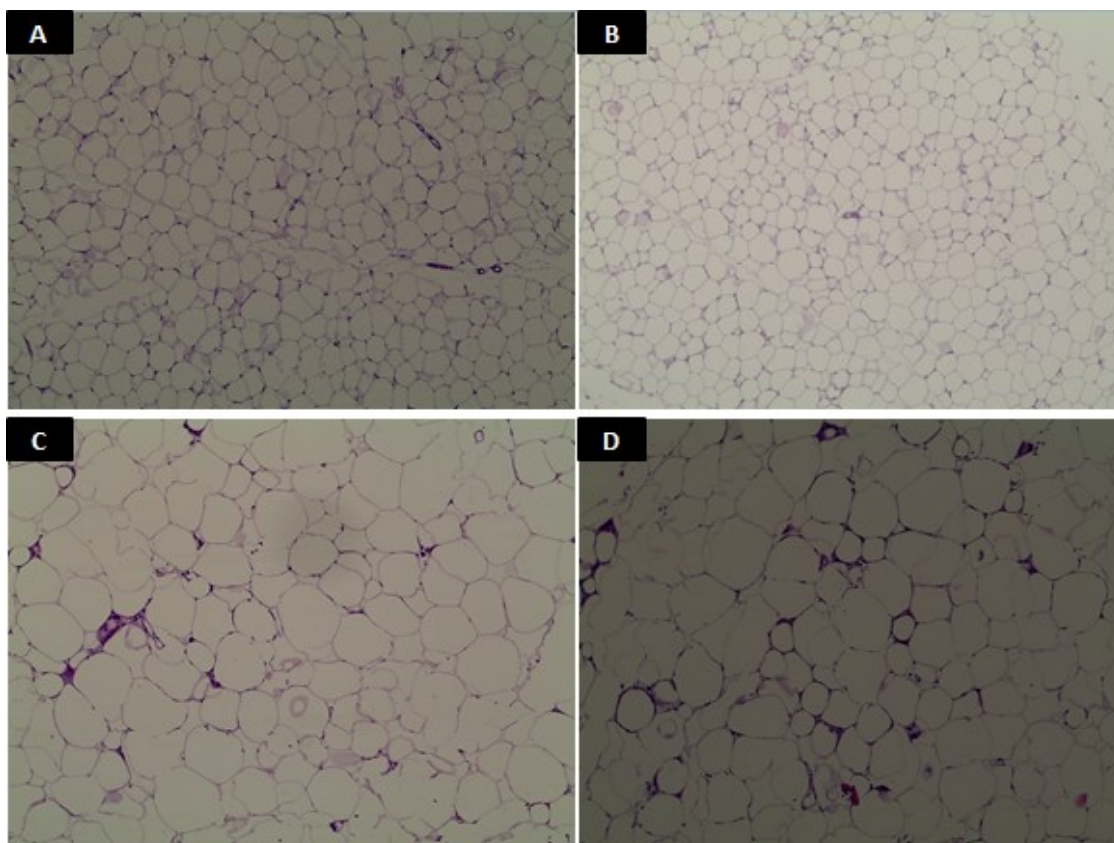
As células hepáticas dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e não suplementados (grupo HP) mostraram maior depósito de gordura, o que é compatível com o aumento do conteúdo lipídico mostrado anteriormente (Tabela 3). Todavia, a administração de nitrato inorgânico no grupo HN visivelmente reduziu o conteúdo lipídico (**Figura 18**), o que também concorda com os resultados expostos na Tabela 3.



**Figura 18:** Alterações histopatológicas no fígado. Fotografia representativa da coloração de H & E (objetiva 40 x) de seções de fígado de cada grupo de animais: (A) PP Dieta padrão placebo, (B) PN Dieta padrão nitrato, (C) HP Dieta hiperlipídica placebo (D) HN Dieta hiperlipídica nitrato após treze semanas experimentais.

#### 4.7.2. Análise histológica e morfométrica do tecido adiposo epididimal

As fotomicrografias do tecido adiposo epididimal mostram claramente a hipertrofia dos adipócitos frente a uma dieta rica em lipídeos em relação a uma dieta normocalórica (**Figura 19**).

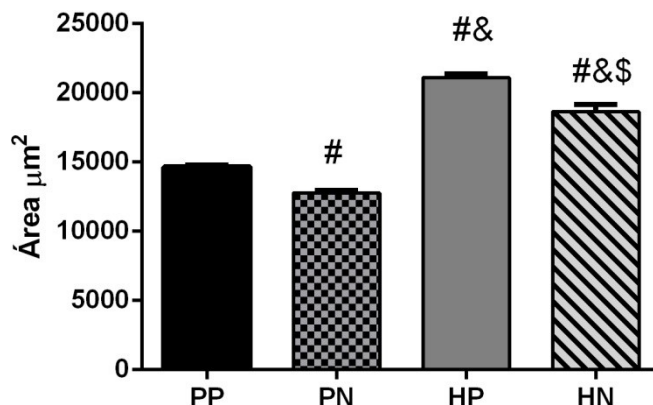


**Figura 19:** Histologia dos adipócitos. Fotografia representativa da coloração de H & E (magnitude 10 x) de seções do tecido adiposo epididimal de cada grupo de animais: (A) PP Dieta padrão placebo, (B) PN Dieta padrão nitrato, (C) HP Dieta hiperlipídica placebo (D) HN Dieta hiperlipídica nitrato após treze semanas experimentais.

