Wermerson Assunção Barroso

**Modulação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios pelo extrato
hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* na doença do
fígado gorduroso não alcoólico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Dra. Thais Martins de Lima

São Paulo

2019

Wermerson Assunção Barroso

**Modulação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios pelo extrato
hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* na doença do
fígado gorduroso não alcoólico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Dra. Thais Martins de Lima

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barroso, Wermerson Assunção

Modulação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios
pelo extrato hidroalcoólico das cascas verdes de
Musa cavendish na doença do fígado gorduroso não
alcoólico / Wermerson Assunção Barroso. -- São Paulo,
2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.
Orientadora: Thais Martins de Lima.

Descritores: 1.Musa 2.Dieta hiperlipídica
3.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 4.Inflamação
5.Insulina 6.Lipídeos

USP/FM/DBD-311/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha mãe Loide e ao meu filho Paulo César,
por serem meus maiores estímulos diários.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a realização dos meus objetivos e por estar comigo em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Thais Martins de Lima pela maravilhosa orientação, ensinamentos valiosos, paciência, confiança e por toda a ajuda de sempre. Sou grato por tudo, pelos momentos e carinho. Obrigado por ser minha “chefinha”, cuja palavra uso carinhosamente para referir-me a você.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza por ter aberto as portas do LIM-51 e por todas as oportunidades que me proporcionou. Muito obrigado pelos ensinamentos, confiança, por sempre acreditar nos meus pedidos e me ajudar.

À Dra. Iracelle Abreu por me apoiar nas pesquisas científicas e ser uma excelente colaboradora. Muito obrigado pelo estímulo, companheirismo e amizade de sempre. À minha família e aos amigos, por todo o amor, carinho, apoio e por compartilharem todas as minhas conquistas.

À Dra. Cláudia Rocha pela colaboração na realização dos experimentos da parte química desta tese e pela disponibilidade nas demais colaborações.

À Larissa Ribeiro pela colaboração nos experimentos iniciais de preparação do extrato e caracterização química, bem como por todo o carinho e amizade.

À Mariana Serra pela colaboração na realização dos experimentos *in vivo* desta tese. Muito obrigado também pela amizade, companheirismo, conversas, apoio e carinho.

À Dra Denise Frediani pela colaboração em todos os momentos que precisei e pelos ensinamentos durante minha estadia no LIM-51.

À Me. Suely Ariga por toda colaboração, ensinamentos e disponibilidade no LIM-51.

Ao Dr. Hermes Barbeiro pela colaboração nos experimentos de MAGPIX® no LIM-51.

À Mari Maia pela colaboração na confecção das listas e sumário automáticos da tese.

Muito obrigado também pela amizade, suporte, companheirismo, preocupação e disponibilidade de sempre.

Ao amigo Igor Sales por todo o carinho, amizade e ajuda nas edições dos *slides* durante a minha vida científica.

Aos demais do Laboratório de Investigação Médica 51 (LIM-51) – Kelli, Dr. Francisco Soriano, Rosângela, Juliana, Ricardo Petroni, seu Geraldo e dona Fátima - por toda a colaboração, conversas e ensinamentos ao longo desta caminhada.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - pelo apoio financeiro para a realização deste projeto e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela bolsa de estudos fornecida.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

(Aldo Novak)

LISTA DE ABREVIACÕES

ACOX: acil-CoA oxidase;
AGL: ácidos graxos livres;
ALT: alanina aminotransferase;
AST: aspartato aminotransferase;
CCl₄: tetracloreto de carbono;
CHE: células hepáticas estreladas;
ChRBP: proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos;
CPT-1: carnitina palmitoil transferase 1;
CT: colesterol total;
CT-HDL: colesterol-HDL;
CTR: controle;
DGAT: diacilglicerol O-aciltransferase;
DHL: dieta hiperlipídica;
DNA: Ácido desoxirribonucleico;
DNAMt: DNA mitochondrial;
DRG: dietas ricas em gordura;
EHB: extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de *Musa cavendish*;
ER: retículo endoplasmático;
EROs: espécies reativas de oxigênio;
FIA-ESI-IT-MSⁿ: análise de injeção de fluxo por espectrometria de massa de tandem por ionização por *electrospray*.
FRAP: capacidade de redução férrica do plasma;
GL: glicose;
GLP-1: *glucagon-like peptide-1* (do inglês);
GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferase;
HCl: ácido clorídrico;
HNE: 4-hidroxinonenal;
HOMA2-IR: *Homeostasis Model Assessment 2-Insulin Resistance* (do inglês);
HPLC-UV/Vis: cromatografia líquida de alta eficiência-ultravioleta/visível;
IFN- γ : interferon- γ ;
IL: interleucina;
IP: iodeto de propídio;

LC-ESI-IT-MS: cromatografia líquida-espectrometria de massa de tandem por ionização por *electrospray*;

L-CPT-1: L- carnitina palmitoiltransferase-1;

MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos-1;

MDA: malondialdeído;

MIP-2: proteína-2 inflamatória de macrófagos;

MPO: mieloperoxidase;

MTT: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, do inglês];

NAFL: fígado gorduroso não alcoólico;

NAFLD: doença do fígado gorduroso não alcoólico;

NASH: esteatohepatite não alcoólica;

NF- κ B: fator nuclear-kappa B;

NO: óxido nítrico;

PB: polifenóis extraídos da casca de banana;

PGC-1 α : coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama;

PMM: potencial de membrana mitochondrial;

PPAR = receptor ativado por proliferador de peroxissoma;

QUICKI: *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (do inglês);

rBanLec: lectina recombinante de banana;

RI: resistência à insulina;

RNA_m: RNA mensageiro;

SCD1: *stearoyl-CoA desaturase 1*;

SM: síndrome metabólica;

SOD: superóxido dismutase;

SRBP1c: proteína de ligação ao elemento de resposta do esteroide;

TG: triglicérides;

TGF β : fator de transformação do crescimento- β ;

TNF- α : = fator de necrose tumoral- α ;

TOTG: teste oral de tolerância à glicose;

TTI: teste de tolerância à insulina;

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos compostos do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de <i>Musa cavendish</i> (EHB) por LC-ESI-IT/MS e FIA-ESI-IT/MS ⁿ	47
Tabela 2: <i>Score</i> da avaliação histológica do tecido hepático dos animais	56
Tabela 3: <i>Score</i> da avaliação histológica do tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de <i>Musa cavendish</i> (EHB) adquiridos por LC-UV/Vis (254 nm).....	46
Figura 2: Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de <i>Musa cavendish</i> (EHB) adquirido por LC-ESI-IT/MS (-).....	46
Figura 3: Avaliação do peso corporal e Índice de Lee dos animais	49
Figura 4: Avaliação do peso do tecido adiposo branco e marrom dos animais	50
Figura 5: Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste de tolerância à insulina (TTI) dos animais	51
Figura 6: Perfil lipídico plasmático dos animais	52
Figura 7: Parâmetros hepáticos plasmáticos dos animais.	53
Figura 8: Hormônios e adipocinas dosadas no plasma dos animais.....	54
Figura 9: Avaliação do peso e histologia do tecido hepático dos animais.	55
Figura 10: Quantificação do conteúdo de triglicérides, colesterol e glicogênio no tecido hepático dos animais.....	57
Figura 11: Avaliação da fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) em ser(302).....	58
Figura 12: Expressão gênica de enzimas no tecido hepático dos animais	59
Figura 13: Quantificação das citocinas e NF- κ B p65 nuclear no tecido hepático dos animais.....	60
Figura 14: Quantificação de marcadores antioxidantes no tecido hepático dos animais.	61
Figura 15: Avaliação do peso corporal e Índice de Lee dos animais..	63
Figura 16: Avaliação do peso do tecido adiposo branco e marrom dos animais.	64
Figura 17: Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e glicemia de jejum dos animais após a indução da NAFLD..	65
Figura 18: Teste de tolerância à insulina (TTI) e glicemia de jejum dos animais após a indução da NAFLD..	65
Figura 19: Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB.....	66
Figura 20: Glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina (TTI) dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB.	67

Figura 21: Perfil lipídico plasmático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB..	68
Figura 22: Parâmetros hepáticos plasmáticos dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB..	69
Figura 23: Hormônios e adipocinas dosadas no plasma dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB.	70
Figura 24: Avaliação do peso e histologia do tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB.	72
Figura 25: Quantificação do conteúdo de triglicérides, colesterol e glicogênio no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB.	74
Figura 26: Expressão gênica de receptores e enzimas no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB..	76
Figura 27: Quantificação das citocinas no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB..	78

RESUMO

Barroso WA. *Modulação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios pelo extrato hidroalcoólico das cascas verdes de Musa cavendish na doença do fígado gorduroso não alcoólico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Musa cavendish, comumente conhecido como banana, é uma fruta com estudos científicos limitados sobre as atividades biológicas das suas cascas. Assim, decidimos investigar a composição química e os efeitos do extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de *Musa cavendish* (EHB) como modelo de tratamento preventivo e farmacológico da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) induzida por dieta hiperlipídica em camundongos. A composição química do EHB foi determinada por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ. Foram identificados 12 compostos de diferentes classes, incluindo derivados de ácidos fenólicos, flavonóides agliconas, flavonóides glicosídicos e catecolaminas. O efeito da administração preventiva e farmacológica do EHB sobre a NAFLD foi avaliado pela determinação da composição corporal, instalação de resistência insulínica periférica, além do monitoramento do perfil glicêmico, lipídico, hepático e hormonal plasmáticos. O comprometimento hepático foi avaliado por histologia, expressão gênica e conteúdo proteico de reguladores metabólicos e inflamatórios, assim como marcadores antioxidantes. Os animais tratados com o EHB apresentaram redução do peso corporal, dos tecidos adiposos e do Índice de Lee. O EHB diminuiu os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-LDL, ácidos graxos livres, aspartato aminotransferase (AST), insulina, leptina, peptídeo inibitório gástrico (GIP) total e resistina e aumentou os níveis séricos de colesterol-HDL. O tratamento modulou a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, como glicerol-3-fosfato aciltransferase-4 (GPAT4), diacilglicerol O-aciltransferase 2 (DGAT2), HMG-CoA redutase, acil-CoA oxidase (ACOX) e colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1) no tecido hepático. Além disso, o tratamento preventivo com EHB aumentou o peso e o conteúdo de glicogênio no fígado. A análise histológica mostrou que o EHB reduziu a esteatose, a balonização e a inflamação lobular. A redução da inflamação foi confirmada pelo menor conteúdo de TNF- α , IL-6, MIP-2, IL-1 β e NF- κ B p65 nuclear e aumento de IL-10 e da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Assim, nossos resultados indicam o potencial do EHB como agente protetor e terapêutico nos camundongos obesos com a doença do fígado gorduroso não

alcoólico induzida por dieta hiperlipídica, modulando os parâmetros metabólicos e inflamatórios.

Descritores: Musa; Dieta hiperlipídica; Hepatopatia gordurosa não alcoólica; Inflamação; Insulina; Lipídeos.

ABSTRACT

Barroso WA. *Modulation of metabolic and inflammatory parameters by hydroalcoholic extract of Musa cavendish green peels in nonalcoholic fatty liver disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Musa cavendish, commonly known as banana, is a fruit with limited scientific studies regarding the biological activities of its peels. Thus, we decided to investigate the chemical composition and effects of hydroalcoholic extract of *Musa cavendish* fruit green peels (EHB) as a model of preventive and pharmacological treatment of high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. The chemical composition of EHB was determined by HPLC-UV/Vis and FIA-ESI-IT-MSⁿ. Twelve compounds of different classes were identified, including derivatives of phenolic acids, aglycone flavonoids, glycosidic flavonoids and catecholamines. The effect of preventive and pharmacological administration of EHB on NAFLD was assessed by determination of body composition, peripheral insulin resistance, and plasma glycemic, lipid, hepatic and hormonal profiles. Hepatic impairment was evaluated by histology, gene expression and protein content of metabolic and inflammatory regulators, as well as antioxidant markers. The animals treated with EHB showed reduction in body weight, adipose tissue and Lee Index. EHB decreased serum glucose, triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid, aspartate aminotransferase (AST), insulin, leptin, total gastric inhibitory peptide (GIP) and resistin levels and increased serum HDL-cholesterol levels. Treatment modulated gene expression of several enzymes involved in lipid metabolism, such as glycerol-3-phosphate acyltransferase-4 (GPAT4), diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2), HMG-CoA reductase, acyl-CoA oxidase (ACOX) and cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in liver tissue. In addition, preventive EHB treatment increased liver weight and glycogen content. Histological analysis showed that EHB reduced steatosis, ballooning and lobular inflammation. Inflammation reduction was confirmed by lower content of TNF- α , IL-6, MIP-2, IL-1 β and nuclear NF- κ B p65 and increased IL-10 and superoxide dismutase (SOD) activity. Thus, our results indicate the potential of EHB as a protective and therapeutic agent in obese mice with non-alcoholic fatty liver disease induced by hyperlipidic diet, modulating metabolic and inflammatory parameters.

Descriptors: Musa; Diet, high-fat; Nonalcoholic fatty liver disease; Inflammation; Insulin; Lipids.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Obesidade e síndrome metabólica.....	21
1.2 Doença do fígado gorduroso não alcoólico (<i>NAFLD</i> , do inglês).....	22
1.2.1 Fatores envolvidos na fisiopatologia da <i>NAFLD</i>	23
1.3 Banana (<i>Musa</i> spp).....	27
1.3.1 Banana e seu uso tradicional.....	27
1.3.2 Compostos bioativos e atividades farmacológicas.....	28
2 HIPÓTESE.....	31
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	32
4.1 Geral.....	32
4.2 Específicos.....	32
4.2.1 Preparar o extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de <i>Musa cavendish</i> (EHB), determinar a sua composição e formular o xarope para administração nos camundongos.....	32
4.2.2 Induzir a doença do fígado gorduroso não alcoólico e realizar o tratamento preventivo e farmacológico com o EHB.....	32
4.2.3 Verificar os efeitos da administração do EHB sobre o peso e desenvolvimento da obesidade.....	33
4.2.4 Avaliar os efeitos da administração do EHB sobre a resistência insulínica periférica.....	33

4.2.5 Determinar se o tratamento com o EHB promove alterações na quantidade do tecido adiposo.....	33
4.2.6 Examinar as ações do EHB sobre os parâmetros bioquímicos plasmáticos do metabolismo glicêmico e lipídico, bem como da função hepática.....	33
4.2.7 Investigar os efeitos do tratamento com o EHB sobre a histologia hepática.....	34
4.2.8 Determinar os efeitos do tratamento com o EHB sobre o conteúdo lipídico e glicogênico no tecido hepático.....	34
4.2.9 Definir os efeitos do tratamento com o EHB sobre a inflamação do tecido hepático e o mecanismo envolvido.....	34
4.2.10 Averiguar os efeitos do tratamento com o EHB sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicêmico, lipídico e inflamação.....	34
4.2.11 Pesquisar se o tratamento com o EHB modula a produção de marcadores antioxidantes.....	35
5 METODOLOGIA.....	35
5.1 Material botânico.....	35
5.2 Preparo do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de <i>Musa cavendish</i> (banana Pacovan).....	35
5.3 Caracterização dos compostos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MS ⁿ do EHB.....	36
5.4 Formulação do xarope	37
5.5 Delineamento experimental.....	37
5.5.1 Animais.....	37
5.5.2 Dietas.....	37
5.5.3 Indução da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) e tratamento preventivo com o EHB.....	38
5.5.4 Indução da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) e tratamento farmacológico com o EHB.....	38
5.6 Avaliação do desenvolvimento da obesidade.....	39
5.7 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	39
5.8 Teste de tolerância à insulina (TTI).....	39

5.9 Eutanásia, coleta de sangue e tecidos.....	39
5.10 Determinações bioquímicas plasmáticas.....	40
5.11 Análises no tecido hepático.....	40
5.11.1 Histologia.....	40
5.11.2 Quantificação de triglicérides e colesterol total.....	41
5.11.3 Glicogênio.....	41
5.11.4 Extração de proteínas e dosagem de citocinas.....	41
5.11.5 Extração de proteínas nucleares e quantificação de NF- κ B p65 nuclear.....	42
5.11.6 Detecção do conteúdo proteico por <i>Western Blotting</i>	42
5.11.7 Extração de RNA e avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios e metabólicos por RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real).....	43
5.11.8 Determinação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).....	44
5.11.9 Quantificação de glutatona total.....	44
5.12 Análise Estatística.....	45
6 RESULTADOS	45
6.1 Caracterização dos compostos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MS ⁿ do EHB.....	45
6.2 Resultados do tratamento preventivo com o EHB.....	47
6.2.1 O EHB previne o ganho de peso corporal e o crescimento do tecido adiposo dos animais.....	47
6.2.2 O EHB previne a intolerância à glicose e a resistência à insulina, bem como a elevação da glicemia de jejum dos animais.....	50
6.2.3 O EHB previne o aumento dos parâmetros bioquímicos lipídicos e hepáticos dos animais.....	51
6.2.4 O EHB previne o aumento dos hormônios no plasma dos animais.....	53
6.2.5 O EHB previne a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) dos animais.....	54
6.2.6 O EHB previne o aumento do conteúdo lipídico e aumenta o conteúdo de glicogênio no tecido hepático dos animais.....	56

6.2.7 O EHB não altera o conteúdo de p-IRS-1 (ser 302).....	57
6.2.8 O EHB previne o aumento da expressão gênica de enzimas no tecido hepático dos animais.....	58
6.2.9 O EHB preveniu a elevação de citocinas inflamatórias e translocação nuclear do NF-κB p65 no tecido hepático dos animais.....	59
6.2.10 O EHB previne o aumento do estresse oxidativo no tecido hepático dos animais.....	61
6.3 Resultados do tratamento farmacológico com o EHB.....	61
6.3.1 O EHB diminui o ganho de peso corporal e o tecido adiposo dos animais.....	61
6.3.2 O EHB diminuiu a intolerância à glicose e a resistência à insulina, bem como a glicemia de jejum dos animais.....	64
6.3.3 O EHB diminui os parâmetros bioquímicos lipídicos plasmáticos dos animais sem alterar os parâmetros bioquímicos hepáticos.....	67
6.3.4 O EHB diminui hormônios no plasma dos animais.....	69
6.3.5 O EHB reverte a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) dos animais.....	70
6.3.6 O EHB não interfere no acúmulo de triglicérides e colesterol e diminui o conteúdo de glicogênio no tecido hepático dos animais.....	73
6.3.7 O EHB altera a expressão gênica de receptores e enzimas no tecido hepático dos animais.....	74
6.3.8 O EHB diminui o conteúdo de citocinas inflamatórias no tecido hepático dos animais.....	77
7 DISCUSSÃO	78
7.1 Caracterização química do EHB.....	78
7.2 Tratamento preventivo e farmacológico com o EHB.....	80
8 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e síndrome metabólica

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal devido a um desequilíbrio energético prolongado, o qual pode ser causado pelo consumo excessivo de calorias e/ou inatividade física (WHO, 2016). Além disso, o aumento do peso corporal é influenciado por uma combinação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, ambientais, comportamentais, culturais e econômicos (Malta et al., 2016). A obesidade é uma das maiores causas de mortalidade evitável no mundo (Barness et al., 2007). Essa pandemia envolve uma série de fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças como hipertensão arterial, dislipidemia aterogênica, resistência à insulina, diabetes tipo 2, certos tipos de câncer e doença cardiovascular aterosclerótica (principal consequência física da obesidade). Ainda, outras complicações estão relacionadas com a obesidade, como o fígado gorduroso, cálculos biliares de colesterol, apneia do sono, osteoartrite e síndrome do ovário policístico (Grundy, 2004). Segundo o Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol: Painel de Tratamento de Adultos III (*NCEP ATP III*, do inglês), dos Estados Unidos, a obesidade é considerada como a principal responsável pela crescente prevalência da síndrome metabólica (Williams, 2002).