A média das área do adipócitos dos grupos foi de  $14658 \pm 136,9$  para o grupo PP;  $12787 \pm 191,1$  para o PN,  $21108 \pm 248,2$  para o HP e  $18660 \pm 497,0$  para o HN. Esses resultados mostram claramente o papel de uma dieta rica em lipídeos no aumento do tamanho dos adipócitos. Todavia, surpreendentemente, o nitrato



inorgânico foi capaz de reduzir a área dos adipócitos não apenas na dieta hiperlipídica como também na dieta controle.



**Figura 20:** Área dos adipócitos dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN; \$  $p < 0.05$  vs HP.

#### 4.8. Avaliação de citocinas inflamatórias

Quatro citocinas inflamatórias foram determinadas no tecido adiposo epididimal: TNF- $\alpha$ , MCP-1/CCL-2, IL-6 e IL-10 (**Figura 21**).

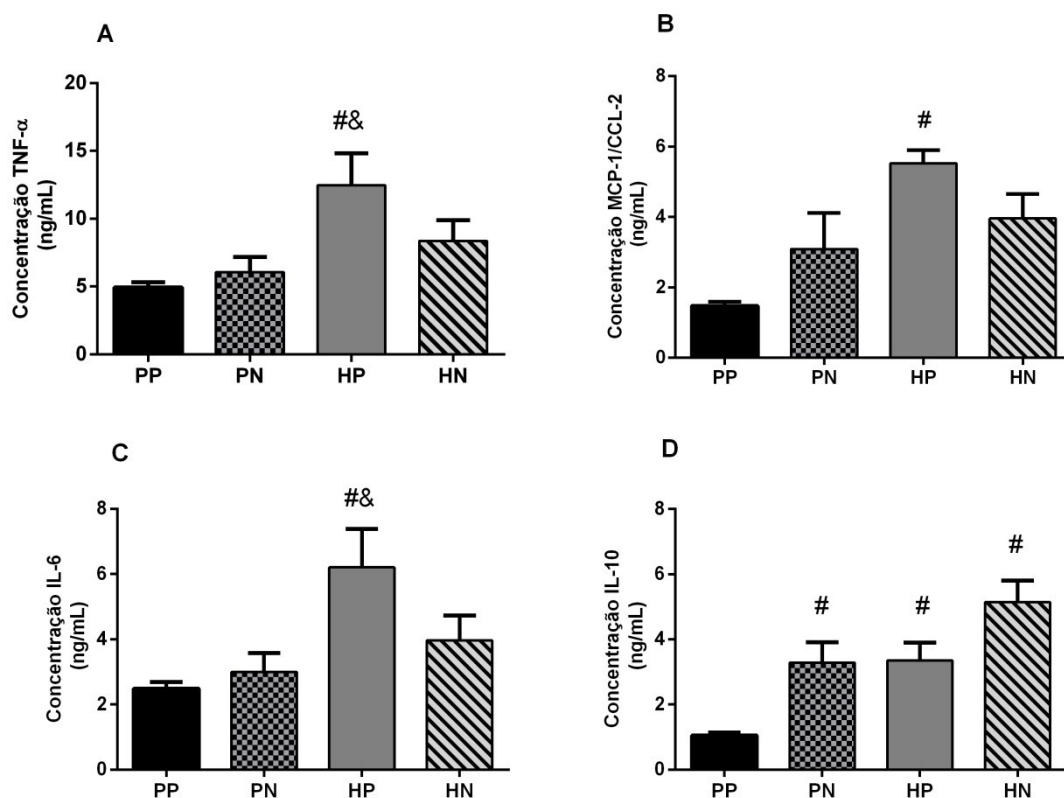
A concentração de TNF- $\alpha$  foi maiores no grupo HP, apresentando média de  $12,46 \pm 2,34$  ng/mL. Esse grupo foi estatisticamente diferente daqueles que receberam dieta padrão (PP:  $4,92 \pm 0,40$  e PN:  $6,06 \pm 1,11$ ), mas não do grupo HN ( $8,35 \pm 1,51$ ), mostrando que o nitrato não interferiu na concentração dessa citocina.

Quanto à dosagem de MCP-1/CCL-2, aqueles animais tratados com uma dieta rica em lipídeos e não suplementados apresentaram maiores valores da citocina (HP:  $5,52 \pm 0,37$  ng/mL), mas diferindo apenas do seu grupo controle não suplementado (PP:  $1,48 \pm 0,10$ ). Padrão nitrato e hiperlipídica nitrato tiveram média de  $3,08 \pm 1,03$  e  $3,96 \pm 0,69$ , respectivamente.

Igualmente ao TNF- $\alpha$ , a concentração de IL-6 foi maior com a dieta do grupo hiperlipídica placebo (HP:  $6,20 \pm 1,18$ ) quando comparada aos grupos PP ( $2,49 \pm$

0,20) e PN ( $3,00 \pm 0,57$ ), mas não houve interferência do nitrato quando administrado com a dieta hiperlipídica (grupo HN:  $3,97 \pm 0,75$ ).

Por fim, a citocina IL-10 apresentou a menor concentração no animais do grupo PP ( $1,05 \pm 0,09$  ng/mL) em detrimento dos demais grupos. Neste caso, tanto a suplementação na dieta padrão (PN:  $3,28 \pm 0,63$ ) como a administração de uma dieta com alto teor de gordura saturada (HP:  $3,34 \pm 0,54$  e HN:  $5,14 \pm 0,66$ ) permitiram um aumento dessa citocina no tecido adiposo.



**Figura 21:** Quantificação de citocinas inflamatórias do tecido adiposo epididimal dos camundongos da linhagem C57BL/6 ao final das treze semanas experimentais. (A) TNF- $\alpha$ , (B) MCP-1/CCL-2, (C) IL-6 e (D) IL-10. Dieta padrão placebo (PP); Dieta padrão nitrato (PN); Dieta hiperlipídica placebo (HP); Dieta hiperlipídica nitrato (HN). Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). ANOVA one-way post-test de Tukey. #  $p < 0.05$  vs PP; &  $p < 0.05$  vs PN.

## 5. Discussão

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura não apenas no tecido adiposo, mas também nos tecidos periféricos. Em geral, o desenvolvimento da obesidade relaciona-se à alta ingestão calórica combinada ao baixo gasto energético, o que leva ao acúmulo da gordura (RUPÉREZ *et al.*, 2014).

Neste contexto, o aumento do consumo de dietas hipercalóricas na sociedade atual, especialmente ricas em lipídeos saturados e carboidratos simples, têm sido associado ao desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica (ALEMANY, 2013).

O excedente calórico é armazenado no tecido adiposo branco na forma de triacilgliceróis. Em longo prazo, o acúmulo de gordura no tecido adiposo é acompanhado de inflamação, hipoxia e estresse oxidativo, que por sua vez pode contribuir para o desenvolvimento de outras doenças, tais como dislipidemia, hipertensão, aterosclerose, resistência insulínica, diabetes, entre outros (RUPÉREZ *et al.*, 2014).

Vale lembrar que o tecido adiposo branco (TAB) é considerado um órgão endócrino, tendo em vista que produz uma variedade de moléculas, incluindo adipocinas, como adiponectina e leptina, as quais controlam a massa de gordura e o apetite, e citocinas, como o TNF- $\alpha$  e interleucinas. Além disso, o TAB está diretamente envolvido na sensibilidade à insulina e ainda, no controle de processos inflamatórios. Na obesidade, o TAB sofre alterações, o que causa modificação do perfil de secreção das adipocitocinas, afetando diretamente outros tecidos (BALISTRERI, *et al.*, 2010).

A inflamação contínua no TAB decorrente do aumento de depósito de gordura leva a infiltração de células de defesa, em particular de macrófagos, a fim de conter o adipócito hipertrofiado e o desbalanço de adipocitocinas produzidas e reestabelecer a homeostase tecidual. No entanto, o insucesso do sistema imune em reverter essa “agressão” no tecido adiposo desencadeia um ciclo vicioso, caracterizado por um estado inflamatório crônico de baixo grau (ALEMANY, 2013).

O interesse científico tem sido constante na tentativa de remediar e até mesmo curar doenças metabólicas. Com isso, os efeitos do nitrato dietético ou

inorgânico sobre parâmetros associados à obesidade tem possibilitado nova vertente nas pesquisas.

Embora outros trabalhos da literatura mostrem que a ingestão de nitrato inibe o ganho de peso (CARLSTROM *et al.*, 2010; EL-WAKF *et al.*, 2015; OĞUR *et al.*, 2000), no nosso trabalho, a suplementação de nitrato, ao longo das 13 semanas experimentais, não alterou a massa corporal e o ganho de peso quando comparados aos controles (Figuras 4 e 5). Em consonância aos nossos achados, Hezel e colaboradores (2015), também não encontraram diferenças no peso médio de camundongos suplementados com nitrato durante 17 meses quando comparados com os seus respectivos controles. Em modelo de camundongos C57BL/6 nocauteados para apoE e tratados com dieta hiperlipídica, os autores não encontraram diferença na massa corporal entre os grupos suplementados ou não suplementados com o nitrato (BAKKER *et al.*, 2016). Camundongos nocauteados para o receptor de LDL que receberam dieta ocidental e administração de nitrato durante 14 semanas, também não exibiram mudança no massa corporal em relação aos grupos não suplementados (MARSCH *et al.*, 2016).

A suplementação concomitante ao desenvolvimento da obesidade também não alterou a adiposidade em relação aos controles não suplementados, diferindo de estudos cuja administração de nitrato inorgânico ocorreu após um período de adaptação à dieta (CARLSTROM *et al.*, 2010). A administração de 1 mM de nitrato inorgânico durante 17 meses não alterou a composição de massa magra e gordura, nem mesmo o peso do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta padrão (HEZEL *et al.*, 2015).