A definição de síndrome metabólica (SM) é complexa, pois envolve uma série de comorbidades como a dislipidemia, hipertensão, obesidade e resistência à insulina. Sendo os dois últimos fatores mais expressivos na causa da mesma (Petta et al., 2016). A prevalência da síndrome metabólica está em ascensão no mundo ocidental e vai levar ao aumento de casos de diabetes e doença cardiovascular (Ford et al., 2008). Sedentarismo (Arderin et al., 2004) e alto teor de gordura nas “dietas ocidentais” (Feldeisen e Tucker, 2007) têm sido implicados no aumento da SM. Várias vias metabólicas estão implicadas na patogênese da doença, incluindo lipogênese (Samuel et al., 2004), aumento da inflamação (Uysal et al., 1997) e redução na oxidação de ácidos graxos (Ji e Friedman, 2008). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (*IDF*, do inglês), indivíduos com SM têm risco de desenvolver diabetes tipo 2 cinco vezes maior, como também a probabilidade de ter ataque cardíaco ou acidente vascular encefálico duas vezes maior do que em indivíduos sem a doença (Federation ID, 2005).

Ademais, estudos relatam que o conjunto de anormalidades presentes na SM também está associado à gravidade e progressão da doença do fígado gorduroso não

alcoólico, a qual é apontada como a manifestação hepática dessa síndrome (Souza, 2012; Petta et al., 2016; Petta et al., 2017).

1.2 Doença do fígado gorduroso não alcoólico (*NAFLD*, do inglês)

A *NAFLD* compreende todos os estágios da doença hepática gordurosa em indivíduos sem consumo significativo de álcool ou com uma tolerância de consumo inferior a 30-40 mg/dia para homens e menos de 20 mg/dia para as mulheres. O espectro da doença se estende desde o fígado gorduroso não alcoólico (*NAFL*, do inglês), definido como a presença de esteatose simples caracterizada pelo depósito de triglicerídeos nos hepatócitos superior a 5% do peso celular, sem evidência de lesão hepatocelular na forma de balonização dos hepatócitos, à esteatohepatite não alcoólica (*NASH*, do inglês). Esta última é definida pela presença de esteatose hepática e inflamação, com lesão por balonização dos hepatócitos, apresentando ou não fibrose. A *NASH* pode progredir para cirrose, através de diferentes mecanismos de lesão hepática que levam à necroinflamação e à fibrogênese (causando uma distorção pronunciada da arquitetura vascular hepática), insuficiência hepática e raramente carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) (Chalasani et al., 2012; Tsochatzis et al., 2014; Brea et al., 2017; Sinha-Hikim et al., 2017).

A doença hepática gordurosa não alcoólica afeta globalmente até 25% da população mundial, representando um grande problema de saúde em adultos e crianças. É apontada nos países ocidentais como o tipo mais comum de doença hepática crônica. Na Ásia, a estimativa da *NAFLD* é menor (5 a 18%). Já a prevalência da *NASH* no mundo foi estimada entre 2-3% (Satapathy e Sanyal, 2015; Younossi et al., 2016; Uppal et al., 2016; Magee et al., 2016).

Em relação à *NAFLD* no Brasil, não há estudos recentes que abordem a prevalência na população geral. Há estudos pontuais que relatam que a prevalência pode ser de 35,2% entre os pacientes de meia-idade (com idade igual ou superior a 55 anos) (Karnikowski et al., 2007). Outro estudo, onde homens e mulheres assintomáticos foram avaliados com ultrassonografia hepática, mostrou uma prevalência de *NAFLD* de 36%, mas dentro desse resultado pacientes com síndrome metabólica e pacientes obesos obtiveram prevalência de 74% e 73%, respectivamente (Oni et al., 2015). E por fim, em estudo com pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica, a *NAFLD* foi encontrada em 95% dos pacientes e o diagnóstico histológico de *NASH* foi de 66,7% (Feijó et al., 2013).

A prevalência da *NAFLD* está entre as principais causas de cirrose hepática, hepatocarcinoma celular e transplante hepático. A progressão da esteatose simples para *NASH* está estimada entre 10-20%. O caso específico de esteatose simples para cirrose ocorre em menos de 5% dos casos, enquanto a *NASH* progride para cirrose em 10-15% dos casos ao longo de 10 anos e com o risco aumentado de progressão na presença de fibrose avançada (25-30% dos casos). A evolução de cirrose para hepatocarcinoma celular foi estimada em 2,4 a 12,8%. A idade parece ser um importante fator, visto que a maior prevalência é relatada em adultos com idades entre 40 a 49 anos, enquanto em idades superiores a 60 anos a prevalência é duas vezes maior que em indivíduos com 20 anos de idade. Já em crianças, a prevalência tem uma grande variação (13% a 80%), sendo a obesidade um fator com forte influência. Além disso, a prevalência de *NAFLD* varia nitidamente ao comparar indivíduos de diferentes raças e etnias. As taxas são mais elevadas nas populações hispânicas (45%) em comparação com as brancas não hispânicas (33%) e afroamericanas (24%) (LaBrecque et al., 2014; Satapathy e Sanyal, 2015; Doulberis, 2017).

1.2.1 Fatores envolvidos na fisiopatologia da *NAFLD*

O fígado é o principal local de síntese e metabolismo de lipídeos. A esteatose hepática caracteriza-se pelo acúmulo excessivo de triglicérides nos hepatócitos quando o influxo e a síntese *de novo* lipídica excede a capacidade de exportação e utilização lipídica hepática (Adams e Lindor, 2007). A esteatose leva a lipotoxicidade, o que provoca a apoptose, necrose, geração de estresse oxidativo e inflamação. A lesão crônica resultante ativa uma resposta fibrogênica. No entanto, os mecanismos que conduzem a esta evolução permanecem desconhecidos (Marra et al., 2008).

A ativação da lipogênese hepática pode acontecer por várias vias metabólicas. A síntese direta de triglicerídeos é estimulada tanto pelo influxo de ácidos graxos livres (AGL) provenientes dos adipócitos hipertrofiados, como por dietas ricas em ácidos graxos saturados, colesterol, glicose e/ou frutose, resultando na maior expressão de enzimas lipogênicas (SCD1, FAS, ACC e DGAT). Esses nutrientes também podem estimular indiretamente a síntese de triacilgliceróis via hiperinsulinemia e/ou resistência insulínica hepática induzindo a síntese *de novo* através de fatores de transcrição lipogênicos (PPAR γ , SRBP1c e ChRBP). Além disso, a lipotoxicidade gerada por esse

acúmulo de gordura favorece a redução da capacidade oxidativa do hepatócito, verificado pela diminuição das concentrações de L-CPT-1 e PPAR α (Xu et al., 2013).

Indivíduos com *NAFLD* são altamente resistentes à insulina, no que se refere ao: (i) músculo, porque eles apresentam reduzida captação de glicose (Bugianesi et al., 2005); (ii) fígado, porque eles mostram supressão prejudicada de produção endógena de glicose hepática (Bugianesi et al., 2005; Gastaldelli et al., 2006a,b) e (iii) tecido adiposo, porque eles exibem altas taxas lipolíticas e aumento de AGL circulantes (Sanyal et al., 2001; Bugianesi et al., 2005).

Apesar do progresso obtido para a compreensão de como a gordura se acumula no fígado, a patogênese da forma avançada da *NAFLD* permanece por esclarecer. Várias hipóteses têm sido propostas recentemente. Em geral, existe uma associação entre *NAFLD* e resistência à insulina com exceção de algumas condições genéticas específicas que afetam o metabolismo lipídico (Kantartzis et al., 2009a,b; Amaro et al., 2010; Lonardo et al., 2011; Stefan et al., 2011). De acordo com a hipótese original (“*two-hits*”), a esteatose hepática é uma doença progressiva na qual a resistência à insulina (“primeiro *hit*”) conduz a um aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado. Se os AGL não são oxidados ou secretados, a esteatose hepática se desenvolve (Day e James, 1998). A esteatose hepática predispõe o fígado ao “segundo *hit*”, tal como disfunção mitocondrial, citocinas, adipocinas, estresse do retículo endoplasmático (*ER*, do inglês) e endotoxinas bacterianas. Esta hipótese original foi modificada para sugerir que a *NAFLD* pode ser uma consequência de paralelos “múltiplos *hits*”. Neste modelo, a resistência à insulina (RI) conduz ao aumento da lipogênese e aumento da absorção de AGL pelo fígado. A lipotoxicidade sensibiliza o fígado à lesão por “múltiplos *hits* paralelos” (danos oxidativos, ativação de vias fibrogênicas, ativação de células estreladas hepáticas, expressão alterada de adipocinas), que levam à *NASH* e fibrose (Tilg e Moschen, 2010; Petta et al., 2016).

Pacientes com *NASH* apresentam disfunção mitocondrial, a qual resulta principalmente da RI e do excesso de AGL (lipotoxicidade). Esse dano mitocondrial causa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inicia a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica das membranas mitocondriais e danos no DNA mitocondrial (DNAm) podem contribuir para a diminuição da função mitocondrial e perpetuar a geração de EROs (Varela-Rey et al., 2009).

A peroxidação lipídica é um potencial candidato na patogênese da *NASH* (Pessayre et al., 2001), uma vez que a peroxidação das membranas mitocondriais pode causar diretamente a necrose/apoptose e gerar megamitocôndria. Os aldeídos, produtos finais da peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), podem estimular a síntese de proteínas de matriz extracelular por células hepáticas estreladas (CHE) com ligação cruzada à citoqueratinas para formar corpos de Mallory e estimular a quimiotaxia de neutrófilos (Zamara et al., 2004). Os produtos da peroxidação lipídica podem também iniciar uma cascata que conduz à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que levará ao aumento da transcrição de várias citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e ligantes de morte por hepatócitos e células não-parenquimatosas (Moore et al., 2001; Ribeiro et al., 2004). O grau de peroxidação lipídica se correlaciona com a disponibilidade de ácidos graxos, o que pode causar danos consideráveis no fígado esteatótico (Benzie, 1996). MDA e HNE estão aumentadas em 90% nos pacientes com *NASH* em comparação com pacientes com esteatose, ilustrando o aumento de estresse oxidativo (Loguercio et al., 2001).

As citocinas também são candidatos para um papel na progressão da *NAFLD* por razões semelhantes àsquelas descritas para EROs e peroxidação lipídica. Em primeiro lugar, as citocinas são capazes de produzir todas as alterações histológicas clássicas da *NASH* incluindo morte/apoptose de hepatócitos (TNF- α /TGF β), quimiotaxia de neutrófilos (IL-8), ativação de CHE (TNF- α /TGF β) e corpos de Mallory (TGF β) (Pessayre et al., 2001). Além disso, citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) podem desempenhar um papel na resistência à insulina hepática e sistêmica associada com *NASH* (Arkan et al., 2005). Em terceiro lugar, os estudos em pacientes com obesidade relacionada com *NASH* têm mostrado que, em comparação com os controles obesos, pacientes com *NASH* tem um aumento da expressão de RNAm de TNF- α e dos seus receptores no fígado e tecido adiposo, com o aumento da expressão correlacionando-se com a gravidade histológica (Crespo et al., 2001).

O aumento do tecido adiposo na obesidade é associado com o desequilíbrio na produção de diversos mediadores pró- e anti-inflamatórios (Kanda et al., 2006). As adipocinas desempenham um papel decisivo na cascata inflamatória (Hasegawa et al., 2001; Ding et al., 2005; Ouchi et al., 2011). A adiponectina, quando aumentada, inibe a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Ouchi et al., 2000; Masaki et al., 2004; Wolf et al., 2004), incluindo o TNF- α . Ainda melhora o metabolismo glicêmico e lipídico

(Ouchi et al., 2000; Wolf et al., 2004). Em indivíduos que apresentaram uma redução nos teores circulantes de adipocinas foram observadas várias disfunções metabólicas associadas, tais como diabetes, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Funahashi et al., 2004), sugerindo a existência de associação entre hipoadiponectinemia e o estabelecimento da síndrome metabólica. Por outro lado, os níveis plasmáticos de leptina, que desempenha um papel central no controle da ingestão de alimentos e do gasto energético, estão aumentados em doentes obesos (Friedman e Halaas, 1998; Chitturi et al., 2002), os quais apresentam resistência à leptina favorecendo o aumento da ingestão calórica. A resistina intra-hepática também está aumentada em pacientes com *NASH* e as células inflamatórias contribuem para a sua expressão (Bertolani et al., 2006).

Os efeitos deletérios de dietas ricas em gordura (DRG) têm sido bastante documentados, relacionados não só com aumento de peso e tecido adiposo (Winzell e Ahren, 2004; Lee et al., 2011). A administração de DRG aumentou a esteatose hepática após oito semanas (Oliveira et al., 2014) e a esteatohepatite não alcoólica após 12 semanas (Dixon et al., 2013; van der Heijden et al., 2015) em camundongos C57black/6. Nosso grupo desenvolveu um modelo de esteatose hepática utilizando uma dieta com 30% de gordura por 10 semanas. Neste estudo, os dados histopatológicos mostraram que o grupo dieta hiperlipídica apresentou esteatose hepática, inflamação lobular e balonização hepatocelular significativamente elevados (Barroso et al., 2018).

A literatura não dispõe de uma terapêutica específica para a *NAFLD*, sendo utilizadas terapias de combate aos fatores que predis põem a essa doença hepática. Logo, as estratégias de tratamento para a *NAFLD* têm girado em torno da identificação e tratamento de condições metabólicas comumente associadas, tais como: diabetes, obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina e hiperlipidemia (Adams e Angulo, 2006; Machado e Cortez-Pinto, 2012).

A pesquisa por novas fontes de tratamento para prevenção da hiperglicemia e suas complicações vem se intensificando no mundo todo, inclusive com o isolamento de metabólitos secundários ativos presentes em plantas medicinais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais e auxilia os pesquisadores na seleção de espécies para estudos botânicos, farmacológicos e fitoquímicos (Hostettmann et al., 2003).

Esses vegetais representam uma importante fonte alternativa farmacológica por apresentar uma variedade de estruturas químicas com diferentes mecanismos de ação, apresentando o potencial de atingir vários alvos no organismo. Isso favorece a utilização de doses menores e por consequência, leva a menores riscos de efeitos colaterais (Ali et al., 2006).

Muitas plantas são conhecidas na medicina popular e regional de diferentes culturas por suas propriedades hipoglicêmicas (Trojan-Rodrigues et al., 2012). Entre elas, alguns estudos confirmam o uso popular antidiabético do gênero *Musa*, pertencente à família Musaceae, originário da Ásia, que apresenta uma grande diversidade de variedades conhecidas como bananas. Atualmente é cultivado na maioria dos países tropicais, sobretudo no Brasil, com destaque para a faixa litorânea. A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo e constitui uma importante fonte alimentar com alto valor nutricional (Pereira e Maraschin, 2015; Vu et al., 2018).

1.3 Banana (*Musa* spp)

1.3.1 Banana e seu uso tradicional

A banana é uma fruta com propriedades nutricionais e fins terapêuticos consagrados, sendo cultivada amplamente nos trópicos como fonte de alimento e renda para a população. As bananas são sistematicamente classificadas em quatro seções, *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* e *Callimusa*, de acordo com o número de cromossomos. Os frutos diferem apenas no seu arranjo ploidia e um único nome científico pode ser dado a todas as bananas comestíveis, isto é, *Musa* spp. (Pereira e Maraschin, 2015).

Silva (2005) descreveu algumas plantas medicinais de Goiás, Brasil, e entre elas a *Musa* spp. A bananeira tem um valor local e tradicional importante por tratar as pessoas anêmicas. O suco do pseudocaule é adoçado e administrado oralmente quando na diarreia. Por administração tópica, este suco é empregado para lavar úlceras. A infusão das flores da bananeira em água, seguida por um descanso durante a noite, é usada para tratar problemas de saúde nos olhos. O xarope de flores da bananeira é usado para curar problemas pulmonares. A banana verde é usada na cicatrização de feridas por aplicação tópica e no câncer.

Estudos indicam que o consumo frequente de frutas pode estar relacionado com o retardamento do envelhecimento e prevenção de certas doenças, como câncer e doenças

cardiovasculares, que estão relacionados com o estresse oxidativo celular causado pelos radicais livres (Wang et al., 1997; Bae et al., 2008; Kawasaki et al., 2008; Wright et al., 2008).

Segundo a medicina tradicional iraniana, as bananas são prescritas para pacientes com depressão (Tavakkoli-Kakhki et al., 2014). Os frutos de banana da Índia são tradicionalmente usados para ajudar a curar ou prevenir um grande número de doenças e condições de saúde como depressão, anemia e controle da pressão sanguínea (Kumar et al., 2012). Os frutos também são usados contra a constipação, azia, úlceras e estresse (Bhutani e Atal, 1984; Kumar et al., 2012).

A casca da banana é conhecida pelo seu uso tradicional na cicatrização (principalmente de queimaduras), depressão, anemia, controle da pressão arterial, diarreia, úlceras, inflamação, diabetes, tosse, mordida de cobra e excesso de menstruação (Anjum et al., 2014; Balbach, 1945; Bhutani e Atal, 1984; Emaga et al., 2007; Fries et al., 1950; Gore e Akolekar, 2003; Kumar et al., 2012; Pereira e Maraschin, 2015; Vu et al., 2018).

1.3.2 Compostos bioativos e atividades farmacológicas

O potencial biológico da casca e polpa da banana está diretamente relacionado com a sua composição química. Sabe-se que a polpa da banana e a casca contêm alguns metabólitos secundários na sua composição como, por exemplo, catecolaminas (L-dopa e dopamina) (Kanazawa e Sakakibara, 2000), compostos fenólicos (Verde-Mendez et al., 2003), carotenoides (Van den Berg et al., 2000) e piridoxina (vitamina B6) (Leklem, 1999). Muitos dos compostos voláteis das bananas, tais como os ésteres (Pérez et al., 1997) e álcoois (Nogueira et al., 2003), desempenham um papel importante nas propriedades aromáticas de bananas de sobremesa.

As partes da planta *Musa* sp., que incluem raízes, pseudocaules, caules, folhas e flores têm sido muito utilizados na medicina popular local e tradicional na África, Índia, Ásia, Oceania e América (Passo Tsamo et al., 2015). Investigações enfatizaram suas atividades antioxidante, antibacteriana, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, antidiabéticas e anticâncer (Imam e Akter, 2011). Os compostos fenólicos são acreditados por serem parcialmente responsáveis por essas propriedades (Jwala et al., 2012). Flavonoides, incluindo flavonas (apigenina), flavanonas (naringenina) e flavonóis (miricetina, *kaempferol* e *quercetina*), foram encontrados na seiva das diversas espécies de bananeira

de sobremesa (Pothavorn et al., 2010). Pigmentos de antocianina (petunidina, malvidina, pelargonidina, delfinidina, cianidina e peonidina) foram identificados em brácteas de bananas selvagens (Kitdamrongsont et al., 2008). Epigallocatequina foi identificado como o principal constituinte de taninos condensados nas polpas em diferentes bananeiras cultivadas e bananeira de sobremesa (Uclés Santos et al., 2010), e uma leucocianidina (flavan-3,4-diol) foi identificada na polpa de banana como uma molécula ativa antiulcerogênica (Lewis et al., 1999).

A dopamina foi identificada na popular banana comercial *Musa cavendishii*. A banana continha níveis elevados de dopamina, tanto na casca quanto na polpa, e os níveis de dopamina variaram de 80-560 mg por 100 g de casca e 2,5-10 mg de celulose, mesmo nas bananas amadurecidas prontas para comer. Sua atividade mostrou uma forte ação antioxidante (Kanazawa e Sakakibara, 2000).

Passo Tsamo e colaboradores (2015) investigaram os perfis fenólicos da polpa e da casca de nove bananeiras cultivadas, comparando-os aos de duas bananas de sobremesa de interesse comercial (Grande Nain e Gros Michel), ao lado de um híbrido recém-criado, resistentes à sigatoka negra (F568). Ácidos hidroxicinâmicos, particularmente o ácido ferúlico-hexoside, prevaleceram na polpa de banana e mostrou uma grande diversidade entre as cultivares. Glicosídeos flavonoides foram predominantes nas cascas de banana, sendo a rutina o mais abundante. Uma análise dos componentes principais em conjunto revelou que os perfis fenólicos do híbrido, das bananas de sobremesa e das bananas puras diferiam entre si. As polpas de banana e cascas apareceram como boas fontes de compostos fenólicos.

A composição química dos componentes lipofílicos da polpa madura do fruto da banana, a partir de várias bananeiras pertencentes às espécies *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, foi realizada por Vilela e colaboradores. As bananeiras mostraram valores semelhantes de extrativos lipofílicos (cerca de 0,4% do peso do material seco), bem como composições químicas qualitativas. Os principais grupos de compostos identificados nestas frações foram ácidos graxos e esteróis, sendo 68,6-84,3% e 11,1-28,0%, respectivamente, da quantidade total de componentes lipofílicos. Foram também identificadas quantidades menores de álcoois alifáticos de cadeia longa e α -tocoferol (Vilela et al., 2014).

A composição química dos extratos lipofílicos da polpa verde e cascas de banana “Dwarf Cavendish” também foram estudadas. Os ácidos graxos, esteróis e ésteres foram

as principais famílias de componentes lipofílicos presentes nos tecidos da banana, seguido de diacilgliceróis, glicosídeos de estéril, ácidos graxos de cadeia longa e compostos aromáticos. Os ácidos graxos são mais abundantes na polpa da banana, representados pelos ácidos linoleico, linolênico e oleico. Na casca da banana, os esteróis representam cerca de 49-71% do extrato lipofílico com duas cetonas triterpênicas (31-*norcyclolaudenone* e ciclohexanona) como os principais componentes. A detecção de quantidades elevadas de ésteres e diacilgliceróis foram principalmente presentes no extrato da casca de banana (Oliveira et al., 2008).

Os extratos da farinha da casca de banana exibiram um elevado teor de compostos fenólicos flavonoides: prodelfinidinas altamente polimerizados, seguido de um teor menor de glicosídeos de flavonoides, dímeros de procianidina tipo B e monoméricos flavan-3-óis (Rebello et al., 2014).

Em relação às atividades farmacológicas apresentadas pela banana, a polpa do fruto da espécie *Musa sapientum* L. var. *Cavendishii* foi testada quanto ao seu efeito na concentração do colesterol. A polpa de banana liofilizada mostrou um efeito hipocolesterolêmico quando incorporada numa dieta. Ambas as fibras solúveis e insolúveis fracionadas a partir da polpa de banana tiveram um efeito na redução do colesterol (Horigome et al., 1992).

Em relação à atividade hipoglicemiante, as espécies do gênero *Musa* apresentam grande potencial. O tratamento com o extrato metanólico de *Musa sapientum* L, nas doses de 200 e 250 mg/Kg, de ratos diabéticos induzidos por aloxana, reduziu os níveis de glicemia em jejum, hemoglobina glicada e glicosúria, além de melhorar a resposta periférica no teste de tolerância oral à glicose (Pari e Maheswari, 1999).

Outra função encontrada na fibra e no amido resistente, que está presente nas cascas e fruto de espécies do gênero *Musa*, está relacionada com o hormônio GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*, do inglês). Este hormônio é um potente agente antidiabetogênico, o qual estimula a secreção de insulina, inibe a secreção de glucagon, além de retardar o esvaziamento gástrico (Ramos et al., 2010; Pimentel e Zemdegs, 2010). Um estudo realizado em humanos mostrou que o consumo de 50 g de amido resistente numa refeição aumentou os níveis de GLP-1 e reduziu a glicemia pós-prandial em homens jovens, saudáveis e com peso normal (Raben et al., 1994).

Fontes de fibra dietética podem induzir saciedade e interferir no consumo de energia. Voluntários saudáveis consumiram farinha de banana não madura, rica em amido

resistente, três vezes por semana, por seis semanas. O amido resistente reduziu significativamente a fome e os parâmetros de saciedade aumentaram, conforme avaliado pela escala analógica visual (EAV) e hormônios grelina e peptídeo YY. As alterações no escore EAV e nos níveis hormonais foram seguidas por uma redução de 14% no consumo de energia. A insulina em jejum após a ingestão da farinha de banana mostrou maior sensibilidade pelos índices HOMA2-IR ou QUICKI quando comparado aos grupos de referência e controle (Sardá et al., 2016).

Nosso grupo também estudou os efeitos da banana utilizando uma formulação oral à base do extrato hidroalcoólico das cascas de *Musa cavendish* (banana) sobre a síndrome metabólica induzida por prednisona. A administração da formulação (100 e 250 mg/Kg) por 60 dias, paralelamente à prednisona, mostrou-se bastante eficiente em evitar a elevação da glicemia e dos valores lipídicos, reduzindo fatores de riscos cardiovasculares, além de não causar toxicidade nas funções hepática e renal (Sales Junior, 2015).

2 HIPÓTESE

Devido às suas particularidades, em especial o seu baixo custo, a banana é consumida em todo o mundo e pode ser considerada uma fruta importante devido ao seu potencial como alimento funcional e nutracêutico. Apesar de haver estudos que apontam para os efeitos benéficos da casca e da polpa de banana na resposta metabólica do organismo, esses estudos ainda não foram aplicados aos benefícios da casca verde da banana em um modelo experimental de *NAFLD* induzida por dieta hiperlipídica, avaliado tanto na proteção quanto no tratamento contra os distúrbios metabólicos associados à obesidade.

Resultados prévios do nosso grupo (Sales Junior, 2015) indicaram que a administração da formulação oral à base do extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de *Musa cavendish* (EHB), paralelamente à prednisona, foi eficiente em evitar a elevação da glicemia e de lipídeos, reduzindo fatores de riscos cardiovasculares. Diante desse potencial do EHB em atuar nas vias do metabolismo glicêmico e lipídico, acreditamos que ele seja capaz de proteger e/ou atenuar a doença do fígado gorduroso não alcoólico induzida por dieta hiperlipídica.

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Como supracitado, formas mais graves da doença hepática, como a esteatohepatite não alcoólica, se desenvolvem quando um processo inflamatório se instala secundariamente às desordens metabólicas, tais como a resistência insulínica. Considerando a *NASH* um grande problema de saúde pública e diante dos potenciais antidiabetogênicos apresentados pela casca e polpa de *Musa cavendish*, postulamos que o tratamento com o extrato das cascas verdes do fruto desta espécie vegetal possa contribuir para prevenir e tratar complicações metabólicas derivadas do consumo crônico de dietas hiperlipídicas. Desta forma, poderemos responder à população e à comunidade científica quanto à confirmação dos efeitos sobre o metabolismo e a inflamação apresentados pelo extrato dessa planta, uma vez que esses estudos ainda não foram aplicados em um modelo animal de *NAFLD* induzida por dieta hiperlipídica.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar a composição química e os efeitos do extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de *Musa cavendish* como modelo de tratamento preventivo e farmacológico da doença do fígado gorduroso não alcoólico induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

4.2 Específicos

4.2.1 Preparar o extrato hidroalcoólico das cascas verdes do fruto de *Musa cavendish* (EHB), determinar a sua composição e formular o xarope para administração nos camundongos

Estratégia: O EHB foi preparado com etanol a 70% e a caracterização química de seus compostos foi feita por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ. Em seguida, o EHB foi incorporado no xarope não glicogênico e administrado nas concentrações finais de 100 e 250 mg/Kg de peso corporal, por gavagem.

4.2.2 Induzir a doença do fígado gorduroso não alcoólico e realizar o tratamento preventivo e farmacológico com o EHB

Estratégia: O tratamento preventivo consistiu na administração do xarope não glicogênico nas concentrações finais do EHB de 100 e 250 mg/Kg de peso corporal por gavagem oral

pelo período 12 semanas, em paralelo com a dieta rica em gordura para a indução da *NAFLD*. Já o tratamento farmacológico consistiu na administração da dieta rica em gordura pelo período de 12 semanas para a indução da *NAFLD* e em seguida os camundongos receberam o xarope não glicogênico na concentração final do EHB de 100 mg/Kg de peso corporal por gavagem oral pelo período 8 semanas, em paralelo com a administração da dieta rica em gordura ou não.

4.2.3 Verificar os efeitos da administração do EHB sobre o peso e desenvolvimento da obesidade

Estratégia: A composição corporal e instalação da obesidade foram avaliadas pelo cálculo do Índice de Lee. Durante todo o período de tratamento a avaliação do desenvolvimento ponderal foi realizada uma vez por semana e o ganho relativo de peso corporal foi calculado.

4.2.4 Avaliar os efeitos da administração do EHB sobre a resistência insulínica periférica

Estratégia: Foi avaliado pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste de tolerância à insulina (TTI).

4.2.5 Determinar se o tratamento com o EHB promove alterações na quantidade do tecido adiposo

Estratégia: Os camundongos tratados com o EHB foram eutanasiados para avaliação do acúmulo de tecido adiposo marrom interescapular e branco (periepididimal e retroperitoneal).

4.2.6 Examinar as ações do EHB sobre os parâmetros bioquímicos plasmáticos do metabolismo glicêmico e lipídico, bem como da função hepática

Estratégia: As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas através de método colorimétrico, utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). Os ácidos graxos livres foram quantificados por método colorimétrico enzimático utilizando o *kit* comercial *HR Series NEFA-HR* (2) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd). As concentrações plasmáticas de insulina foram determinadas utilizando o *kit* comercial *Rat/Mouse Insulin ELISA*

(#EZRMI-13K, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). As concentrações de polipeptídeo inibitório gástrico (GIP), resistina e leptina no plasma foram determinadas utilizando o *kit* comercial *MILLIPLEX® MAP Mouse Metabolic Magnetic Bead Panel* (#MMHMAG-44K, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA).

4.2.7 Investigar os efeitos do tratamento com o EHB sobre a histologia hepática

Estratégia: As amostras de fígado foram coradas com hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas segundo o critério de *score* para esteatose, inflamação lobular e *balloning* hepatocelular, para a classificação do grau de esteatose e esteatohepatite não alcoólica (Kleiner et al., 2005).

4.2.8 Determinar os efeitos do tratamento com o EHB sobre o conteúdo lipídico e glicogênico no tecido hepático

Estratégia: As amostras frescas de fígado dos camundongos foram homogeneizadas e extraídas, a fim de quantificar os lipídeos totais usando um método previamente descrito (Schwartz & Wolins, 2007) e os triglicérides e colesterol foram quantificados nos extratos hepáticos utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). O teor de glicogênio hepático foi extraído utilizando um método previamente descrito (Hoy et al., 2007) e a concentração de glicose, indicando o conteúdo de glicogênio hepático, foi determinada utilizando *kit* comercial (Labtest Diagnóstica SA, Brasil).

4.2.9 Definir os efeitos do tratamento com o EHB sobre a inflamação do tecido hepático e o mecanismo envolvido

Estratégia: As citocinas IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β e a quimiocina MIP-2 foram dosadas no tecido hepático por ELISA, com *kit* da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). O envolvimento do NF- κ B p65 nuclear foi realizada de acordo com as instruções do *kit* colorimétrico NF- κ B *Family Transcription Factor Assay* (Abcam®).

4.2.10 Averiguar os efeitos do tratamento com o EHB sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicêmico, lipídico e inflamação

Estratégia: Foi feita a extração de RNAm do tecido hepático e a expressão de PPAR- α , PPAR- γ , ACOX, GPAT1, GPAT4, DGAT2, HMG-CoA redutase, CYP7A1 e CPT-I foi avaliada por PCR em tempo real. A fosforilação de IRS1 em serina (302) foi avaliado por *Western Blotting*.

4.2.11 Pesquisar se o tratamento com o EHB modula a produção de marcadores antioxidantes

Estratégia: Foram determinadas a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) através da inibição da auto-oxidação do pirogalol em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices) (Victorino et al., 2016). Já a concentração de glutathiona total no tecido hepático foi avaliada por *kit* colorimétrico para glutathiona (BioVision), seguindo as instruções do fabricante.

5 METODOLOGIA

5.1 Material botânico

As amostras de *Musa cavendish* (banana Pacovan) foram adquiridas no Centro Estadual de Abastecimento S/A (CEASA) do município de São Luís, localizada no bairro do Cohafuma, área urbana da capital do Maranhão, Brasil. O material é proveniente de pequenos agricultores da cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil. Uma amostra da espécie vegetal foi encaminhada ao Herbário Maranhense (MAR), do Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sendo catalogada pelo professor Dr. Eduardo B. de Almeida Jr. sob o número 8782.

5.2 Preparo do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (banana Pacovan)

Após a coleta e limpeza com papel umedecido com água destilada, as cascas verdes (265 g) da espécie vegetal *in natura* foram manualmente separadas da polpa, cortadas em pedaços, trituradas em turbolizador com etanol 70% (proporção de 1:3 peso/volume), submetidas à maceração durante 72 horas e em seguida filtrada a vácuo. Este procedimento foi repetido três vezes. O filtrado das três extrações foi reunido, concentrado em rotaevaporador LABOROTA 4000 (60 °C/100 rpm) e congelado. O material liofilizado obtido foi de 31,1 g (rendimento de 11,7%) e chamado de extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB).

5.3 Caracterização dos compostos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ do EHB

Para o HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ, foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. O extrato foi purificado por extração em fase sólida (*SPE*, do inglês) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 que foram previamente ativados com 3 mL de metanol e equilibrados com 5 mL de metanol:água (1:1, v/v). Os compostos foram eluidos dos cartuchos usando 2 mL de metanol:água (9:1, v/v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de filtro de *PTFE* 0,22 µm e diluídas em solução de metanol/água (8:2) para obter uma concentração aproximada da solução de 5,0 mg/mL a fim de traçar o perfil cromatográfico.

Utilizou-se um sistema de HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), consistindo em um modelo de distribuição de solvente com uma bomba recíproca de pistão duplo, detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5 µm C18 100 A (250 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (ácido acético a 2% em água) e B (ácido acético a 2% em metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 95% A/5% B, como inicial em 30 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o tempo de corrida foi de 50 min. A temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os dados foram coletados e processados usando o *software LC Solution* (Shimadzu).

A análise foi realizada em um LC-ESI-IT-MS conectado em um espectrômetro de massa LTQ XL Thermo Scientific®. A coluna analítica utilizada para a separação por LC foi uma Kinetex® C18 (2,1 x 100 mm, 100 Å e 5 µm). A análise foi realizada com água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (B) acrescidos de 0,1% de ácido fórmico em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% B em 10,5 minutos, a uma vazão de 0,4 mL/min. A amostra foi infundida no espectrômetro de massa do sistema de HPLC, onde a amostra foi analisada conectada pelo ESI-MS em negativo. Os dados do espectro de massa foram obtidos no mesmo LTQ XL.

Para o ensaio FIA-ESI-IT-MSⁿ, a infusão de fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador de armadilha iônica linear *Thermo Scientific LTQ XL*, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (*ESI*, do inglês), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, voltagem do *spray* de 5,00 kV, voltagem do capilar de -90 V, lente tubular de -100 V e fluxo de 5 µL/min. Uma análise de varredura completa foi registrada na faixa *m/z* de 100-1000. Fragmentações de múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram realizadas usando o método de

dissociação induzida por colisão (*CID*, do inglês) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquele intervalo de *m/z*. O segundo evento de varredura foi um experimento de MS/MS realizado usando uma varredura dependente de dados nas moléculas-[*M-H*] dos compostos de interesse em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 min. Os íons do produto foram submetidos à fragmentação adicional nas mesmas condições, até que não fossem mais observados fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com os dados da literatura.

5.4 Formulação do xarope

O xarope não glicogênico apresenta a seguinte composição: sorbitol 25%; metabissulfito de sódio 0,05%; sacarina 0,1%; nipagim 0,01%; água destilada q.s.p. 500 mL. Este foi administrado nas concentrações finais do EHB de 100 e 250 mg/Kg de peso corporal por gavagem. Os grupos não tratados receberam apenas veículo de xarope não glicogênico de acordo com o peso corporal. Para esse fim, o volume de gavagem foi de 1% (mL/g) do peso corporal do camundongo (por exemplo, 30 g de camundongo devem receber 300 µL) e alterado com base na mudança de peso corporal.

5.5 Delineamento experimental

5.5.1 Animais

Camundongos machos (C57black/6) de aproximadamente oito semanas, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram acondicionados em gaiolas contendo quatro ou cinco animais cada, à temperatura de 23 ± 2 °C, umidade de $54 \pm 9\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e ração. Os animais passaram por um período de aclimação de uma semana antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP, aprovado sob o protocolo de número 917/2017.

5.5.2 Dietas

A dieta padrão para roedores utilizada foi a Nuvilab® (Quimtia S/A, Colombo, Paraná, Brasil), que apresenta a seguinte composição: 22% de proteína, 55% de

carboidrato, 7 g de fibras, 4,5% de lipídeo e 2,95 Kcal/g. Já a dieta hiperlipídica utilizada contém 52,95% de carboidratos, 20% de proteínas, 30% lipídeos (10% de óleo de coco, 20% de óleo de soja), 5% de celulose, 3,5% de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 0,3% de L-cistina, 0,25% de Bitartarato de colina e 5 Kcal/g (QualityNutri®, Campinas, São Paulo, Brasil).

5.5.3 Indução da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) e tratamento preventivo com o EHB

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n = 7-10/grupo): grupo controle (CTR; n = 10), que recebeu ração padrão para roedores e xarope não glicogênico; grupo dieta hiperlipídica (DHL; n = 10), que recebeu uma dieta rica em gordura e xarope não glicogênico; dois grupos tratados com o EHB nas concentrações finais de 100 (100 mg/Kg; n = 8) e 250 (250 mg/Kg; n = 7) mg/Kg, em paralelo com a dieta rica em gordura. Todos os tratamentos com o EHB e xarope foram realizados por gavagem diariamente e duraram 12 semanas.

5.5.4 Indução da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) e tratamento farmacológico com o EHB

Os camundongos foram inicialmente distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n = 8-32/grupo): grupo controle (CTR; n = 8), que recebeu ração padrão para roedores por um período de 12 semanas; grupo dieta hiperlipídica (DHL; n = 32), que recebeu uma dieta rica em gordura pelo mesmo período para a indução da NAFLD. Em seguida, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n = 8/grupo): grupo controle (CTR), que recebeu ração padrão para roedores e xarope não glicogênico; grupo dieta hiperlipídica (DHL), que recebeu uma dieta rica em gordura e xarope não glicogênico; grupo dieta hiperlipídica com o EHB (DHE), que recebeu uma dieta rica em gordura e administração do xarope na concentração final do EHB de 100 mg/Kg; grupo dieta padrão com xarope (CX), que voltou a receber dieta padrão para roedores e xarope não glicogênico; grupo dieta padrão com EHB (CE), que voltou a receber dieta padrão para roedores e administração do xarope na concentração final do EHB de 100 mg/Kg. Todos os tratamentos com o EHB e xarope foram realizados por gavagem diariamente e duraram oito semanas.