O consumo alimentar, dado em gramas/dia/animal, durante as treze semanas experimentais, foi maior nos grupos de dieta padrão – em torno de 4 gramas – em comparação àqueles com oferta de uma dieta hiperlipídica – em torno de 2,4 gramas. Entretanto, como a densidade calórica da dieta enriquecida com gordura saturada é maior, notou-se que a ingestão em kcal/dia/animal foi similar entre os grupos.

O consumo hídrico, em mL/animal/dia, foi quase duas vezes menor nos grupos que receberam a dieta indutora de obesidade, independente da ingestão ou não de nitrato de sódio. Esse dados sugerem que a dieta hiperlipídica, por si só, alterou a ingestão hídrica dos animais obesos em relação aos eutróficos.

Em ratos Wistar tratados com diferentes doses de nitrato (0,35 mM, 0,7 mM e 1,4 mM) durante 18 dias não houve alteração nem no consumo alimentar nem mesmo no consumo hídrico em relação aos animais não tratados (ASHMORE *et al.*, 2015). O mesmo foi constatado no estudo de Peleli e colaboradores (2016) com camundongos selvagens e nocauteados para óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

Sabe-se que a biodisponibilidade de óxido nítrico é diminuída em modelos animais de obesidade induzida por dieta e em pacientes obesos e resistentes à insulina (GRUBER *et al.*, 2008; SANSBURY & HILL, 2014). Alternativamente, o aumento da produção de NO $\cdot$  tem mostrado efeitos interessantes sobre a obesidade e resistência insulínica.

Neste trabalho, foi observado aumento da glicemia decorrente da dieta enriquecida com banha de porco em comparação aos grupos que receberam a dieta normocalórica. Entretanto, a suplementação com nitrato inorgânico durante o processo de desenvolvimento da obesidade não possibilitou melhora nos valores glicêmicos. Em alguns estudos, a intervenção de nitrato após algumas semanas de ingestão de dieta hipercalórica, melhorou a sensibilidade à insulina e a captação de glicose pela ativação do transportador de glicose 4 (GLUT4) *in vivo* (OHTAKE *et al.*, 2015), o que também já havia sido visto em análises *in vitro* (JIANG *et al.*, 2014). Além disso, Peleli e colaboradores evidenciaram que a suplementação aguda de nitrato inorgânico melhorou a depuração de glicose em camundongos selvagens tratados com uma dieta de alto teor lipídico.

Segundo Li e colaboradores (2016), a administração dose-dependente de nitrato em camundongos *Swiss* também resultou melhoras na homeostase de glicose e insulina. Em ratos machos obesos e diabéticos, a administração de nitrito durante oito semanas aumentou a produção e secreção de insulina e, por consequência, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (GHEIBI *et al.*, 2017). No entanto, Ashor e colaboradores (2016) apresentaram outra abordagem em humanos, demonstrando que a suplementação oral de nitrato inorgânico não melhorou as respostas de glicose e insulina em indivíduos obesos jovens e idosos.

A administração de nitrato inorgânico em roedores tem mostrado resultados satisfatórios no perfil dos lipídeos circulantes, à medida que reduz processos

dislipidêmicos provocados por dieta hipercalórica, restaurando a homeostase lipídica (LI *et al.*, 2016).

Por outro lado, a administração crônica de nitrato em ratos acarretou elevação nos níveis séricos de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol de baixa e muito baixa densidade (LDL-c e VLDL-c), enquanto diminuiu a fração do colesterol de alta densidade (HDL-c), segundo um estudo realizado por El-Wakf e colaboradores. Em outro estudo realizado por Marsch e demais autores (2016), camundongos nocauteados para o receptor de LDL foram tratados com uma dieta ocidental (rica em colesterol) e uma solução de nitrato (1g/L) na água durante 14 semanas, mas não houve mudança na concentração de colesterol e triglicerídeos entre o grupo suplementado e o grupo placebo (NaCl 1 g/L). Em humanos, Velmurugan e colaboradores (2015), não evidenciaram alterações no perfil lipídico de pacientes hipercolesterolêmicos que receberam uma ingestão diária de nitrato (suco de beterraba) durante seis semanas.

Nesta dissertação, os resultados mostraram que não houve intervenção do nitrato sobre alguns parâmetros lipídicos plasmáticos, sendo estes influenciados unicamente pelo tipo de dieta – dieta hiperlipídica elevou a concentração plasmática de triglicerídeos, colesterol total e a fração não-HDL do colesterol. Em contrapartida, o nitrato mostrou notável aumento na fração HDL-colesterol nos animais tratados com dieta de alto teor lipídico (grupo HN) quando comparados ao grupo controle (grupo HP).

Ainda tratando-se de dosagem de lipídeos, foi realizado um ensaio para a extração de lipídeos totais no fígado e nas fezes. O conteúdo lipídico fecal foi menor apenas quando o nitrato foi administrado juntamente à dieta padrão, no entanto, não foram encontrados dados literários que sustentassem esse resultado. No fígado, a suplementação reduziu o conteúdo lipídico mesmo com a dieta rica em gordura saturada, aproximando-o aos valores obtidos pelos grupos com dieta padrão, o que está em concordância com os resultados das fotomicrografias. Esses dados estão em similaridade ao estudo de Li e colaboradores (2016), em que a suplementação com o nitrato do espinafre revelou menor acúmulo de lipídeos no fígado de maneira dose-dependente.