5.6 Avaliação do desenvolvimento da obesidade

O ganho de peso corporal foi monitorado semanalmente e o ganho relativo de peso corporal foi calculado pela seguinte fórmula: $\text{ganho de peso corporal relativo (\%)} = (\text{GP} \times 100) / \text{PI}$, considerando: GP (peso final - peso inicial) e PI (peso inicial) (Lamas et al., 2018). O Índice de Lee [$\text{peso corporal (g)}^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)}$] $\times 1000$ foi calculado para avaliar a progressão da obesidade mensalmente (Bernardis e Patterson, 1968).

5.7 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Os animais foram mantidos em jejum alimentar de seis horas, com fornecimento de água *ad libitum*. Em seguida, foram submetidos à coleta de uma alíquota de sangue por via caudal para verificar os níveis basais de glicose (tempo zero), utilizando um glicosímetro digital (Accu-Chek Active®; Roche Diagnostics System, Branchburg, NJ, EUA). O TOTG foi realizado após administração oral de glicose (4 g/Kg peso corporal) por gavagem. Novas alíquotas de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose (Gonçalves et al., 2005, com adaptações).

5.8 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Os animais foram mantidos em jejum alimentar de seis horas, com fornecimento de água *ad libitum*. Em seguida, foram submetidos à coleta de uma alíquota de sangue por via caudal para verificar os níveis basais de glicose (tempo zero), utilizando um glicosímetro digital (Accu-Chek Active®; Roche Diagnostics System, Branchburg, NJ, EUA). Após a coleta inicial, foi administrada insulina, na dose de 2 UI/Kg de peso corpóreo, via intraperitoneal. Novas alíquotas de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos, após a injeção de insulina (Asensio et al., 2005).

5.9 Eutanásia, coleta de sangue e tecidos

Após os períodos de tratamentos e jejum noturno (aproximadamente 12 horas), os camundongos foram pesados, anestesiados com xilazina (8 mg/Kg intraperitoneal) e cetamina (10 mg/Kg intraperitoneal), submetidos à laparotomia para coleta de sangue por punção da aorta abdominal e submetidos à eutanásia por nível hipovolêmico de sangue. Em seguida, os tecidos adiposos periepididimal, retroperitoneal e marrom foram coletados e pesados para avaliação morfométricas. O fígado foi pesado e separado em

duas porções: uma amostra conservada em formol 10% para avaliação histológica e a outra amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para análises futuras. A razão do peso dos tecidos foi expressa em 10 g de peso corporal.

5.10 Determinações bioquímicas plasmáticas

As amostras de sangue dos camundongos foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 min. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) através de método colorimétrico (espectrofotometria), utilizando *kits* comerciais, conforme técnica descrita pelo fabricante (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). Os ácidos graxos livres foram quantificados por método colorimétrico enzimático utilizando o *kit* comercial *HR Series NEFA-HR(2)* (Wako Pure Chemical Industries, Ltd). As concentrações plasmáticas de insulina foram determinadas utilizando o *kit* comercial *Rat/Mouse Insulin ELISA* (#EZRMI-13K, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), conforme técnica descrita pelo fabricante. Os ensaios acima foram realizados em um espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices). As concentrações de polipeptídeo inibitório gástrico (GIP), resistina e leptina no plasma foram determinadas utilizando o *kit* comercial *MILLIPLEX® MAP Mouse Metabolic Magnetic Bead Panel* (#MMHMAG-44K, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em um sistema MAGPIX® e os dados foram coletados pelo *software* Luminex xPONENT.

5.11 Análises no tecido hepático

5.11.1 Histologia

As amostras de fígado fixadas em formol 10% passaram pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão, para posterior microtomia em cortes de 5µm de espessura e coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (100x e 400x), segundo o critério de *score* para *NAFLD* de acordo com o grau de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e *ballooning* hepatocelular (0–2) (Kleiner et al., 2005).

5.11.2 Quantificação de triglicérides e colesterol total

Os lipídeos totais foram extraídos do tecido hepático fresco dos camundongos em jejum noturno (n = 7-10/grupo) utilizando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1). Após agitação vigorosa e uma breve centrifugação, a fase orgânica foi recolhida, seca e ressuspensa em Triton X-100:metanol (2: 1) (Freedman et al., 2005). Os triglicérides e o colesterol total foram quantificados utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Brasil) por espectrofotometria (VERSAmax Molecular Devices).

5.11.3 Glicogênio

O conteúdo de glicogênio hepático foi medido utilizando o método previamente descrito por Hoy et al. (2007). Basicamente, amostras de fígado foram digeridas com 1M de NaOH a 60 °C e centrifugadas a 10.000 g por 10 min. O glicogênio precipitado com etanol foi dissolvido em água pura. Depois, adicionou-se amiloglicosidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 0,6 mg/mL em tampão acetato a 0,25 M, pH 4,75) e digeriu-se o glicogênio durante 6 horas a 37 °C. A concentração de glicose, indicando o conteúdo de glicogênio hepático, foi determinada utilizando *kit* comercial (Labtest Diagnóstica SA, Brasil) por espectrofotometria (VERSAmax Molecular Devices).

5.11.4 Extração de proteínas e dosagem de citocinas

Para a extração total de proteínas do fígado, aproximadamente 300 mg de tecido pulverizado foram homogeneizadas em 1 mL de solução RIPA (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de TRITON X-100, 150 mM de NaCl, 0.1% de SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/mL pepstatina A, 100mM PMSF) e levado a leve agitação constante por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm/4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram diluídas 50 vezes para quantificação e foi utilizada uma diluição seriada de albumina de soro bovino como padrão. A leitura foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices).

As citocinas IL-10, TNF- α , IL-6, MIP-2 e IL-1 β foram dosadas por ELISA, com *kit* da *R&D Systems* (Minneapolis, MN, USA), conforme protocolo do fabricante.

5.11.5 Extração de proteínas nucleares e quantificação de NF- κ B p65 nuclear

Para a extração de proteínas nucleares do fígado, aproximadamente 30 mg de fígado pulverizado foram homogeneizadas em reagentes específicos contendo inibidores de proteases, e a extração foi realizada de acordo com as especificações do *kit Subcellular Protein Fractionation* (Thermo Fisher Scientific). Foram extraídas as frações de extrato citoplasmático, de membrana, nuclear solúvel, nuclear da cromatina e citoesquelética. Para a quantificação do NF- κ B p65 nuclear foi utilizada a fração de extrato nuclear solúvel, de acordo com as instruções do *kit* colorimétrico NF- κ B *Family Transcription Factor Assay* (Abcam[®]) e a leitura foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices). O NF- κ B p65 nuclear foi expresso em absorbância por miligrama de proteína.

5.11.6 Detecção do conteúdo proteico por *Western Blotting*

Avaliamos o conteúdo proteico do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) fosforilado na serina 302 (Cell Signaling[®]) no tecido hepático. Para tal, após o tratamento dos camundongos, o tecido hepático foi retirado e as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1mg/mL pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm/4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Amostras de 120 μ g de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra, submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE em gel 8% de poliacrilamida para p-IRS1. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho semi-drytransfer (Biorad). Em seguida, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de BSA (albumina bovina) em tampão TBST por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em TBST e incubadas com anticorpos primários contra as proteínas de interesse numa diluição de 1:1000 *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase numa diluição de 1:20000 e expostas ao sistema de detecção SuperSignal (Pierce). O conteúdo das proteínas analisadas foi comparado por densitometria de gel, utilizando o programa de domínio público “Image J”, criado por Wayne Rasband do National Institute of Mental Health, NIH, USA.

5.11.7 Extração de RNA e avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios e metabólicos por RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)

Para a extração do RNA total foi adicionado 1 mL de TRIzol (Invitrogen®) nas alíquotas de fígado pulverizado, sendo mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio por amostra, com posterior homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada centrifugação por 15 minutos a 12.000 g/4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e as demais frações desprezadas. Foram adicionados 500 µL de isopropanol, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O produto foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anterior, e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foi adicionado 1 mL de etanol 75%, sendo realizada nova centrifugação, durante 5 minutos a 7.000 g/4 °C. O álcool residual foi retirado e a amostra ressuspensa em ± 20 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm, correspondente ao pico de absorção de RNA, e 280 nm, correspondente ao pico de absorção de proteínas, no equipamento NanoVue (GE HealthCare).

A expressão dos genes de interesse foi determinada por *Real Time-PCR* com sequências de iniciadores específicos (Invitrogen®), como segue abaixo, utilizando o *kit* SuperScript III Platinum® SYBR Green One-Step (Invitrogen®) no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). O resultado foi calculado sob a razão $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão do gene *housekeeping* $\beta 2M$, também determinado por *Real-Time PCR*. A reação de RT-PCR foi realizada com 15 µL de volume total, sendo 1,45 µL de água deionizada estéril, 7,5 µL SYBR Green qPCR super Mix-UDG (Invitrogen), 0,3 µL de *SuperScript*, 0,3 µL de cada *primer* (sense e antisense) a 10 pmol/mL, 0,3 µL de ROX e 5 µL de RNA (100 ng) diluído em água DEPC.

As sequências dos *primers* foram desenhadas conforme dados do *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sintetizadas pela Invitrogen®. Os genes pesquisados foram: PPAR- α (receptor ativado por proliferador de peroxissoma- α), PPAR- γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma- γ), GPAT1 (Glicerol-3-fosfato aciltransferase-1), GPAT4 (Glicerol-3-fosfato aciltransferase-4), DGAT2 (diacilglicerol O-aciltransferase 2), HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase, CPT-I (carnitina palmitoil transferase 1), ACOX (acetil-CoA oxidase) e CYP7A1 (colesterol 7 α -hidroxilase). As sequências de iniciadores (*primers*) utilizados

para a realização de RT-PCR no fígado dos camundongos foram: PPAR- α : sense- ATGCCAGTACTGCCGTTTTC; antisense- GGCCTTGACCTTGTTTCATGT; PPAR- γ : sense- TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC; antisense- CGCAGGTTTTTGAGGAAGCTC; GPAT1: sense- GGAGCACCAGCAATTCATCACC; antisense- TGTGGCACTCTCAGCGTACACG; GPAT4: sense- TGGAGCCACTGTTTACCCTGTG; antisense- CCCAACTGGTCATCATCCTCAG; DGAT2: sense- ACGCAGTCACCCTGAAGAACC; antisense- GGAACCCTCCTCAAAGATCACC; HMG-CoA redutase: sense- TGGAGATCATGTGCTGCTTCG; antisense- ACCCTCACGGCTTTCACGAG; CPT-1: sense- CCATATTCAGGCAGCGAGAGC; antisense- AGGGATGCGGGAAGTATTGAAG; ACOX: sense- AGGGAATTTGGCATCGCAGACC; antisense- CTGCGCATAAGTGCCCGTGATC; CYP7A1: sense- CCGGATATCTAACGCTGTTTGG; antisense- CAAGCTCTCAGCCAGCCTTTC.

5.11.8 Determinação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima SOD foi realizada através da técnica de Marklund e Marklund (1974), com modificações. O composto pirogalol é auto-oxidante a 37 °C e gera radical superóxido e compostos que absorvem comprimentos de onda a 420 nm. Assim, a absorbância aumenta com o tempo sem a presença da enzima SOD. Para a dosagem da atividade da enzima SOD, as proteínas das amostras de fígado foram extraídas como descrito acima e diluídas para 1 mg/mL. A atividade da enzima SOD foi avaliada em solução contendo 170 μ L de tampão TRIS-HCl 50 mM/ EDTA 1 mM, pH 7,4, 20 μ L de amostra e 10 μ L de pirogalol (1,2 mg/mL). Para avaliar a auto-oxidação do pirogalol foi realizada uma curva contendo 190 μ L de tampão TRIS-HCl 50 mM/ EDTA 1 mM, pH 7,4 e 10 μ L de pirogalol. A inibição da auto-oxidação do pirogalol foi mensurada a 420 nm em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices), durante 5 minutos, a 37 °C. Os dados foram expressos como área abaixo da curva (Victorino et al., 2016).

5.11.9 Quantificação de glutathiona total

Aproximadamente 100 mg de fígado pulverizado foi homogeneizado em tampão de glutathiona, proveniente do *kit*, para preparação da amostra. Em seguida, 100 μ L de ácido

sulfossalicílico foi adicionado, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a dosagem de glutathione total foi realizada utilizando um *kit* colorimétrico para glutathione (BioVision), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada a 412 nm em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices). Os dados foram expressos em nanograma por miligrama de proteína (Victorino et al., 2016).

5.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de *One-way* análise de variância (*One-way* ANOVA) para múltiplas comparações, seguida de pós-teste Newman-Keuls, usando *GraphPad Prism*, Inc software, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos compostos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ do EHB

Com o auxílio de um detector ultravioleta (UV/Vis) acoplado a um sistema de HPLC, um perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) foi realizado, como mostrado na Figura 1. Foi detectado que o EHB apresenta grande complexidade e diversidade na matriz, avaliado pelo grande número de picos eluídos ao longo da corrida cromatográfica. Após o auxílio do HPLC-UV/Vis, os dados cromatográficos foram processados e a identificação dos diferentes compostos do EHB por LC-ESI-IT/MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ foi feita para uma determinada classe de metabólitos secundários. O cromatograma de íons totais do EHB no modo negativo está representado na Figura 2, mostrando os picos dos diferentes compostos identificados. Encontramos a presença de derivados de ácidos fenólicos, flavonóides agliconas, flavonóides glicosídicos e catecolaminas pela presença de espectros com bandas características dessas classes na amostra analisada (Figura 1). Um total de 12 compostos foi identificado no EHB (Tabela 1).

Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) adquiridos por LC-UV/Vis (254 nm). Utilizou-se um sistema de HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), detector UV-VIS (SPA-10A). Os dados foram coletados e processados usando o software *LC Solution* (Shimadzu).

Figura 2: Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) adquirido por LC-ESI-IT/MS (-). A análise foi realizada em um LC-ESI-IT-MS conectado em um espectrômetro de massa LTQ XL Thermo Scientific®. A amostra foi infundida no espectrômetro de massa do sistema de HPLC, onde a amostra foi analisada conectada pelo ESI-MS em negativo. Os dados do espectro de massa foram obtidos no mesmo LTQ XL.

Tabela 1: Identificação dos compostos do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) por LC-ESI-IT/MS e FIA-ESI-IT/MSⁿ. Para o ensaio FIA-ESI-IT-MSⁿ, a infusão de fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador de armadilha iônica linear *Thermo Scientific LTQ XL*, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com os dados da literatura. *NI: não identificado.

Número	Tempo de retenção (min)	[M-H] ⁻	MS ⁿ fragmentos	Composto
1	3.36	341	179;161	Ácido cafeico 3-glicosídeo
2	3.84	377	359;341	Derivado do ácido cafeico 3-glicosídeo
3	4.52	379	361;341;289;173;161	Derivado do ácido cafeico 3-glicosídeo
4	4.83	191	173;111	Ácido Quínico
5	5.69	179	161;141;135;99	Ácido cafeico
6	6.80	165	147;75	Ácido Propiônico
7	7.46	593	431;285;267;257	Kaempferol-O-rhamnoside-hexoside
8	7.60	609	447; 301	Rutina
9	8.06	473	455;429;399	NI*
10	8.72	699	589;551;477;403;268	Sennoside A
11	9.19	697	679;661;589	NI*
12	9.61	305	287; 263	Galocatequina
13	9.93	290	271	Catequina
14	10.12	193	126	L-dopa
15	11.09	152	124; 78	Dopamina

6.2 Resultados do tratamento preventivo com o EHB

6.2.1 O EHB previne o ganho de peso corporal e o crescimento do tecido adiposo dos animais

Quando os camundongos foram alimentados com uma dieta rica em gordura por 12 semanas, um aumento significativo no peso corporal final foi observado nestes animais (grupo DHL) em comparação com o grupo controle (CTR), que recebeu dieta padrão para roedores (** $p < 0,01$, Figura 3A). Ambos os grupos tratados com o EHB, 100 e 250 mg,

apresentaram um peso corporal final reduzido em comparação com o grupo DHL ($**p<0,01$, Figura 3A, respectivamente), permanecendo no nível do grupo CTR. Resultados semelhantes foram observados no ganho relativo de peso corporal (Figura 3B). Além disso, ambas as doses do EHB apresentaram menor ganho relativo de peso corporal em comparação com o grupo CTR (100 mg *versus* CTR $###p<0,0001$, 250 mg *versus* CTR $#p<0,05$, Figura 3B).

Durante a administração da dieta e o tratamento por gavagem oral com o EHB, a instalação da obesidade também foi avaliada pelo Índice de Lee (IL). Observamos que os animais tratados por 12 semanas com a dieta hiperlipídica (DHL) e o EHB nas doses de 100 e 250 mg apresentaram um menor IL, bem como o grupo CTR, quando comparados ao grupo DHL ($***p<0,0001$, Figura 3D). Nenhuma variação no IL foi observada antes do tratamento entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figura 3C). Além disso, ambas as doses do EHB mostraram uma diminuição significativa no IL em comparação com o grupo CTR (100 mg *versus* CTR $##p<0,01$, 250 mg *versus* CTR $#p<0,05$, Figura 3D).

Figura 3: Avaliação do peso corporal e Índice de Lee dos animais. O peso corporal final (A), ganho de peso corporal relativo (B) e Índice de Lee inicial (C) e final (D) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,0001$ - 100 mg versus CTR; # $p < 0,05$ - 250 mg versus CTR.

A dieta hiperlipídica aumentou o acúmulo de gordura corporal no grupo DHL, em comparação com o grupo CTR, como pode ser observado pela maior quantidade de tecido adiposo, representado pelas gorduras retroperitoneal e periepididimal (** $p < 0,0001$, Figuras 4A e 4B, respectivamente). Quando os grupos foram tratados com ambas as doses do EHB, observamos menores depósitos destes tecidos adiposos (** $p < 0,0001$, Figuras 4A e 4B, respectivamente) em comparação com o grupo DHL. Não houve diferença significativa entre os grupos CTR, 100 e 250 mg em relação ao peso corporal final e tecidos adiposos retroperitoneal e periepididimal (ns - não significativo) (Figuras 3A, 4A e 4B, respectivamente). O tecido adiposo marrom interescapular não apresentou variação entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figura 4C).

Figura 4: Avaliação do peso do tecido adiposo branco e marrom dos animais. O peso do tecido adiposo retroperitoneal (A), periepididimal (B) e marrom interscapular (C) em relação a 10 gramas de peso corporal (pc) foi determinado após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.2 O EHB previne a intolerância à glicose e a resistência à insulina, bem como a elevação da glicemia de jejum dos animais

Avaliamos a glicemia de jejum dos animais ao final do tratamento. Observamos que os grupos tratados com ambas as doses do EHB apresentaram glicemia de jejum significativamente menor (** $p < 0,0001$, Figura 5A).

Apenas a dose do EHB de 100 mg inibiu significativamente a intolerância à glicose (** $p < 0,0001$, Figuras 5B e 5C) e a resistência à insulina (* $p < 0,05$, Figuras 5D e 5E) induzida pela ingestão de uma dieta hiperlipídica nos camundongos.

Figura 5: Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste de tolerância à insulina (TTI) dos animais. A glicemia de jejum (A) foi determinada após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. O TOTG (B) e a área sob a curva (ASC) do TOTG (C) foram determinados após 10 semanas. O TTI (D) e a ASC do TTI (E) foram determinados após 11 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.3 O EHB previne o aumento dos parâmetros bioquímicos lipídicos e hepáticos dos animais

Os parâmetros lipídico e hepático foram avaliados no plasma dos animais e o tratamento com o EHB preveniu as alterações causadas pela dieta hiperlipídica. Observamos que o tratamento com o EHB na dose de 100 mg preveniu o aumento

significativo dos triglicérides ($*p<0,05$, Figura 6A), colesterol total ($***p<0,0001$, Figura 6B), colesterol-LDL ($**p<0,01$, Figura 6C) e ácidos graxos livres (AGL) ($*p<0,05$, Figura 6D). Já ambos os tratamentos com o EHB aumentaram significativamente o colesterol-HDL ($**p<0,01$, Figura 6E). Apenas a dose mais elevada do EHB apresentou efeito na aspartato aminotransferase (AST) ($*p<0,05$, Figura 7A) e nenhuma alteração na alanina aminotransferase (ALT) (ns - não significativo, Figura 7B) foi observada quando comparados ao grupo DHL.