A catalase é uma das enzimas antioxidantes mais relevantes na célula, pois é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um dos

componentes essenciais do estresse oxidativo (BALISTRERI *et al.*, 2010). Estudos sugerem que o aumento da catalase seja necessário para consumir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial excessivo produzido pelo aumento do metabolismo da gordura (RINDLER *et al.*, 2013).

Outra classe enzimática essencial na defesa contra as ERO's é representada pela família de superóxido dismutases: SOD1 (CuZn-SOD) encontrada no citoplasma; SOD2 (MnSOD) na mitocôndria e SOD3 (EC-SOD) localizada exclusivamente no espaço intercelular (ZELKO *et al.*, 2002).

Nesta dissertação, a atividade da catalase tanto no fígado como no músculo foram aumentadas no grupo alimentado com dieta rica em lipídeos e tratados com nitrato de sódio (HN), o que não ocorreu no tecido renal.

Em similaridade, a expressão e a atividade da catalase aumentaram significativamente no coração dos animais que consumiram uma dieta com alto teor de gordura durante 30 semanas. Esse estudo concluiu que a expressão da enzima seja regulada para prevenir danos advindos da dieta hipercalórica (RINDLER *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a atividade da SOD se comportou de maneira diferente nos três tecidos analisados. No fígado, ela foi aumentada no grupo HN, da mesma forma que a CAT hepática. No entanto, a SOD no músculo mostrou maior atividade quando a suplementação ocorreu concomitante à dieta padrão (grupo PN), o que resultou em menor atividade nos grupos obesos. Nenhuma mudança significativa foi observada no rim.

Em outra abordagem, o estudo de Liu e colaboradores (2013) apontou que a superexpressão de duas isorformas da superóxido (SOD1 e SOD2) em camundongos transgênicos reduziu o estresse oxidativo no músculo esquelético dos animais alimentados com dieta rica em lipídeos. O tratamento com nitrato reduziu a geração de ânion superóxido, citocinas pró-inflamatórias e infiltração de macrófagos no rim de camundongos C57BL/6 suplementados com 1 mmol/kg/dia na ração por duas semanas (YANG *et al.*, 2017).

Quanto à peroxidação lipídica, os resultados mostraram que a oferta de dieta rica em lipídeos saturados, por si só, dobrou o conteúdo de TBARS no músculo em relação a dieta normocalórica. Surpreendentemente, o dano lipídico foi reduzido com a suplementação (grupo HN) a níveis próximos ao de uma ingestão

dieta padrão. No fígado, o nitrato junto à dieta controle aumentou o TBARS e no rim nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

O teor de proteína carbonilada foi maior no fígado e no músculo dos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica. Nesses dois tecidos, a suplementação com nitrato inorgânico reverteu esse quadro, mantendo os níveis de carbonilação próximos ao controle PP. No rim, o grupo obeso suplementado (HP) mostrou valores até mesmo inferiores ao grupo PP.

A dosagem de derivados carbonílicos sugere efeito antagônico ao de sulfidril total, já que quanto maior a presença de grupos tióis menor a possibilidade de oxidação das proteínas. Fígado e rim concordaram com essa hipótese, visto que os grupos com alta concentração de carbonilação proteica apresentaram menor concentração de sulfidril (grupo HP), a medida que o grupo com menor dano proteico (HN) apresentou maiores níveis de sulfidrilas. No músculo o grupo PN destacou-se com elevado teor de sulfidril total.

Em estudo realizado por Furukawa e demais autores (2014), dois modelos de camundongos foram utilizados para compreender a relação entre obesidade e síndrome metabólica com o estresse oxidativo. Animais KK<sub>Y</sub>, um modelo animal com obesidade grave, hiperlipidemia e resistência à insulina, com 7 e 13 semanas de idade, bem como animais selvagens alimentados com uma dieta indutora de obesidade (DIO) e camundongos *db/db* durante 10 semanas foram avaliados. Todos os modelos apresentaram elevada peroxidação lipídica (TBARS) no plasma e no tecido adiposo branco comparados aos controles, mas o ensaio não diferiu no fígado e no músculo esquelético. No mesmo estudo, indivíduos adultos obesos também mostraram maior dano lipídico plasmático.

Os autores deste trabalho supracitado, também analisaram a expressão e atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase) nos mesmos modelos animais. Nos camundongos KK<sub>Y</sub>, a atividade da SOD e catalase foram reduzidas no tecido adiposo independente da idade, mas manteve-se similar no fígado e músculo em relação ao respectivo controle. Nos animais selvagens com DIO e nos camundongos *db/db* a expressão da SOD e da GPx foram menores no tecido adiposo do que os controles, mantendo-se novamente inalterado no fígado e músculo.



Em outro estudo, Vedova e colaboradores (2016), avaliaram alguns biomarcadores do estresse oxidativo no soro de camundongos submetidos a um modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídeos e frutose, descrita como HFD+F. Enquanto a concentração da glutathiona reduzida foi diminuída nos camundongos tratados com HFD+F em comparação a todos os outros grupos, a atividade de enzimas antioxidantes (CAT e GPx) foram aumentadas nesse grupo. Da mesma forma, os danos oxidativos, mensurados pelo TBARS e proteínas carboniladas, mostraram-se elevados no grupo HFD+F, evidenciando o papel da dieta no estresse oxidativo.

Já é descrito na literatura que algumas citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e MCP-1 e também a infiltração de macrófagos estão aumentados no tecido adiposo de obesos (GUILHERME *et al.*, 2008; NOROUZIRAD *et al.*, 2017).

Nossos resultados estão em concordância com essas informações literárias, tendo em vista que as três citocinas pró-inflamatórias quantificadas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1/CCL2) mostraram-se maiores no grupo HP. No entanto, o nitrato não teve nenhum efeito na reversão da inflamação. O grupo PP apresentou menor concentração de citocinas, inclusive de IL-10, considerada uma citocina anti-inflamatória. Na quantificação dessa citocina, o nitrato teve papel fundamental ao permitir elevada produção no tecido adiposo de eutróficos (grupo PN).

Lee e colaboradores (2016) mostraram que camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas tiveram concentrações de algumas citocinas aumentadas, como IL-6, IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$  devido ao aumento de células NK no tecido adiposo epididimal comparados àqueles com dieta normocalórica. Uma dieta com alto teor de açúcar simples durante 8 semanas, também foi suficiente para elevar os níveis de MCP-1 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6 sedentários (SILVA *et al.* 2016).

## 6. Conclusão

Os dados literários acerca do papel do nitrato inorgânico associado à dieta hiperlipídica sobre o balanço redox no fígado, rim e músculo gastrocnêmio e sobre inflamação no tecido adiposo ainda são pouco explorados. Além disso, a sua atuação sobre parâmetros de bioquímica sanguínea são paradoxos.

Neste estudo, foi possível concluir que apesar do nitrato não influenciar no ganho de peso e nem mesmo na adiposidade, na ingestão calórica e hídrica, e nos níveis glicêmicos, ele desempenhou importante função nas dietas administradas quanto à redução da hipertrofia dos adipócitos e ao aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) no tecido adiposo branco e ainda, reduziu lipídeos totais hepáticos e fecais, além de elevar a fração HDL do colesterol plasmático. Do mesmo modo, ao explorar o seu papel no estresse oxidativo, notou-se que de maneira geral, o nitrato inorgânico acarretou o aumento de moléculas e enzimas antioxidantes nos tecidos avaliados, ao passo que reduziu o dano oxidativo mesmo em uma alimentação rica em lipídeos.

## 7. Referências

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methodos Enzymol.** 1984; 105: 121-126.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

AKSENOV, M. Y.; *et al.* Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease.

**Neuroscience Letters.** 2001; 302: 141-145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition research.** 2013; 33:1-11.

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.11.013>

ASHMORE, T. *et al.* Nitrate enhances skeletal muscle fatty acid oxidatin via a nitric oxide-cGMP-PPAR-mediated mechanism. **BMC Biology.** 2015; 13:110.

<https://doi.org/10.1186/s12915-015-0221-6>

ASHOR, A. W., *et al.* Inorganic nitrate supplementation in young and old obese adults does not affect acute glucose and insulin responses but lowers oxidative stress. **J Nutr.** 2016; 146(11):2224-2232. <https://doi.org/10.3945/jn.116.237529>

BAKKER, J. R. *et al.* Low dose dietary nitrate improves endothelial dysfunction and plaque stability in the ApoE<sup>-/-</sup> mouse fed a high fat diet. **Free Radic Biol Med.** 2016; 99:189-198. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.009>

BALISTRERI, C. R., *et al.* The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related **Inflammatory Diseases. Mediators of Inflammation.** 2010; 2010:802078. <https://doi.org/10.1155/2010/802078>

BENZEI, I. F. & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem.** 1996; 239: 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 1976; 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Inf: Free Radical and Antioxidant Protocols**. Human Press, 1998. p. 347-352.

BRYAN, N. S., *et al.* Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci**. 2007; 104:19144-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706579104>

BRYAN, N. S., *et al.* Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. **Nat Chem Biol**. 2005; 1: 290–297. <https://doi.org/10.1038/nchembio734>

CARLSTRÖM, M., *et al.* Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci**. 2010; 107:17716–17720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008872107>

CHEN, X., *et al.* Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**. 2012; 7(5): 376–385.

COSBY, K., *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nat Med**. 2003; 9:1498-1505. <https://doi.org/10.1038/nm954>

d'EL-REI, J. *et al.* Beneficial Effects of Dietary Nitrate on Endothelial Function and Blood Pressure Levels. **International Journal of Hypertension**. Article ID 6791519, 6 pages, 2016. doi:10.1155/2016/6791519. <https://doi.org/10.1155/2016/6791519>

EL-WAKF, A. M.; *et al.* Fenugreek potent activity against nitrate-induced diabetes in young and adult male rats. **Cytotechnology**. 2015; 67(3):437–447. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9702-7>

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 1957; 497-509.