Figura 6: Perfil lipídico plasmático dos animais. Os triglicérides (A), colesterol total (B), colesterol-LDL (C), ácidos graxos livres (D) e colesterol-HDL (E) foram dosados no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 7-10). $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

Figura 7: Parâmetros hepáticos plasmáticos dos animais. A aspartato aminotransferase (AST) (A) e a alanina aminotransferase (ALT) (B) foram dosadas no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.4 O EHB previne o aumento dos hormônios no plasma dos animais

A ingestão de dieta rica em gordura aumentou os níveis de insulina e leptina no plasma dos camundongos. Ambas as doses do EHB preveniram o aumento dos níveis de insulina em comparação com o grupo DHL (* $p < 0,05$, Figura 8A, respectivamente). Apenas o EHB na dose de 100 mg preveniu o aumento da leptina em comparação com o grupo DHL (* $p < 0,05$, Figuras 8B). Por outro lado, os níveis de GIP total e resistina não apresentaram variações entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figuras 8C e 8D, respectivamente).

Figura 8: Hormônios e adipocinas dosadas no plasma dos animais. Os níveis de insulina (A), leptina (B), polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) total (C) e resistina (D) foram dosados no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.5 O EHB previne a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) dos animais

Avaliamos o peso do fígado (Figura 9A) e observamos que os grupos tratados com ambas as doses do EHB e o grupo CTR apresentaram um peso maior quando comparados ao grupo DHL (** $p < 0,0001$ e * $p < 0,05$, Figura 9A, respectivamente). A avaliação histológica do tecido hepático mostra que a ingestão de uma dieta hiperlipídica induziu alterações hepáticas nos camundongos, apontando para uma esteatose grave. O grupo DHL apresentou esteatose hepática representada por acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, inflamação lobular devido a alguns infiltrados inflamatórios observados em poucas áreas do parênquima hepático e *ballooning* hepatocelular (Figura 9B e Tabela 2). Ambas as doses administradas de EHB levaram a uma redução no acúmulo de lipídeos no citoplasma do hepatócito em comparação com o grupo DHL, diminuindo o *score* de esteatose (** $p < 0,0001$, Figura 9B e Tabela 2). O tratamento com o EHB também reduziu

a inflamação lobular ($*p<0,05$) e o *ballooning* hepatocelular ($***p<0,0001$) (Figura 9B e Tabela 2, respectivamente). Todas as avaliações histológicas analisadas nos camundongos tratados com o EHB alcançaram níveis semelhantes aos apresentados pelo grupo CTR (ns - não significativo).

Figura 9: Avaliação do peso e histologia do tecido hepático dos animais. O peso do tecido hepático (A) foi avaliado nos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. As secções histológicas do tecido hepático dos animais (B) foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e o espectro de amostra é de uma área de 100 µm. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). $*p<0,05$ e $***p<0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

Tabela 2: Score da avaliação histológica do tecido hepático dos animais. As lâminas foram analisadas segundo o critério de *score* para classificação do grau de *NAFLD/NASH* como descrito na metodologia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls.

NAFLD/NASH <i>Score</i> *	CTR	DHL	100 mg	250 mg
Esteatose	0.00 $\pm$ 0.00***	1.60 $\pm$ 0.22	0.00 $\pm$ 0.00***	0.28 $\pm$ 0.18***
Inflamação Lobular	0.00 $\pm$ 0.00***	0.80 $\pm$ 0.13	0.37 $\pm$ 0.18*	0.28 $\pm$ 0.18*
Ballooning Hepatocelular	0.00 $\pm$ 0.00***	1.50 $\pm$ 0.16	0.12 $\pm$ 0.12***	0.28 $\pm$ 0.18***

*Kleiner et al., *Hepatology*, 41, 2005. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

6.2.6 O EHB previne o aumento do conteúdo lipídico e aumenta o conteúdo de glicogênio no tecido hepático dos animais

Observamos que ambas as doses do EHB diminuíram o conteúdo de triglicérides (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, Figura 10A, respectivamente) e colesterol total (** $p < 0,01$, Figura 10B) quantificados no tecido hepático dos animais.

Avaliamos o conteúdo de glicogênio hepático e observamos que ambas as doses do EHB aumentaram o teor de glicogênio no fígado (** $p < 0,01$, Figura 10C).

Figura 10: Quantificação do conteúdo de triglicérides, colesterol e glicogênio no tecido hepático dos animais. O conteúdo de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicogênio (C) foi quantificado no fígado dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo DHL.

6.2.7 O EHB não altera o conteúdo de p-IRS-1 (ser 302)

Avaliamos a quantidade de receptor de insulina-1 (IRS-1) fosforilado na serina 302 e, embora não significativo, observamos um aumento desta fosforilação no grupo DHL, indicativo de inibição na cascata de sinalização de insulina (ns - não significativo, Figura 11). O tratamento com 250 mg de EHB parece reverter esse efeito.

Figura 11: Avaliação da fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) em ser(302). O conteúdo de IRS-1 ser(302) foi quantificado no fígado dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas por *Western blotting*. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 2$). ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.8 O EHB previne o aumento da expressão gênica de enzimas no tecido hepático dos animais

Avaliamos a biossíntese de triglicérides no tecido hepático através da expressão gênica do glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT). Observamos que a expressão gênica do GPAT1 não mostrou diferença entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figura 12A). Entretanto, ambas as doses do EHB reduziram a expressão do gene GPAT4 quando comparado com o grupo DHL ($*p < 0,01$, Figura 12B). Também avaliamos a via metabólica de produção do colesterol através da expressão gênica da HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase e observamos a sua expressão estava aumentada nos grupos CTR e na dose de 100 mg do EHB quando comparados ao grupo DHL ($*p < 0,05$, Figura 12C).

Avaliamos a expressão gênica da enzima de transporte de ácidos graxos carnitina palmitoil transferase-I (CPT-1) e não observamos variação em seus níveis entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figura 12D).

Avaliamos também a expressão da enzima acil-CoA oxidase (ACOX), que está envolvida na β -oxidação no fígado dos animais. Observamos que ambas as doses administradas do EHB aumentaram a expressão gênica dessa enzima quando comparadas ao grupo DHL ($*p < 0,05$, Figura 12E). Também avaliamos a enzima chave na rota de

síntese de ácidos biliares CYP7A1 (colesterol 7 α -hidroxilase) e sua expressão gênica estava aumentada no grupo que recebeu a dose de 100 mg de EHB em comparação ao grupo DHL (* p <0,05, Figura 12F).

Figura 12: Expressão gênica de enzimas no tecido hepático dos animais. A expressão gênica de GPAT1 (A), GPAT4 (B), HMG-CoA redutase (C), CPT-I (D), ACOX (E) e CYP7A1 (F) foi quantificada no fígado dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas, por PCR em tempo real. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 7-10). * p <0,05, ** p <0,01 e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.9 O EHB preveniu a elevação de citocinas inflamatórias e translocação nuclear do NF- κ B p65 no tecido hepático dos animais

A ingestão de dieta rica em gordura promoveu um estado de esteatohepatite não alcoólica, associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido. O conteúdo de

IL-10 aumentou nos animais tratados com ambas as doses do EHB em comparação com o grupo DHL (* $p<0,05$, Figura 13A). Por outro lado, as citocinas TNF- α (** $p<0,01$ e * $p<0,05$, Figura 13B, respectivamente), IL-6 (* $p<0,05$, Figura 13C), MIP 2 (** $p<0,01$ e * $p<0,05$, Figura 13D, respectivamente) e IL-1 β (* $p<0,05$, Figura 13E) foram significativamente diminuídas nos grupos tratados com o EHB.

Ao avaliarmos a translocação nuclear do NF- κ B p65, apenas a maior dose do EHB reduziu seu conteúdo em relação aos camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica (* $p<0,05$, Figura 13F). O grupo CTR também apresentou menor nível de NF- κ B p65 nuclear em relação ao grupo DHL (* $p<0,05$, Figura 13F).

Figura 13: Quantificação das citocinas e NF- κ B p65 nuclear no tecido hepático dos animais. IL-10 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), MIP-2 (D), IL-1 β (E) e NF- κ B p65 nuclear (F) foram dosados no tecido hepático dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 7-10). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.2.10 O EHB previne o aumento do estresse oxidativo no tecido hepático dos animais

O estresse oxidativo causado pela administração de uma dieta hiperlipídica foi avaliado pela quantificação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona total no tecido hepático. Observamos que ambas as doses do EHB aumentaram significativamente a atividade da SOD, representada pela inibição da auto-oxidação do pirogalol (* $p<0,05$ e *** $p<0,0001$, Figura 14A, respectivamente). Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais em relação à quantificação de glutathiona total (ns - não significativo, Figura 14B). Ambas as defesas antioxidantes foram maiores no grupo CTR quando comparado ao grupo DHL (* $p<0,05$, Figuras 14A e 14B, respectivamente).

Figura 14: Quantificação de marcadores antioxidantes no tecido hepático dos animais. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (A) e concentração de glutathiona total (B) foram dosadas no tecido hepático dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), nas doses de 100 e 250 mg, por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 7-10$). * $p<0,05$, *** $p<0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.3 Resultados do tratamento farmacológico com o EHB

6.3.1 O EHB diminui o ganho de peso corporal e o tecido adiposo dos animais

Quando os camundongos foram alimentados com uma dieta rica em gordura por todo o período de tratamento (20 semanas) e tratados com xarope não glicogênico nas últimas oito semanas, observamos um aumento significativo no peso corporal final nestes animais (grupo DHL) em comparação com o grupo controle (CTR), que recebeu dieta padrão para roedores durante todo o período de tratamento (20 semanas) e xarope não glicogênico nas últimas oito semanas (*** $p<0,0001$, Figura 15A). Quando os camundongos foram alimentados com uma dieta rica em gordura por todo o período de tratamento (20 semanas) e tratados com xarope contendo o EHB na dose de 100 mg nas

últimas oito semanas, observamos uma diminuição significativa no peso corporal final nestes animais (grupo DHE) em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15A). Ambos os grupos que foram tratados com a dieta hiperlipídica por 12 semanas e voltaram a receber dieta padrão normolipídica nas últimas 8 semanas apresentaram um peso corporal final reduzido em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15A), independente de receber xarope não glicogênico ou o EHB na dose de 100 mg. O peso corporal final dos animais dos grupos CX e CE não diferiram entre si e permaneceram ao nível do grupo controle (ns - não significativo, Figura 15A).

Avaliamos o ganho relativo de peso corporal dos animais durante o período do tratamento farmacológico, que equivaleu às últimas oito semanas (Figura 15B). Observamos que os animais do grupo DHL continuaram ganhando peso corporal, correspondente a um aumento de 13,76%. Já o grupo CTR diminuiu 3,34% do seu peso corporal durante esse período, sendo significativamente menor do que o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15B). Além disso, ambos os grupos tratados com o EHB (DHE e CE) e o grupo CX apresentaram uma redução significativa do ganho de peso corporal relativo quando comparado ao grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15B, respectivamente), que correspondeu a 3,34%, 17,58% e 17,62%, respectivamente. Sendo que o ganho de peso corporal relativo dos animais dos grupos CTR *versus* DHE e CX *versus* CE não diferiram entre si (ns - não significativo, Figura 15B).

Durante a administração da dieta e o tratamento por gavagem oral com o EHB, a instalação da obesidade também foi avaliada pelo Índice de Lee (IL). Observamos inicialmente que os animais tratados por 12 semanas com a dieta hiperlipídica (DHL) apresentaram um maior IL quando comparados ao grupo CTR ($^{***}p<0,0001$, Figura 15C). Quando os animais foram tratados com o EHB (grupo DHE) por oito semanas, um menor IL foi observado quando comparados ao grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15D). Além disso, ambos os grupos que voltaram a receber a dieta padrão normolipídica, diferindo apenas se recebiam (CE) ou não (CX) o EHB, mostraram uma diminuição significativa no IL em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figura 15D). O IL entre os grupos CTR, CX e CE não diferiram entre si (ns - não significativo, Figura 15D).

Figura 15: Avaliação do peso corporal e Índice de Lee dos animais. O peso corporal final (A), ganho de peso corporal relativo (B) e Índice de Lee inicial (C) e final (D) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

A dieta hiperlipídica aumentou o acúmulo de gordura corporal no grupo DHL, em comparação com o grupo CTR, como pode ser observado pelo tecido adiposo mais pesado, representado pelas gorduras retroperitoneal e periepididimal (** $p < 0,0001$, Figuras 16A e 16B, respectivamente). Quando os grupos foram tratados com o EHB (grupos DHE e CE), observamos menores depósitos dos tecidos adiposos (** $p < 0,0001$, Figuras 16A e 16B, respectivamente) em comparação com o grupo DHL. O grupo CX apresentou também um menor acúmulo dos tecidos adiposos avaliados quando comparado ao grupo DHL (** $p < 0,0001$, Figuras 16A e 16B, respectivamente). O tecido adiposo marrom interescapular também apresentou uma diminuição nos grupos experimentais CTR, DHE, CX e CE quando comparados ao grupo DHL (** $p < 0,0001$, Figuras 16C). Entretanto, os grupos CTR, DHE, CX e CE não apresentaram variação entre si (ns - não significativo, Figura 16C).

Figura 16: Avaliação do peso do tecido adiposo branco e marrom dos animais. O peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (A), periepididimal (B) e marrom interscapular (C) em relação a 10 gramas de peso corporal (pc) foi determinado após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

6.3.2 O EHB diminuiu a intolerância à glicose e a resistência à insulina, bem como a glicemia de jejum dos animais

Inicialmente, realizamos o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e o teste de tolerância à insulina (TTI) após a ingestão de uma dieta hiperlipídica nos camundongos por 12 semanas. Observamos que o tratamento induziu uma elevação da glicemia de jejum (** $p < 0,0001$, Figuras 17A), bem como intolerância à glicose (* $p < 0,01$, Figuras 17B e 17C) e à insulina (* $p < 0,05$, Figuras 18A e 18B) no grupo DHL quando comparado ao grupo CTR.

Figura 17: Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e glicemia de jejum dos animais após a indução da NAFLD. A glicemia de jejum (A), o TOTG (B) e a área sob a curva (ASC) do TOTG (C) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 4-16$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

Figura 18: Teste de tolerância à insulina (TTI) e glicemia de jejum dos animais após a indução da NAFLD. O TTI (A) e a área sob a curva (ASC) do TTI (B) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) por 12 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 4-16$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo DHL.

Ao avaliarmos a glicemia de jejum dos animais após a realização do tratamento farmacológico por seis e sete semanas com o EHB, observamos que os grupos tratados com o EHB (DHE e CE) apresentaram glicemia de jejum significativamente menor (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$, Figuras 19A e 20A, respectivamente) em relação ao grupo DHL.

Os grupos CTR e CX também apresentaram uma diminuição na glicemia de jejum em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figuras 19A e 20A, respectivamente).

Após a realização do tratamento farmacológico por seis semanas com o EHB, uma diminuição significativa de intolerância à glicose foi observada nos grupos DHE ($^{*}p<0,05$, Figuras 19B e 19C) e CE ($^{**}p<0,01$, Figuras 19B e 19C), quando comparado ao grupo DHL. Os grupos CTR e CX também apresentaram uma diminuição de intolerância à glicose em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$ e $^{**}p<0,01$, Figuras 19B e 19C, respectivamente).

Após a realização do tratamento farmacológico por sete semanas com o EHB, uma diminuição significativa de intolerância à insulina foi observada nos grupos DHE ($^{***}p<0,0001$, Figuras 20B e 20C) e CE ($^{***}p<0,0001$, Figuras 20B e 20C), quando comparado ao grupo DHL. Os grupos CTR e CX também apresentaram uma diminuição de intolerância à insulina em comparação com o grupo DHL ($^{***}p<0,0001$, Figuras 20B e 20C, respectivamente).

Figura 19: Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. A glicemia de jejum (A), o TOTG (B) e a área sob a curva (ASC) do TOTG (C) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por seis semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$ e $^{***}p<0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

Figura 20: Glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina (TTI) dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. A glicemia de jejum (A), o TTI (B) e a área sob a curva (ASC) do TTI (C) foram determinados após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por sete semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

6.3.3 O EHB diminui os parâmetros bioquímicos lipídicos plasmáticos dos animais sem alterar os parâmetros bioquímicos hepáticos

Os parâmetros lipídico e hepático foram avaliados no plasma dos animais e o tratamento com o EHB diminuiu as alterações bioquímicas lipídicas causadas pela dieta hiperlipídica. Observamos que o tratamento nos grupos DHE e CE diminuiu significativamente os triglicérides (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$, Figura 21A, respectivamente), colesterol total (** $p < 0,0001$, Figura 21B), colesterol-LDL (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$, Figura 21C, respectivamente) quando comparados ao grupo DHL. Observamos também que os grupos CTR e CX que receberam apenas o xarope diminuiram significativamente os triglicerídeos (** $p < 0,01$, Figura 21A), colesterol total (** $p < 0,0001$, Figura 21B) e colesterol-LDL (** $p < 0,0001$, Figura 21C). Não observamos variação na concentração de ácidos graxos livres entre os grupos experimentais analisados (ns - não significativo, Figura 21D). Além disso, apenas o grupo DHE, que

recebeu o tratamento com o EHB, aumentou significativamente o colesterol-HDL (** $p<0,01$, Figura 21E) quando comparado ao grupo DHL. Os demais grupos experimentais analisados não apresentaram diferença em relação ao grupo DHL (ns - não significativo, Figura 21E). Também, não observamos variação na aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) entre os grupos experimentais analisados (ns - não significativo, Figuras 22A e 22B, respectivamente).

Figura 21: Perfil lipídico plasmático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. Os triglicérides (A), colesterol total (B), colesterol-LDL (C), ácidos graxos livres (D) e colesterol-HDL (E) foram dosados no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 8). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

Figura 22: Parâmetros hepáticos plasmáticos dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. A aspartato aminotransferase (AST) (A) e a alanina aminotransferase (ALT) (B) foram dosadas no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por 8 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 8). ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.3.4 O EHB diminui hormônios no plasma dos animais

A ingestão de dieta rica em gordura aumentou os níveis de insulina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23A), leptina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23B), polipeptídio inibitório gástrico (GIP) total ($^{**}p < 0,01$, Figura 23C) e resistina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23D) no plasma dos camundongos do grupo DHL em comparação ao grupo CTR. Observamos que o tratamento nos grupos DHE e CE diminuiu significativamente os níveis de destes mediadores no plasma dos camundongos em comparação ao grupo DHL. Observamos que os grupos CTR e CX, que receberam apenas o xarope, também diminuíram significativamente os níveis de insulina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23A), leptina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23B), polipeptídio inibitório gástrico (GIP) total ($^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,0001$, Figura 23C, respectivamente) e resistina ($^{***}p < 0,0001$, Figura 23D) no plasma dos camundongos em comparação ao grupo DHL.

Figura 23: Hormônios e adipocinas dosadas no plasma dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. Os níveis de insulina (A), leptina (B), polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) total (C) e resistina (D) foram dosados no plasma dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por 8 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

6.3.5 O EHB reverte à doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD, do inglês) dos animais

Avaliamos o peso do fígado (Figura 24A) e observamos que os grupos CTR, CX e CE apresentaram maior peso quando comparados ao grupo DHL (** $p < 0,0001$, Figura 24A, respectivamente). Entretanto, não houve variação no peso do fígado entre os grupos DHL e DHE (ns - não significativo, Figura 24A). Em relação à avaliação histológica do tecido hepático, a ingestão de dieta hiperlipídica intensificou as alterações hepáticas nos camundongos, apontando para uma esteatose grave. Sendo assim, o grupo DHL apresentou esteatose hepática (** $p < 0,0001$), inflamação lobular (** $p < 0,0001$) e *ballooning* hepatocelular (** $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo CTR (Figura 24B e Tabela 3). Ambos os grupos tratados com o EHB (DHE e CE) levaram a uma redução no acúmulo de lipídeos no citoplasma do hepatócito em comparação ao grupo DHL, diminuindo o *score* de esteatose (** $p < 0,0001$, Figura 24B e Tabela 3). O tratamento com

o EHB também reduziu a inflamação lobular ($**p<0,01$, Figura 24B e Tabela 3) e o *ballooning* hepatocelular ($***p<0,0001$, Figura 24B e Tabela 3) em comparação ao grupo DHL. O grupo CX também apresentou uma redução da esteatose hepática ($***p<0,0001$), inflamação lobular ($*p<0,05$) e *ballooning* hepatocelular ($***p<0,0001$) quando comparado ao grupo DHL (Figura 24B e Tabela 3). Todas as avaliações histológicas analisadas nos camundongos tratados com o EHB alcançaram níveis semelhantes aos apresentados pelo grupo CTR (ns - não significativo), exceto a esteatose ($##p<0,01$) observada no DHE quando comparado ao grupo CTR.

Figura 24: Avaliação do peso e histologia do tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. O peso do tecido hepático (A) foi avaliado nos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. As seções histológicas do tecido hepático dos animais (B) foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e o espectro de amostra é de uma área de 100 μ m. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

Tabela 3: Score da avaliação histológica do tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. As lâminas foram analisadas segundo o critério de *score* para classificação do grau de *NAFLD/NASH* como descrito na metodologia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *Kleiner et al., *Hepatology*, 41, 2005. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ versus DHL; ## $p < 0,01$ DHE versus CTR.

NAFLD/NASH <i>Score</i> *	CTR	DHL	DHE	CX	CE
Esteatose	0.00 $\pm$ 0.00 ***	2.75 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.20 ***##	0.00 $\pm$ 0.00 ***	0.00 $\pm$ 0.00 ***
Inflamação Lobular	0.00 $\pm$ 0.00 ***	1 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.16 **	0.50 $\pm$ 0.19*	0.37 $\pm$ 0.18 **
Ballooning Hepatocelular	0.00 $\pm$ 0.00 ***	1.63 $\pm$ 0.18	0.13 $\pm$ 0.13 ***	0.00 $\pm$ 0.00 ***	0.00 $\pm$ 0.00 ***

6.3.6 O EHB não interfere no acúmulo de triglicérides e colesterol e diminui o conteúdo de glicogênio no tecido hepático dos animais

O conteúdo lipídico do fígado foi avaliado e não observamos variação na quantificação dos triglicérides (ns - não significativo, Figura 25A) e colesterol total (ns - não significativo, Figura 25B) entre os grupos experimentais.

Avaliamos o conteúdo de glicogênio hepático e observamos que o grupo DHL apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo CTR (* $p < 0,05$, Figura 25C). Por outro lado, o grupo DHE diminuiu o teor de glicogênio no fígado (* $p < 0,05$, Figura 25C). Os grupos CX e CE não apresentaram diferenças no glicogênio hepático quando comparados ao grupo DHL (ns - não significativo, Figura 25C).

Figura 25: Quantificação do conteúdo de triglicérides, colesterol e glicogênio no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. O conteúdo de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicogênio (C) foi quantificado no fígado dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por 8 semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). * $p < 0,05$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.3.7 O EHB altera a expressão gênica de receptores e enzimas no tecido hepático dos animais

Avaliamos os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α (PPAR- α) e γ (PPAR- γ) e nenhuma diferença foi observada nas suas expressões gênicas entre os grupos experimentais (ns - não significativo, Figuras 26A e 26B, respectivamente).

Ao avaliarmos a enzima da síntese de triglicérides GPAT4 (Glicerol-3-fosfato aciltransferase-4), observamos que sua expressão gênica estava aumentada nos grupos CTR (** $p < 0,0001$), CX (** $p < 0,0001$) e CE (** $p < 0,0001$) quando comparados ao grupo DHL (Figura 26C). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos DHL e DHE (ns - não significativo, Figura 26C). A enzima DGAT2 (diacilglicerol O-aciltransferase 2) também foi avaliada e observamos que os grupos CTR e CE estavam significativamente diminuídos quando comparados com o grupo DHL (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, Figura 26D,

respectivamente). Já quando comparamos os grupos DHE e CX com o grupo DHL, nenhuma diferença foi observada (ns - não significativo, Figura 26D). Também avaliamos a enzima da via metabólica de produção do colesterol através da expressão gênica da HMG-CoA (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA) redutase e observamos que a sua expressão estava aumentada apenas no grupo DHE quando comparado ao grupo DHL ($*p<0,05$, Figura 26E). Os demais grupos não apresentaram diferença entre si (ns - não significativo, Figura 26E).

Avaliamos a expressão gênica da enzima de transporte de ácidos graxos carnitina palmitoil transferase-I (CPT-1) e a expressão gênica da enzima acil-CoA oxidase (ACOX) envolvida na β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria. A expressão de CPT-1 estava aumentada nos grupos CTR e CX quando comparados ao grupo DHL ($**p<0,01$, Figura 26F). Quando avaliamos os grupos DHL, DHE e CE nenhuma diferença foi observada entre eles (ns - não significativo, Figura 26F). E por fim, observamos que a expressão gênica da enzima ACOX estava aumentada nos grupos CTR ($***p<0,0001$) e CX ($***p<0,0001$) quando comparados ao grupo DHL (Figura 26G). Por outro lado, nenhuma diferença foi observada quando comparamos os grupos DHE e CE com o DHL (ns - não significativo, Figura 26G). Também avaliamos a enzima chave na rota de síntese de ácidos biliares CYP7A1 (colesterol 7α -hidroxilase) e nenhuma diferença foi observada quando comparamos os grupos experimentais (ns - não significativo, Figura 26H).

Figura 26: Expressão gênica de receptores e enzimas no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. A expressão gênica de PPAR- α (A), PPAR- γ (B), GPAT4 (C), DGAT2 (D), HMG-CoA redutase (E), CPT-I (F), ACOX (G) e CYP7A1 (H) foi quantificada no fígado dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ e ns - não significativo - em comparação com o grupo DHL.

6.3.8 O EHB diminui o conteúdo de citocinas inflamatórias no tecido hepático dos animais

A ingestão de dieta rica em gordura promoveu um estado de esteatohepatite não alcoólica, associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido. O conteúdo das citocinas IL-10 ($**p < 0,01$ e $***p < 0,0001$, Figura 27A, respectivamente), TNF- α ($*p < 0,05$ e $***p < 0,0001$, Figura 27B, respectivamente), IL-6 ($***p < 0,0001$, Figura 27C), MIP-2 ($*p < 0,05$, Figura 27D) e IL-1 β ($***p < 0,0001$, Figura 27E) foram significativamente diminuídos nos grupos tratados com a administração do EHB (DHE e CE, respectivamente) quando comparados ao grupo DHL. Os grupos CTR e CX também apresentaram as citocinas IL-10 ($***p < 0,0001$, Figura 27A), TNF- α ($***p < 0,0001$, Figura 27B), IL-6 ($*p < 0,01$ e $***p < 0,0001$, Figura 27C), MIP 2 ($*p < 0,01$, Figura 27D) e IL-1 β ($***p < 0,0001$, Figura 27E) significativamente diminuídas em comparação ao grupo DHL.

Figura 27: Quantificação das citocinas no tecido hepático dos animais após o tratamento farmacológico com o EHB. IL-10 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), MIP-2 (D) e IL-1 β (E) foram dosados no tecido hepático dos animais após o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) e extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB), por oito semanas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo DHL.

7 DISCUSSÃO

7.1 Caracterização química do EHB

A casca de banana pode ser considerada uma das fontes de plantas mais ricas em componentes na sua estrutura, destacando os compostos bioativos, especialmente em sua forma verde (Laufenberg et al., 2003; Fatemeh et al., 2012). O amadurecimento dos frutos

é um processo biologicamente complexo, tipicamente envolvendo mudanças na composição química, pigmentação, textura, sabor e outras características organolépticas (Giovannoni, 2004; Javanmardi e Kubota, 2006). As mudanças no conteúdo de compostos fitoquímicos são muito influenciadas pelo cultivo, região geográfica de produção, estágio de maturação da fruta na colheita, práticas de cultivo, tempo de colheita, manejo, processamento pós-colheita e condições de armazenamento (Pereira e Maraschin, 2015). A maturidade da fruta foi relatada por afetar significativamente o conteúdo fenólico da casca da banana, que diminui com o processo de amadurecimento (Vu et al., 2018; Fatemeh et al., 2012). Assim, utilizamos as cascas verdes para preservar o perfil dos metabólitos da produção no nosso extrato, assegurando que os mesmos metabólitos estarão presentes em todos os nossos estudos futuros deste extrato.

No presente estudo, caracterizamos a composição química do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) e detectamos um alto conteúdo de compostos fenólicos (como os ácidos fenólicos, polifenóis e flavonóides) e catecolaminas, como mostra a Tabela 1. Este estudo é consistente com pesquisas anteriores que também identificaram que a casca da banana é rica em compostos bioativos e antioxidantes, incluindo compostos fenólicos (González-Montelongo et al., 2010; Nguyen et al., 2003; Passo Tsamo et al., 2015), alto conteúdo de catecolaminas, como dopamina e L-dopa (González-Montelongo et al., 2010; Kanazawa e Sakakibara, 2000) e galocatequina (Kanazawa e Sakakibara, 2000; Someya et al., 2002). Glicosídeos flavonoides também foram predominantes nas cascas de banana, sendo a rutina o mais abundante (Passo Tsamo et al., 2015), assim como foi encontrado em nosso trabalho.

Outro estudo também relatou que extratos de farinha da casca de banana exibiram um elevado teor de compostos fenólicos: prodelphinidinas altamente polimerizados (cerca de 3952 mg/kg), seguido de um menor teor de glicosídeos de flavonoides (cerca de 129 mg/kg), dímeros de procianidina tipo B e monoméricos flavan-3-óis (em conjunto cerca de 126 mg/kg) (Rebello et al., 2014). Os compostos fenólicos presentes nos extratos de plantas medicinais são de grande interesse, pois dependendo da estrutura química, vários efeitos benéficos e suas implicações na saúde humana foram identificados (Korkina et al., 2009). Todos estes resultados aumentam o interesse pela utilização da casca de banana como uma fonte de compostos bioativos.

7.2 Tratamento preventivo e farmacológico com o EHB

Com o aumento da incidência de obesidade, a doença do fígado gorduroso não alcoólico (*NAFLD*, do inglês) tem sido considerada um importante problema de saúde pública (Song et al., 2016; Wang et al., 2017). Embora atualmente não existam medicamentos específicos registrados para esta doença, os sensibilizadores de insulina e os antioxidantes demonstraram serem úteis no tratamento da *NAFLD* (Gossard e Lindor, 2011; Gan et al., 2015). No entanto, em breve os produtos naturais poderão promover a terapia da esteatose hepática. Considerando os efeitos benéficos das cascas de banana sobre a resposta metabólica no organismo e o número limitado de estudos científicos focados em suas atividades biológicas, o presente estudo foi realizado para investigar os efeitos benéficos do extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB) como modelo de tratamento preventivo e farmacológico sobre a *NAFLD* em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica (DHL).

Nossos resultados mostram que o EHB previne e trata a obesidade associada ao desenvolvimento da *NAFLD* em camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídeos. O tratamento com o EHB preveniu o aumento e/ou diminuiu significativamente os seguintes parâmetros avaliados nos camundongos alimentados com uma DHL: peso corporal final (Figuras 3A e 15A), ganho de peso corporal relativo (Figuras 3B e 15B), índice de Lee final (Figuras 3D e 15D), peso do tecido adiposo (Figuras 4A, 4B, 16A e 16B), glicemia de jejum (Figuras 5A, 19A e 20A), intolerância à glicose (Figuras 5B, 5C, 19B e 19C), intolerância à insulina (Figuras 5D, 5E, 20B e 20C), triglicérides (Figuras 6A e 21A), colesterol total (Figuras 6B e 21B), colesterol-LDL (Figuras 6C e 21C), ácidos graxos livres (Figura 6D), AST (Figura 7A), insulina (Figuras 8A e 23A), leptina (Figuras 8B e 23B), GIP total (Figuras 8C e 23C), resistina (Figuras 8D e 23D), esteatose hepática (Tabelas 2 e 3), inflamação lobular (Tabelas 2 e 3), *ballooning* hepatocelular (Tabelas 2 e 3), triglicérides hepático (Figura 10A), colesterol total hepático (Figura 10B), glicogênio hepático (Figura 25C), GPAT4 (Figura 12B), DGAT2 (Figura 26D), TNF- α (Figuras 13B e 27B), IL-6 (Figuras 13C e 27C), MIP-2 (Figuras 13D e 27D), IL-1 β (Figuras 13E e 27E), NF- κ B p65 nuclear (Figura 13F). Além disso, nossos resultados mostram que o tratamento com o EHB aumentou significativamente: colesterol-HDL (Figuras 6E e 21E), peso do fígado (Figuras 9A e 24A), glicogênio hepático (Figura 10C), HMG-CoA redutase (Figuras 12C e 26E), ACOX (Figura 12E), CYP7A1 (Figura 12F), IL-10 (Figura 13A) e a enzima superóxido dismutase (Figura 14A). Os resultados

mostram que o EHB reduziu os valores para os níveis detectados no grupo controle (CTR), que recebeu apenas dieta padrão para roedores e xarope não glicogênico.

Os dados sugerem que a administração do EHB melhora a tolerância à glicose, bem como a sensibilidade à insulina nos camundongos alimentados com a DHL. O EHB também impediu e/ou melhorou o quadro de *NALFD*, a dislipidemia (colesterol LDL e total elevado e colesterol HDL baixo), o perfil de enzimas hepáticas, o acúmulo de glicogênio e citocinas pró-inflamatórias no fígado. Além disso, este estudo é inovador porque foi realizado com uma dieta rica em lipídeos, mostrando modificações específicas no metabolismo agravadas pela obesidade e prevenidas e/ou tratadas pelo EHB.

Com base nos achados do presente estudo, o tratamento com o EHB pode desempenhar um papel positivo na prevenção e progressão do diabetes, melhorando significativamente as alterações metabólicas citadas acima, que são características do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a *NAFLD* induzidos pela ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos (Oliveira et al., 2015; Tripathy e Chavez, 2010). Sabe-se que o consumo de dieta rica em gordura e o ganho de peso estão correlacionados com o aumento da resistência à insulina e dislipidemia, que são consequências da hipertrofia dos adipócitos, promovendo um microambiente pró-inflamatório (Emanuela et al., 2012; Song et al., 2016; Wang et al., 2017).

Alguns estudos existentes na literatura mostraram que diferentes espécies e porções de bananas exibem efeitos no metabolismo glicêmico e lipídico semelhantes aos observados no nosso estudo. No estudo de Navghare e Dhawale (2016), o tratamento com o extrato etanólico da parte interna das cascas de *Musa cavendish* reduziu os níveis de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-LDL, creatinina, colesterol-HDL, albumina e proteína total no soro e melhora no glicogênio hepático, quando comparados com ratos diabéticos tipo II induzidos por aloxana e não tratados. O estudo de Pari e Maheswari (1999) mostrou que a administração oral por 30 dias de 0,15, 0,20 e 0,25 g/Kg do extrato clorofórmico das flores de *Musa sapientum* melhorou significativamente a tolerância à glicose em ratos diabéticos induzidos por aloxana, tendo sido mais efetiva que a glibenclamida. Além disso, o extrato melhorou a sensibilidade periférica à ação da insulina, reduzindo a glicemia, hemoglobina glicada e glicosúria. Atividades anti-hiperglicêmicas *in vitro* de amostras da polpa da banana madura obtidas a partir de uma preparação aquosa, tais como *Musa sapientum* (Banana Latundana), *Musa acuminata*

(banana Cavendish) e *Musa acuminata* (Red Dacca), também foram observadas (Adedayo et al., 2016).

Em humanos, Raben et al. (1994) mostrou que o consumo de 50 g de amido resistente, presente nas cascas e fruto de espécies do gênero *Musa*, aumentou os níveis de GLP-1. Este hormônio é um potente agente antidiabetogênico, o qual estimula a secreção de insulina, inibe a secreção de glucagon, além de retardar o esvaziamento gástrico, e consequentemente, diminui a glicemia. A farinha de banana verde, rica em amido resistente, demonstrou levar a uma resposta glicêmica reduzida em voluntários saudáveis (Menezes et al., 2010). Além disso, a ingestão da farinha de banana levou a maior sensibilidade à insulina pelos índices HOMA2-IR (*Homeostasis Model Assessment 2-Insulin Resistance*, do inglês) ou QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*, do inglês) quando comparado aos grupos controles (Sardá et al., 2016).

Quanto aos efeitos no metabolismo lipídico, um estudo mostrou que a polpa do fruto da banana madura liofilizada (*Musa sapientum* L. var. Cavendishii) apresentou efeito hipocolesterolêmico quando incorporada a uma dieta no nível de 300 ou 500 g/Kg em ratos machos alimentados com uma dieta contendo banha (50 g/Kg) e colesterol (5 g/Kg), enquanto que a polpa de banana seca em corrente de ar quente (65 °C) não apresentou efeito. Os resultados também mostraram que os lipídeos da banana não afetaram a concentração de colesterol no soro. Além disso, ambas as fibras solúveis e insolúveis fracionadas a partir de polpa de banana madura tiveram um efeito na redução do colesterol, com exceção da celulose (Horigome et al., 1992). Além disso, efeitos benéficos sobre o controle glicêmico, o metabolismo lipídico e a pressão arterial também foram observados em ratos obesos alimentados com uma dieta rica em sacarose através da administração, por gavagem, do amido da banana verde sem casca (0,43 g/Kg de peso corporal) por quatro semanas (Olvera-Hernández et al., 2018).

Esses efeitos listados acima estão de acordo com nossos resultados, considerando que o tratamento com o EHB foi efetivo na regulação da hiperglicemia e da dislipidemia, atenuando o acúmulo de gordura, provavelmente baseado na regulação dos fatores relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico. Ainda assim, o EHB exerceu um melhor efeito anti-obesogênico do que os estudos anteriores observados após a adição da banana à ração dos animais (Horigome et al., 1992; Scarminio et al., 2012), principalmente relacionado ao controle preciso da dose e a alta concentração de compostos bioativos, tornando-se uma terapia mais viável.

Nosso grupo já havia demonstrado os efeitos do EHB sobre a síndrome metabólica induzida por prednisona em ratos. A administração da formulação (100 e 250 mg/Kg) durante 60 dias, via oral, levou a menor ganho de peso e consumo alimentar, assim como reduziu a quantidade de tecido adiposo retroperitoneal e periepididimal. As alterações metabólicas relacionadas aos testes de tolerância à glicose (TOTG) e de resistência à insulina (TTI) mostraram que a administração da formulação foi bastante eficiente em melhorar a captação de glicose nos referidos testes, assim como evitar a elevação da glicemia, triglicerídeos e colesterol total, reduzindo fatores de riscos cardiovasculares, além de não causar toxicidade nas funções hepática (AST e ALT) e renal (ureia) (Sales Junior, 2015). Assim, acreditamos que esta formulação possa ter potencial terapêutico em patologias cujo tratamento exija uso relativamente prolongado de glicocorticoides em altas doses, e que também possa contribuir para o tratamento da síndrome metabólica e do diabetes *mellitus* tipo 2.

Nossos resultados mostram que, além de ter um potencial terapêutico em patologias cujo tratamento exija uso relativamente prolongado de glicocorticoides, nosso extrato também parece contribuir para o tratamento da síndrome metabólica e do diabetes *mellitus* tipo 2 induzido por dieta hiperlipídica.

Um aumento no fluxo de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado tem sido associado à resistência à insulina hepática, que está fortemente associada ao desenvolvimento da *NAFLD* (Ragheb et al., 2011; Perry et al., 2014). A resistência à insulina (RI) é uma condição patológica, na qual a captação, metabolismo e armazenamento de glicose não são adequadamente controlados pela insulina (Kahn and J. S. Flier, 2000). Por investigação intensiva sobre a ligação entre *NAFLD* e RI na última década, a RI foi identificada como maior contribuinte para o desenvolvimento da *NAFLD*, conforme determinado pela hipótese de “dois *hits*” (Manco, 2017; Alam et al., 2016). A RI é um importante marcador clínico da síndrome metabólica, que está intimamente ligado ao DM2 (Kaur, 2014; Taylor, 2012). Alguns agentes antidiabéticos, direta ou indiretamente, melhoram a RI (Bailey, 1999). Assim, os medicamentos para o tratamento de anormalidades glicêmicas oferecem estratégias viáveis para aliviar a *NAFLD* e a *NASH* por meio da modulação da RI.

A insulina se liga e ativa o receptor de insulina, um receptor de tirosina quinase, que subsequentemente ativa uma cascata complexa de vias de sinalização a jusante envolvidas na regulação do metabolismo da glicose, como a via de sinalização IRS-

1/PI3K/Akt (Boucher et al., 2014). No entanto, a fosforilação do IRS-1 em serina pode induzir uma alteração conformacional que diminui sua interação com o receptor de insulina, tornando o IRS-1 um substrato pobre para o seu receptor (Paz et al., 1997). Também foi proposto que, uma vez fosforilado em resíduos de serina, o IRS-1 se liga a moléculas sinalizadoras desconhecidas que dificultam sua interação com o receptor de insulina ou inibem o receptor de insulina tirosina quinase. Curiosamente, a fosforilação em serina é aumentada em camundongos do tipo selvagem submetidos a dieta rica em gordura (Aguirre et al., 2000; Tanti et al., 2004). Em nosso estudo observamos uma tendência de aumento no conteúdo proteico do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) fosforilado em serina 302 no tecido hepático do grupo DHL (Figura 11), o que pode justificar a resistência à insulina. Já no tratamento com o EHB na dose de 250 mg observamos uma tendência de diminuição desta fosforilação (Figura 11), melhorando a sinalização de insulina e, conseqüentemente, a captação de glicose da circulação.

Em quadros de resistência a insulina, sua capacidade de inibir a gliconeogênese diminui e, como consequência, a síntese de glicose endógena hepática aumenta. Este processo aumentará ainda mais a glicose no sangue e agrava a resistência à insulina (Agius, 2015). A capacidade do fígado para metabolizar a glicose é vital para explicar a depuração da glicose na dieta. A síntese de glicogênio é uma via para descartar a glicose após a estimulação da insulina, sendo processada principalmente no fígado e no músculo como armazenamento de energia (Couturier et al., 2011). A falta de glicogênio hepático desvia a glicose para a síntese de gordura, o que pode aumentar o acúmulo de gordura e o desenvolvimento de resistência hepática à insulina (Irimia et al., 2017). Em nosso estudo, o tratamento preventivo com o EHB ajudou o tecido hepático a sintetizar mais glicogênio (Figura 10C) e, como consequência, os níveis de glicose em jejum no sangue diminuíram, indicativo de que a captação de glicose aumentou. Entretanto, no tratamento farmacológico com o EHB e a dieta hiperlipídica (Figura 26C) ocorreu uma diminuição no conteúdo de glicogênio no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica, apesar dos níveis de glicemia de jejum, bem como o acúmulo de gordura e a resistência à insulina, terem diminuído.

Foi relatado que a banana reduz a glicose e a resistência à insulina (Pari e Maheswari, 1999), e o efeito benéfico do EHB sobre a homeostase da glicose observado no nosso estudo foi consistente com o estudo anterior mostrando que sua administração reduziu significativamente os níveis séricos de glicose em jejum. O teste oral de tolerância

à glicose (TOTG) e o teste de tolerância à insulina (ITT) revelaram uma redução progressiva dos níveis de glicose sérica após a injeção de glicose e insulina, indicando melhora na tolerância à glicose e à insulina. Corroborando com esses achados, nossos resultados também mostram uma diminuição nos níveis séricos de insulina em ambos os tratamentos com o EHB e do polipeptídio inibitório gástrico (GIP) total no tratamento farmacológico com o extrato. O GIP exibe potentes efeitos insulínotropicos nas células β . A redução crônica da secreção de GIP alivia a obesidade e o grau de resistência à insulina em condições de dieta hiperlipídica, sugerindo um potencial valor terapêutico (Nasteska et al., 2014).

A leptina e a resistina são hormônios liberados pelo tecido adiposo, os quais tem grande importância no metabolismo (Ohashi et al., 2015). Demonstrou-se que a leptina desempenha um papel crucial na regulação da homeostase energética e do metabolismo lipídico (Haslam e James, 2005). Seus níveis são geralmente maiores em indivíduos com obesidade, embora seus efeitos sejam suprimidos nessa situação devido à resistência à leptina. A perda de peso geralmente leva a uma diminuição em seus níveis associada a um aumento de seus efeitos (Farooqi et al., 2014). Enquanto isso, a resistina é uma adipocina pró-inflamatória cujas principais propriedades são regular a sensibilidade à insulina em todo o corpo, e suas expressões irregulares podem contribuir para a progressão da obesidade e suas complicações, incluindo resistência à insulina, inflamação e distúrbios metabólicos (Bertolani et al., 2006; Vendrell et al., 2004; Ribot et al., 2008; Abate et al., 2014). Consistentemente, os níveis séricos de leptina estavam elevados em ambos os tratamentos nos camundongos alimentados com a DHL. Os níveis de resistina foram elevados no grupo DHL apenas no tratamento farmacológico, indicando que é necessário mais tempo de exposição a uma dieta hiperlipídica para os seus níveis serem alterados. O tratamento com o EHB induziu uma diminuição significativa nos níveis séricos de leptina tanto no tratamento preventivo como no farmacológico, ao passo que os níveis séricos de resistina foram diminuídos apenas após a obesidade e suas complicações instaladas, no tratamento farmacológico. Isso sugere que o EHB pode melhorar a resistência à leptina ou uma superexpressão de resistina induzida por uma dieta rica em gordura. Essas alterações nos níveis plasmáticos são, provavelmente, um reflexo da diminuição do conteúdo de tecido adiposo dos animais em ambos os tratamentos com o EHB.

O tecido adiposo disfuncional pode levar à *NAFLD* (Stanton et al., 2011). De fato, os animais do grupo DHL apresentaram maior adiposidade e características de uma doença hepática gordurosa não alcoólica em comparação com o grupo CTR. O acúmulo de triglicérides nos hepatócitos é resultado da captação de ácidos graxos, o que aumenta a sensibilidade do fígado a insultos secundários, como o estresse oxidativo (Tessari et al., 2009). O tratamento com o EHB pode ter prevenido e/ou tratado a *NAFLD* pela diminuição dos triglicérides e tecido adiposo, como demonstrado neste estudo.

Problemas com o metabolismo da gordura estão associados à *NAFLD*. Muitas reações bioquímicas ocorrem concomitantemente no fígado, incluindo a oxidação de triglicerídeos (TG) e a síntese de lipoproteínas, colesterol e fosfolipídios. O metabolismo anormal de lipídeos e lipoproteínas resultam em dislipidemia, incluindo níveis de colesterol e/ou de TG plasmáticos elevados, bem como níveis reduzidos de colesterol-HDL, que contribuem para o aumento da prevalência de obesidade. Várias proteínas envolvidas na lipogênese tem mostrado um papel crucial nas dislipidemias, incluindo a enzima ácido graxo sintase (FAS) (Alberts et al., 1975; Postic et al., 2008), proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBPs) e 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) (Kisseleva et al., 1999; Rosser et al., 1989; Goldstein e Brown, 1990) e os níveis de expressão destas enzimas são dinâmicos em resposta ao estado de energia celular. A importação de ácidos graxos e sua β -oxidação mitocondrial são altamente regulados pela CPT-I (McGarry e Brown, 1997). Além disso, o aumento na síntese lipídica é causado pelo aumento das atividades da HMG-CoA redutase, uma enzima que desempenha um papel chave na síntese de colesterol e produção de mevalonato (Brown e Goldstein, 1980). No nosso estudo, não observamos alteração entre os grupos experimentais quando avaliamos os níveis de RNAm da CPT-I (Figuras 13D e 27F) no tecido hepático dos animais, em ambos os tratamentos. Entretanto, observamos um aumento nos níveis de RNAm da enzima HMG-CoA redutase (Figuras 13C e 27E) no tecido hepático do grupo tratado com o EHB na dose de 100 mg, em ambos os tratamentos.

Em mamíferos, a lipogênese e lipólise hepática são controladas por diversas enzimas, incluindo receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), CPT-1 e proteína quinase ativada por AMP (AMPK), em resposta a condições nutricionais e hormonais. Os PPARs pertencem à superfamília dos receptores de hormônios nucleares e desempenham um papel fundamental no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos.

Três membros desta superfamília já foram descobertos: PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ (Kvandová et al., 2016). Esses receptores nucleares são moduladores-chave no curso patológico da *NAFLD* e são alvos para o tratamento dessa doença (Ballestri et al., 2016; Tanaka et al., 2017). Especificamente, o PPAR- γ , conhecido como “receptor balanceado de energia”, mostrou ser um regulador crucial tanto na resistência à insulina (Hammarstedt et al., 2005; Pellieux et al., 2006) como na *NAFLD* (Neuschwandert et al., 2006; Mello et al., 2016). Isso ocorre porque o PPAR- γ regula vários genes a jusante relacionados à oxidação de ácidos graxos, como a carnitina palmitoil transferase-I (CPT-1) (Zheng et al., 2011) que catalisa o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias para β -oxidação, como descrito anteriormente. Já a expressão de PPAR- α , que regula a expressão transcricional das enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, como a acil-CoA oxidase (ACOX), foi significativamente reduzida em um modelo animal de *NAFLD*. Por outro lado, os agonistas do PPAR- α melhoraram a esteatose (Yeon et al., 2004; Seo et al., 2008).

No nosso estudo, não encontramos variação entre os grupos experimentais nos níveis de RNAm do PPAR- α e encontramos uma tendência de aumento no grupo DHE nos níveis de PPAR- γ no tratamento farmacológico. No entanto, a dieta hiperlipídica diminuiu a expressão da ACOX, indicando que estes animais apresentaram uma menor capacidade de β -oxidação peroxisomal (Figuras 13E e 27G). Já no tratamento preventivo, em ambas as doses administradas do EHB, houve um aumento da expressão gênica dessa enzima quando comparadas ao grupo DHL (Figura 13E), bem como uma leve tendência de aumento quando comparado ao grupo DHL no tratamento farmacológico (Figura 27G), indicando que os animais que foram tratados com o EHB aumentaram a β -oxidação peroxisomal.

Além disso, o EHB parece ter regulado o metabolismo lipídico hepático através da diminuição dos níveis de mRNA do GPAT-4 e aumento da CYP7A1, o que pode estar associado à prevenção e melhora das alterações metabólicas lipídicas prejudiciais observadas no grupo DHL. Camundongos deficientes em GPAT-4 são resistentes ao acúmulo de tecido adiposo induzido por dieta hiperlipídica e da obesidade induzida geneticamente, e sua taxa metabólica é reportada por ser 5% maior (Cao et al., 2006) e o conteúdo de triacilgliceróis é 45% menor no tecido hepático (Vergnes et al., 2006; Zhang et al., 2014). O EHB aumenta a atividade da CYP7A1, que aumenta a secreção de colesterol hepático na bile e diminui o colesterol no fígado (Morise et al., 2004). Nesse

caso, a dieta hiperlipídica diminuiu a capacidade de degradação do colesterol em ácido biliar e acumulou mais gordura no fígado. Já com a administração do EHB a homeostase do colesterol hepático foi mantida.

A modulação da expressão dessas enzimas chave do metabolismo lipídico corroboram os dados encontrados na análise histológica dos nossos animais, que revelou que o tratamento com o EHB reduziu o acúmulo de gordura hepática e o *ballooning* hepatocelular. Com base nesses achados, acreditamos que a administração do EHB pode aliviar a esteatose no tecido hepático dos camundongos submetidos a uma DHL por essa via.

Uma das manifestações da lesão hepática induzida por uma dieta hiperlipídica é o dano oxidativo e os polifenóis apresentam um efeito antioxidante evidente (Kang et al., 2013). Um estudo mostrou efeito preventivo dos polifenóis extraídos da casca de banana (PB) contra a lesão hepática e estresse oxidativo induzido por CCl₄ (tetracloreto de carbono). Neste estudo, os ratos machos ICR receberam 100 ou 200 mg/Kg de solução de PB por gavagem durante 14 dias antes de injeções subcutâneas abdominais de solução de CCl₄. O exame histopatológico indicou que os PB foram capazes de reduzir a extensão da lesão tecidual hepática, reduzindo a necrose na região central e preservando os lóbulos. Os grupos PB apresentaram menores níveis séricos de AST, ALT e lactato desidrogenase. Além disso, os PB reduziram os níveis séricos de IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ , bem como reduziram os níveis séricos e teciduais de malondialdeído. Também aumentaram os níveis séricos e hepáticos de glutathione nos camundongos indicando redução do dano oxidativo como um mecanismo dos polifenóis da casca de banana (Wang et al., 2016).

De fato, a atividade antioxidante de um extrato rico em flavonóides da banana (*Musa paradisiaca*) foi estudada no fígado, rim e coração de ratos alimentados com dietas normais e ricas em gordura. Os animais foram tratados oralmente com extrato a 10 mg/100 g de peso corporal por intubação gástrica por 90 dias. As concentrações de produtos de peroxidação foram diminuídas, enquanto as atividades da catalase e superóxido dismutase foram aumentadas pelo tratamento. Concentrações de glutathione também foram elevadas nos animais tratados (Vijayakumar et al., 2008).

Em nosso estudo, o fígado dos camundongos alimentados com a dieta rica em gordura paralelamente a administração oral do EHB apresentou melhor defesa antioxidante, mostrado pelo aumento da enzima SOD (Figura 15A), indicando, assim, a prevenção do estresse oxidativo hepático induzido pela dieta hiperlipídica. Entretanto,

não apresentou efeito na quantificação de glutathione total (Figura 15B). Assim, os polifenóis detectados em nosso extrato da casca verde da banana (Barroso et al., 2019) podem estar envolvidos nesse efeito protetor do EHB, sendo úteis para o tratamento da *NAFLD* e suas complicações.

Outro mecanismo envolvido na patogênese da *NAFLD* é a inflamação hepática. Dieta hiperlipídica pode induzir esteatohepatite não alcoólica com aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) e translocação de NF- κ B p65 nuclear (Barroso et al., 2018). O EHB preveniu a esteatohepatite não alcoólica (Tabela 2 e 3, Figuras 9B e 25 B) nos animais, assim como preveniu a diminuição da citocina anti-inflamatória (IL-10; Figura 14A) no tecido hepático. Ele também preveniu o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figuras 14B e 29B), IL-1 β (Figuras 14E e 29E), IL-6 (Figuras 14C e 29C), MIP-2 (Figuras 14D e 29D) e diminuiu a translocação do NF- κ B p65 para o núcleo dos hepatócitos (Figura 14F).

O efeito anti-inflamatório da banana foi demonstrado em doença intestinal inflamatória. Houve efeito protetor sinérgico pela combinação de 10% de farinha de banana anã verde com prednisolona durante o tratamento da colite em ratos induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico. O efeito foi mais pronunciado do que aqueles promovidos por uma única administração de prednisolona ou uma dieta contendo 10% ou 20% de farinha de banana isoladas. Este efeito benéfico foi associado com uma melhora no estado oxidativo, porque a dieta com a farinha de banana anã verde apresentou atividade antioxidante *in vivo*, demonstrado pela neutralização da depleção de glutathione total induzida pelo processo inflamatório colônico. Além disso, a atividade anti-inflamatória intestinal estava associada à inibição da atividade da fosfatase alcalina e à redução da extensão das lesões, bem como inibiu a atividade da mieloperoxidase e a peroxidação lipídica, melhorando o estado oxidativo colônico (Scarminio et al., 2012).

Sabe-se que a ativação de macrófagos residenciais do fígado está envolvida na progressão da esteatose para esteatohepatite não alcoólica (Ganz et al., 2015). Dados na literatura indicam que a banana pode modular diretamente a atividade de macrófagos. Um estudo mostrou que a lectina recombinante de banana (rBanLec), extraído da polpa da banana (*Musa acuminata*, Cavendish), se liga a macrófagos peritoneais murinos e modula especificamente suas características funcionais. A rBanLec aumentou a secreção de IL-10 de maneira dependente da dose além de promover a diferenciação dos macrófagos direção ao perfil anti-inflamatório (redução da produção de NO e secreção de IL-12,

aumento da atividade de arginase e secreção de TGF β e IL-4). A rBanLec também alterou a atividade de mieloperoxidase (MPO) e diminuiu a geração de ânions superóxido pelos macrófagos (Marinkovic et al., 2017). Embora não tenhamos estudado os macrófagos hepáticos separadamente, nossos resultados também se assemelham a esse estudo no que se refere ao aumento da secreção de IL-10 e diminuição da produção de TNF- α . Esses dados sugerem que nosso extrato pode estar modulando a ativação dos macrófagos residentes e desse modo, diminuindo a inflamação hepática.

A doença hepática gordurosa não alcoólica é caracterizada pela deposição lipídica no fígado (esteatose) e tem sido relacionada com a resistência à insulina (Marchesini et al., 2001). A administração do EHB associada à dieta rica em gordura nos camundongos resultou em diminuição do ganho de peso, do acúmulo de gordura e da dislipidemia. Esses efeitos parecem estar associados à prevenção e tratamento de alterações metabólicas séricas e hepáticas, indicativas de DM2 e *NAFLD*, relacionados à sua capacidade de interferir na ação da insulina e no metabolismo lipídico, além de inibir o estresse oxidativo e a inflamação no fígado. Portanto, nossos resultados apontam para efeitos benéficos do EHB nas disfunções metabólicas séricas e hepáticas relacionadas à obesidade, DM2 e *NAFLD*. Além disso, flavonóides e polifenóis de produtos naturais podem reduzir o acúmulo de lipídeos hepáticos e interferir na patogênese da *NAFLD* (Pan et al., 2014; Parafati et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que as antocianinas, um tipo de flavonóide, podem atenuar a esteatose hepática por três mecanismos independentes, como redução do estresse oxidativo, promoção da lipólise e inibição da lipogênese (Valenti et al., 2013). Além disso, alguns estudos mostraram que as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dos polifenóis contribuem para a melhora do diabetes, reduzindo o colesterol total e LDL, bem como aumentando o colesterol-HDL (Dragano et al., 2013; Lenquiste et al., 2012; Qatanani e Lazar, 2007; Seymour et al., 2009).