FRÜHBECK, G., *et al.* BAT: a new target for human obesity? **Trends in Pharmacological Sciences**. 2009; 30(8):387–396. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.003>

FURUKAWA, S.; *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**. 2004; 114(12):1752-1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>

GAGO, B. *et al.* Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. **Free. Radic. Biol. Med.** 2007; 43:1233-1242. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.007>

GESTA, S., *et al.* Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**. 2007; 131(2):242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>

GHEIBI, S.; *et al.* Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. **Nitric Oxide**. 2017; 1:64:39-51. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.01.003>

GLADWIN, M. T. *et al.* The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chem Biol**. 2005; 1: 308-314. <https://doi.org/10.1038/nchembio1105-308>

GODBER, B. L. *et al.* Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. **J. Biol. Chem.** 2000; 275:7757-7763. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7757>

GORDON, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. **Journal of Clinical Investigation**. 2007; 117(1):89–93. <https://doi.org/10.1172/JCI30992>

GRUBER, H. J.; *et al.* Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **Int J Obes**. 2008; 32:826–831. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803795>

GUILHERME, A.; *et al.* Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 2008; 9(5):367–377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>

HEZEL, M. P.; *et al.* Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. **Redox Biology**. 2015; 5:234-242. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.004>

HIGUCHI, M.; *et al.* Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Fat Involves Reactive Oxygen Species and Forkhead Box O1 Mediated Upregulation of Antioxidant Enzymes. **Stem Cells Dev**. 2013; 22(6): 878-888. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0306>

HORD, N. G., Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **Am J Clin Nutr**. 2009; 90:1-10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>

HRUBY, A.; HU F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmaco Economics**. 2015; 33(7):673-689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>

HUANG, P. L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Trends Endocrinol Metab**. 2009; 20:295-302. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.005>

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Physiol. Pharmacol**. 2002; 53:503-514.

JANSSON, E.A.; *et al.* A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nat Chem Biol.** 2008; 4:411–417. <https://doi.org/10.1038/nchembio.92>

JIANG, H.; *et al.* Dietary nitrite improves insulin signaling through GLUT4 translocation. **Free Radic. Biol. Med.** 2014; 67:51–57. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.809>

JUGE-AUBRY, C. E., *et al.* Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Practice & Research. Clin Endocrinol Metabolism.* 2005; 19(4):547–566. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.009>

KAPIL, V., *et al.* Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. **Hypertension.** 2010; 56:274–281. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536>

KLEINBIOGARD, P. *et al.* Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. **Free Radic. Biol. Med.** 2006; 40, 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.025>

KOJDA G., HARRISON D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res.** 1999; 43:562– 571. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00169-8)

LAFONTAN, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. **Diabetes & Metabolism.** 2014; 40(1):16–28. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.08.002>

LARSEN, F. J., *et al.* Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. **N Engl J Med.** 2006; 355:2792–2793. <https://doi.org/10.1056/NEJMc062800>

LEE, B. C.; *et al.* Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. **Cell metabolism**. 2016; 23(4):685-698. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.002>

LEE, H.; *et al.* Reactive Oxygen Species Facilitate Adipocyte Differentiation by Accelerating Mitotic Clonal Expansion. **J Biol Chem**. 2009; 284(16):10601-10609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808742200>

LI, T.; *et al.* Effects of spinach nitrate on insulin resistance, endothelial dysfunction markers and inflammation in mice with high-fat and high-fructose consumption. **Food & Nutrition Research**. 2016; 60:10.3402/fnr.v60.32010. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.32010>

Liu Y., *et al.* Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. **Biochemical and biophysical research communications**. 2013;438(1):78-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.029>

LUBOS, E. *et al.* Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. **Front Biosci**. 2009; 13: 5323–5344.

LUNDBERG, J. O. & GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxid. **Free Radic Biol Med**.2004; 37 395-400. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027>

LUNDBERG, J.O. *et al.* The nitrate-nitrite- nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**. 2008; 7:156-167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466-c2>

MANNA, P., JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metab Syndr Relat Disord**. 2015; 13(10): 423–444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>



MARIE, N. G.; *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Journals**. 2014; 384: 766–781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8)

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Eur. J. Biochem.** 1974; 47(3): 234-247. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

MARSCH, E. *et al.* The effect of prolonged dietary nitrate supplementation on atherosclerosis development. **Atherosclerosis**. 2016; 245:212-21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.031>

MATHIEU, P., *et al.* Visceral obesity the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension**. 2009; 53(4):577–584. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110320>

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**. 1993; 329:2002–2012. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706>

MONTI, L. D.; *et al.* Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. **Diabetes**. 2003; 52:1270–1275. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1270>

NAGABABU, E. *et al.* Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. **J. Biol. Chem.** 2003; 278: 46349-46356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307572200>

NOROUZIRAD, R.; *et al.* Hypoxia in Obesity and Diabetes: Potential Therapeutic Effects of Hyperoxia and Nitrate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017;2017:5350267. <https://doi.org/10.1155/2017/5350267>

OESTERGAARD, L. *et al.* Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 2007; 293: H2894-H2903. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01230.2006>