De modo geral, o EHB exerceu um efeito benéfico no metabolismo de glicose e de lipídios, no processo inflamatório e na doença do fígado gorduroso não alcoólico. Ambos os tratamentos e as doses do EHB foram eficazes nos parâmetros descritos acima e não mostraram efeitos colaterais aparentes ou sinais de toxicidade. Portanto, considerando os benefícios verificados na presente pesquisa, o EHB pode ser utilizado como fonte para o desenvolvimento de novas drogas hipoglicemiantes, hipolipemiantes, anti-inflamatórias e protetora para o tecido hepático, uma vez que a expectativa de vida e a obesidade vem

aumentando no mundo, contribuindo para o aumento da incidência da síndrome metabólica.

8 CONCLUSÕES

Neste estudo foram identificados 12 compostos de diferentes classes, incluindo derivados de ácidos fenólicos, flavonóides agliconas, flavonóides glicosídicos e catecolaminas, no extrato hidroalcoólico das cascas verdes de *Musa cavendish* (EHB).

Os resultados mostram que o EHB tem efeito protetor e terapêutico nos camundongos obesos com a doença do fígado gorduroso não alcoólico induzida por dieta hiperlipídica, modulando os parâmetros metabólicos e inflamatórios.

Sendo assim, nossos resultados mostram que o EHB pode ser usado como fonte de novo medicamento com atividade hipoglicemiante, hipolipemiante e anti-inflamatória, protegendo contra a lesão hepática induzida por dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate N, Sallam HS, Rizzo M, Nikolic D, Obradovic M, Bjelogrljic P, Isenovic ER. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des.* 2014; 20:4961-4969.
- Adams L, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J.* 2006; 82:315-322.
- Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol.* 2007; 17:863-9.
- Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a populationbased cohort study. *Gastroenterology.* 2005; 129:113-21.
- Adedayo BC, Oboh G, Oyeleye SI, Olasehinde TA. Antioxidant and Antihyperglycemic Properties of Three Banana Cultivars (*Musa* spp.). *Scientifica (Cairo).* 2016; 2016:8391398.
- Agarwal PK, Singh A, Gaurav K, Goel S, Khanna HD, Goel RK. Wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *Paradisiaca*) in rats. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47:32-40.
- Agius, L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med.* 2015; 46:34-45.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal Kinase promotes insulin resistance during association with Insulin Receptor Substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem.* 2000; 275:9047-54.
- Aitken RJ, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Fraser BA, Nixon B, Smith ND, De Iuliis GN. Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. *Biochem Pharmacol.* 2016; 121:78-96.
- Akimov MG, Gretskaya NM, Zinchenko GN, Bezuglov VV. Cytotoxicity of Endogenous Lipids N-acyl Dopamines and their Possible Metabolic Derivatives for Human Cancer Cell Lines of Different Histological Origin. *Anticancer Res.* 2015; 35:2657-2661.
- Alam S, Mustafa G, Alam M, Ahmad N. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2016; 7:211-217.

- Alberts A, Strauss A, Hennessy S, Vagelos P. Regulation of synthesis of hepatic fatty acid synthetase: binding of fatty acid synthetase antibodies to polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72:3956–3960.
- Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107:449-55.
- Amaro A, Fabbrini E, Kars M, Yue P, Schechtman K, Schonfeld G, Klein S. Dissociation between intrahepatic triglyceride content and insulin resistance in familial hypobetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. 2010; 139:149-53
- Andrianova EL, Bobrov MYu, Gretskeya NM, Zinchenko GN, Serkov IV, Fomina-Ageeva EV, Bezuglov VV. The effects of neurolipins and their synthetic analogues on normal and transformed glial cells. *Neurochem J*. 2010; 4:46-54.
- Anjum S, Sundaram S, Rai G. Nutraceutical application and value addition of banana (*Musa paradisiaca* L. Variety, “Bhusawal Keli”) peel: A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6:81-85.
- Anyasi TA, Jideani AI, Mchau GR. Effect of organic acid pretreatment on some physical, functional and antioxidant properties of flour obtained from three unripe banana cultivars. *Food Chem*. 2015; 172:515-22.
- Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Després J-P, Rankinen T, Bouchard C. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36:1610-1615.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005; 11:191-8.
- Asensio C, Jimenez M, Kuhne F, Rohner-Jeanrenaud F, Muzzin P. The lack of beta-adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. *Diabetes*. 2005; 54:3490–3495.
- Bae JM, Lee EJ, Guyatt G. Citrus fruit intake and pancreatic cancer risk: a quantitative systematic review. *Pancreas*. 2008; 38:168-174.
- Bailey CJ. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58:1511-1520.
- Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in

pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28:783-9.

Balbach A. As frutas na medicina doméstica. Editora M. V. P. 1945; 21. ed. p. 374.

Ballestri S, Nascimbeni F, Romagnoli D, Baldelli E, Lonardo A. The role of nuclear receptors in the pathophysiology, natural course, and drug treatment of NAFLD in humans. *Adv Ther*. 2016; 33:291-319.

Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A*. 2007; 143:3016-3034.

Barroso WA, Abreu IC, Ribeiro LS, da Rocha CQ, de Souza HP, de Lima TM. Chemical composition and cytotoxic screening of *Musa cavendish* green peels extract: Antiproliferative activity by activation of different cellular death types. *Toxicol In Vitro*. 2019; 59:179-186.

Barroso WA, Victorino VJ, Jeremias IC, Petroni RC, Ariga SKK, Salles TA, Barbeiro DF, de Lima TM, de Souza HP. High-fat diet inhibits PGC-1 α suppressive effect on NF κ B signaling in hepatocytes. *Eur J Nutr*. 2018; 57:1891-1900.

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005; 42:44–52.

Begieneman MP, Ter Horst EN, Rijvers L, Meinster E, Leen R, Pankras JE, Fritz J, Kubat B, Musters RJ, van Kuilenburg AB, Stap J, Niessen HW, Krijnen PA. Dopamine induces lipid accumulation, NADPH oxidase-related oxidative stress, and a proinflammatory status of the plasma membrane in H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 311:H1097-H1107.

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006; 355:2297-307.

Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 1996; 47:233–61.

Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between ‘Lee index’ and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968; 40(4):527-8.

- Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzeinghi B, Romagnani P, Milani S, Ginés P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol.* 2006; 169:2042-53.
- Bhutani MKK, Atal CK. Chemical constituents of banana. *J Sci Ind Res (India).* 1984; 43:316-323.
- Bierau J, van Gennip AH, Helleman J, van Kuilenburg AB. The cytostatic- and differentiation-inducing effects of cyclopentenyl cytosine on neuroblastoma cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62:1099-1105.
- Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sadhukhan R, Mondal J, Khuda-Bukhsh AR. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: Signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif.* 2013; 46:153-63.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Petrocellis LDe, Marzo VDi. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J.* 2000; 351:817-824.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997; 46:3-10.
- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6.
- Boustead JN, Stadelmaier BT, Eeds AM, Wiebe PO, Svitek CA, Oeser JK, O'Brien RM. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4IIE cells. *Biochem J.* 2003; 369(Pt 1):17-22.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. *Biochemistry (Mosc).* 2005; 70:231-9.
- Brea Á, Pintó X, Ascaso JF, Blasco M, Díaz Á, González-Santos P, Hernández-Mijares A, Mantilla T, Millán J, Pedro-Botet J. Nonalcoholic fatty liver disease, association with

cardiovascular disease and treatment (II). The treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Investig Arterioscler*. 2017; 29:185-200.

Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*. 1980; 21:505-517.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40:1387–95.

Brownsey R, Boone A, Elliott J, Kulpa J, Lee W. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34:223-227.

Bruno Bonnet C, Hubert O, Mbeguie-A-Mbeguie D, Pallet D, Hiol A, Reynes M, Poucheret P. Effect of physiological harvest stages on the composition of bioactive compounds in *Cavendish* bananas. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013; 14:270-8.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005; 48:634-42.

Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:1036-42.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012; 55:2005-2023.

Chang HP, Sheen LY, Lei YP. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. *J Chin Med Assoc*. 2015; 78:89-95.

Chen H, Dardik B, Qiu L, Ren X, Caplan SL, Burkey B, et al. Cevoglitazar, a novel peroxisome proliferator-activated receptor- α / γ dual agonist, potently reduces food intake and body weight in obese mice and cynomolgus monkeys. *Endocrinology*. 2010; 151:3115-24.

Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest*. 1999; 103:365-72.

- Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity. *Hepatology*. 2002; 36:403-9.
- Clement MV, Long LH, Ramalingam J, Halliwell B. The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture. *J Neurochem*. 2002; 81:414-421.
- Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001; 34:1158-63.
- Dan MCT (2011). Avaliação da potencialidade da farinha de banana verde como ingrediente funcional: Estudo *in vivo* e *in vitro* (Doctoral thesis). São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998; 114:842-5.
- de Oliveira CB, Comunello LN, Maciel ES, Giubel SR, Bruno AN, Chiela EC, Lenz G, Gnoatto SC, Buffon A, Gosmann G. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*. 2013; 18:11022-11032.
- Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol*. 2005; 166:1655-69.
- Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013; 8:e56100.
- Dornas T, Valle NC, Hidasi J. *Celeus obrieni*: dois novos registros históricos para o estado de Goiás. *Atualidades Ornitológicas*; 2009; 147:18-19.
- Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, Kountouras J, Katsinelos P. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. *Metabolism*. 2017; 71:182-197.
- Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006; 44:865-73.

- Emaga TH, Andrianaivo RH, Wathélet B, Tchango JT, Paquot M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chem.* 2007; 103, 590-600.
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast Jr RC, Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:11960-5.
- Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Vol. 1 e 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 808p.
- Farooqi IS, O’Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol.* 2014; 223:T63-70.
- Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology.* 2004; 40:820–6.
- Fatemeh SR, Saifullah R, Abbas FMA, Azhar ME. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of banana pulp and peel flours: Influence of variety and stage of ripeness. *Int Food Res J.* 2012; 19:1041-1046.
- Federation ID. (2005). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Belgium; 2006. Disponível em: <<https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html>>
- Acesso em: 20 de junho de 2018.
- Feijó SG, Lima JMdC, Oliveira MAAd, Patrocínio RMV, Moura-Junior LG, Campos AB, Lima JWO, Braga LLBC. The spectrum of non alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: prevalence and associate risk factors. *Acta Cir Bras.* 2013; 28:788-793.
- Feldeisen SE, Tucker KL. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32:46-60.
- Ford ES, Li C, Zhao G, Pearson WS, Mokdad AH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adolescents using the definition from the International Diabetes Federation. *Diabetes Care.* 2008; 31:587-589.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995; 83(5):803-12.

- Freedman BD, Lee EJ, Park Y, Jameson JL. A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J Biol Chem*. 2005; 280:17118-17125.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of bodyweight in mammals. *Nature*. 1998; 395:763-70.
- Fries JH, Nicholas J, Waldron RJ. Dehydrated banana in the dietetic management of diarrheas of infancy. *J Pediatr*. 1950; 37:367-372.
- Funahashi T, Matsuzawa Y, Kihara S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. *Int Congress Series*. 2004; 1262:368-71.
- Gan L, Meng ZJ, Xiong RB, Guo JQ, Lu XC, Zheng ZW, Deng YP, Luo BD, Zou F, Li H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate ameliorates insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36:597-605.
- Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A, Kodys K, Szabo G. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med*. 2015;13:193.
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E, Ferrannini E, DeFronzo RA. The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care*. 2006a; 29:2275-81.
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Santini E, Ciociaro D, DeFronzo RA, Ferrannini E. The effect of rosiglitazone on the liver: decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006b; 91:806-12.
- Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007; 3:145-56.
- Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res*. 2003; 92:518-24.
- Giovannoni JJ. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 2004; 16:S170-S180.

- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990; 343:425-30.
- Gonçalves ST, Baroni S, Bersani-Amado FA, Sartoretto JL, Cortez DAG, Fernandes CAM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Avaliação das atividades hipoglicemiante e anti-hiperglicemiante do extrato hidroalcoólico das folhas da Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae) em modelos experimentais de hiperglicemia. *Acta Sci Health Sci Maringá*. 2005; 27:49-55.
- González-Montelongo R, Lobo MG, González M. Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem*. 2010; 119:1030-1039.
- Gore MA, Akolekar D. Evaluation of banana leaf dressing for partial thickness burn wounds. *Burns*. 2003; 29:487-492.
- Gossard AA, Lindor KD. Current therapies for nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs Today (Barc)*. 2011; 47:915-922.
- Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2595-2600
- Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91:11012-6.
- Haghiac M, Walle T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr Cancer*. 2005; 53:220-231.
- Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter SV, Smith U. The effect of PPAR gamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 73:65-75.
- Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of α -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15:1667-72.
- Hernandez-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Lerma-Diaz JM, Dominguez-Rodriguez JR, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy Adel C, de Celis-Carrillo R, del Toro-Arreola S, Castellanos-Esparza YC, Bravo-Cuellar A. Pentoxifilline sensitizes human cervical tumor cells to cisplatin-induced apoptosis by suppressing NF-kappa B and decrease cell senescence. *BMC Cancer*. 2011; 11:483-497.

- Horigome T, Sakaguchi E, Kishimoto C. Hypocholesterolaemic effect of banana (*Musa sapientum* L. var. Cavendishii) pulp in the rat fed on a cholesterol-containing diet. *Br J Nutr.* 1992; 68:231-44.
- Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Paulo: EDUFSCAR. 2003. 1 ed. p. 152.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259:87-91.
- Hoy AJ, Bruce CR, Cederberg A, Turner N, James DE, Cooney GJ, Kraegen EW. Glucose infusion causes insulin resistance in skeletal muscle of rats without changes in Akt and AS160 phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293:E1358-E1364.
- Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology.* 2004; 40:46-54.
- Imam MZ, Akter S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A phytochemical and pharmacological review. *J Appl Pharm Sci.* 2011; 1(05):14-20.
- Javanmardi J, Kubota C. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biol Technol.* 2006; 41:151-155.
- Jawala S, Kumar Y, Khan MSY. Antimicrobial and antihyperglycemic activities of *Musa paradisiaca* flowers. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2:S915-S918.
- Ji H, Friedman MI. Reduced hepatocyte fatty acid oxidation in outbred rats prescreened for susceptibility to diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32:1331-1334.
- Ji H, Friedman MI. Reduced capacity for fatty acid oxidation in rats with inherited susceptibility to diet-induced obesity. *Metabolism.* 2007; 56:1124-30.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106:473-481.
- Kajuna STAR, Bilanski WK, Mittal GS. Textural changes of banana and plantain pulp during ripening. *J Sci Food Agric.* 1997; 75:244-250.
- Kanazawa K, Sakakibara H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in *Cavendish* banana. *J Agric Food Chem.* 2000; 48:844-848.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116:1494-505.

- Kang MC, Kang SM, Ahn G, Kim KN, Kang N, Samarakoon KW, Oh MC, Lee JS and Jeon YJ. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 35:517-523.
- Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes*. 2009b; 58:2616-23.
- Kantartzis K, Machicao F, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. The *DGAT2* gene is a candidate for the dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2009a; 116:531-7.
- Kappel VD, Zanatta L, Postal BG, Silva FR. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 2013; 532:55-60.
- Karnikowski M, Córdova C, Oliveira RJd, Karnikowski MGdO, Nóbrega OdT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *Sao Paulo Med J*. 2007; 125:333-337.
- Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014; 2014:943162.
- Kawasaki BT, Hurt EM, Mistree T, Farrar WL. Targeting cancer stem cells with phytochemicals. *Mol Interv*. 2008; 8:174-184.
- Kisseleva AF, Goryunova LE, Planells R, Lafont H, Alquier C. HMG CoA reductase and LDL receptor genes are regulated differently by 15-ketosterols in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 259:688-694.
- Kitdamrongsont K, Pothavorn P, Swangpol S, Wongniam S, Atawongsa K, Svasti J. Anthocyanin composition of wild bananas in Thailand. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 10853-10857.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41:1313-21.
- Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr Med Chem*. 2009; 16:3943-3965.

- Kumar KPS, Bhowmik D, Duraivel S, Umadevi M. Traditional and medicinal uses of banana. *J Pharmacogn Phytochem.* 2012; 1:51-63.
- Kvandová M, Majzúnová M, Dovinová I. The role of PPARgamma in cardiovascular diseases. *Physiol Res.* 2016; 65:S343-63.
- LaBrecque DR, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh K-L, Hamid SS, Isakov V, Lizarzabal M, Peñaranda MM. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 48:467-473.
- Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de WG, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284:E863-73.
- Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology.* 2003; 87:167-198.
- Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2011; 60:2474-83.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995; 270:12953-6.
- Leklem, J.E. Vitamin B6. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ros, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, ninth ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, pp. 413-421.
- León-González AJ, Jara-Palacios MJ, Abbas M, Heredia FJ, Schini-Kerth VB. Role of epigenetic regulation on the induction of apoptosis in Jurkat leukemia cells by white grape pomace rich in phenolic compounds. *Food Funct.* 2017; 8:4062-4069.
- Lewis DA, Fields WN, Shaw GP. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Ethnopharmacol.* 1999; 65:283-288.
- Lima TM, Kanunfre CC, Pompéia C, Verlengia R, Curi R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro.* 2002; 16:741-7.

- Lima-Salgado TM, Coccuzzo Sampaio S, Cury-Boaventura MF, Curi R. Modulatory effect of fatty acids on fungicidal activity, respiratory burst and TNF- α and IL-6 production in J774 murine macrophages. *Br J Nutr*. 2011; 105:1173-1179.
- Liu S, Hatano B, Zhao M, Yen CC, Kang K, Reilly SM, Gangl MR, Gorgun C, Balschi JA, Ntambi JM, Lee CH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ/β in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem*. 2011; 286:1237-47.
- Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, Budillon G, Cimino L, Di Carlo A, Di Marino MP, Morisco F, Picciotto F, Terracciano L, Vecchione R, Verde V, Del Vecchio Blanco C. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol*. 2001; 35:568-74.
- Lonardo A, Bellentani S, Ratziu V, Loria P. Insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis: Necessary but not sufficient-Death of a dogma from analysis of therapeutic studies? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 5:279-89.
- Machado MV, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2012; 11:440-449.
- Magee N, Zou A, Zhang Y. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:5170402.
- Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2013; 8:e64258.
- Malta D, Santos M, Andrade S, Oliveira T, Stopa S, Oliveira M, Jaime P. Tendência temporal dos indicadores de excesso de peso em adultos nas capitais brasileiras, 2006-2013. *Cien Saude Colet*. 2016; 21:1061-1069.
- Manco M. Insulin resistance and NAFLD: a dangerous liaison beyond the genetics. *Children (Basel)*. 2017; 4:74.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001; 50:1844-50.
- Marinkovic E, Djokic R, Lukic I, Filipovic A, Inic-Kanada A, Kosanovic D, Gavrovic-Jankulovic M, Stojanovic M. Modulation of functional characteristics of resident and

thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PLoS One*. 2017; 12:e0172469.

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; 47:474-496

Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med*. 2008; 14:72-81.

Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNFalpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004; 40:177-84.

Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. *Fortaleza: Edições UFC*. 1997. p.141.

McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997; 244:1-14.

Mello T, Materozzi M, Galli A. PPARs and mitochondrial metabolism: from NAFLD to HCC. *PPAR Res*. 2016; 2016:7403230.

Menezes EW, Dan MC, Cardenette GH, Goñi I, Bello-Pérez LA, Lajolo FM. *In vitro* colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010; 65:379-85.

Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*. 2001; 7:41-7.

Morise A, Serougne C, Gripois D, Blouquit MF, Lutton C, Hermier D. Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *J Nutr Biochem*. 2004; 15:51-61.

Nasteska D, Harada N, Suzuki K, Yamane S, Hamasaki A, Joo E, Iwasaki K, Shibue K, Harada T, Inagaki N. Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions. *Diabetes*. 2014; 63:2332-43.

Navghare V, Dhawale S. Suppression of Type-II Diabetes with Dyslipidemia and Nephropathy by