OĞUR, R.; *et al.* Effects of high nitrate intake in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.** 2000;11(1):47–56. <https://doi.org/10.1515/JBCPP.2000.11.1.47>

OHTAKE, K.; *et al.* Dietary nitrite supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKA(y) mice. **Nitric Oxide.** 2015; 44:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.009>

PANNALA, A. S., *et al.* The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. **Free Radic Biol Med.** 2004; 34:576-84. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01353-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01353-9)

PEIRCE, V., *et al.* The different shades of fat. **Nature.** 2014; 510(7503):76–83. <https://doi.org/10.1038/nature13477>

PELELI, M.; *et al.* Enhanced XOR activity in eNOS – deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine.** 2016.; 99:472-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.004>

PELELI, M.; *et al.* In adenosine A<sub>2B</sub> knockouts acute treatment with inorganic nitrate improves glucose disposal, oxidative stress, and AMPK signaling in the liver. **Frontiers in Physiology.** 2015; 6:222. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00222>

PIVA, S. J.; *et al.* Assessment of inflammatory and oxidative biomarkers in obesity and their associations with Body Mass Index. **Inflammation.** 2013; 36: 226-231. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9538-2>

RASSAF, T., *et al.* Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:1590-1596. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01183-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01183-8)

REDINGER, R. N. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Translational Research.* 2009;154(2):52–60. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2009.05.003>

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology.* 1994; 233: 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)

RINDLER P. M., *et al.* High Dietary Fat Selectively Increases Catalase Expression within Cardiac Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288(3):1979-1990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412890>

ROBERTS, L. D.; *et al.*  $\beta$ -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic  $\beta$ -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.* 2014; 19:96-108. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.003>

ROBERTS, L. D.; *et al.* Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide pathway. *Diabetes.* 2015; 64:471-484. <https://doi.org/10.2337/db14-0496>

RUPÉREZ, A. I., *et al.* Genetics of Oxidative Stress in Obesity. *Inter J Molec Sci.* 2014;15(2):3118-3144. <https://doi.org/10.3390/ijms15023118>

SANSBURY B. E.; HILL, B. G. REGULATION OF OBESITY AND INSULIN RESISTANCE BY NITRIC OXIDE. *Free Radic Biol Med.* 2014; 0:383-399. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016>

SAVINI, I., *et al.* Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:10497–10538. <https://doi.org/10.3390/ijms140510497>

SHIVA, S. *et al.* Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. **Circ Res.** 2007; 199: 543-661. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b>

SILVA, J. F.; *et al.* Obesity, inflammation and exercise training: relative contribution of iNOS and eNOS in the modulation of vascular function in the mouse aorta. **Front Physiol.** 2017; 7:386.

STRISSEL, K. J.; *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. **Diabetes.** 2007; 56(12):2910–2918. <https://doi.org/10.2337/db07-0767>

TANG, Y., *et al.* Nitrite and nitrate: cardio-vascular risk-benefit and metabolic effect. **Curr Opin Lipidol.** 2011; 22:11-5. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328341942c>

van Loon A. J., *et al.* Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. **Br J Cancer.** 1998; 78:129-35. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.454>

VASSALE, C. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. **Clinical Biochemistry.** 2008; 41:1162-1167. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.07.005>

VEDOVA, M. C. D.; *et al.* A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. **Nutrition and Metabolic Insights.** 2016; 9:93-102.

VELMURUGAN, S.; *et al.* Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **The**

*American Journal of Clinical Nutrition*. 2016; 103(1):25-38.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.115.116244>

VERNOCHET, C.; *et al.* Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2012; 16:765-776. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.016>

VIRTANEN, K. A., *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360(15):1518–1525.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>

YAGI, K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. In: Free radical and antioxidant protocols. *Human Press*. 1998. p. 107-110. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:107>

WHITE, C. R., *et al.* Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91:1044–1048. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1044>

WOOD, G. C., *et al.* An electronic health record-enabled obesity database. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. 12:45. 2012.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6947-12-45>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Seventy-fourth meeting of the Joint FAO/ *WHO* Expert Committee on Food Additives (JECFA). ISBN 9789241660655. Geneva, 2012.

WOZNIAK, S. E., *et al.* Adipose tissue: the new endocrine organ? a review article. *Digestive Diseases and Sciences*. 2009; 54(9):1847–1856.  
<https://doi.org/10.1007/s10620-008-0585-3>

Zelko, I. N., *et al.* Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), MN-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures,

evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33:337–349.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)

ZEYDA M., STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters*. 2007;112(2):61–67. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.07.003>

ZHU, Q., et al. Adipocyte-specific deletion of Ip6k1 reduces diet-induced obesity by enhancing AMPK-mediated thermogenesis. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4273-4288. <https://doi.org/10.1172/JCI85510>

## ANEXO 1: Formulário de Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU, nº 128/15



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VolP) 3423;  
e-mail: [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 011/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 128/15

Projeto Pesquisa: "Efeito da suplementação de nitrato de sódio associada ao exercício físico no balanço redox e perfil inflamatório em modelo de obesidade animal".

Pesquisador Responsável: Profª Drª Françoise Vasconcelos Botelho

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de março de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU

## ANEXO 2: Delineamento experimental.

### Delineamento experimental

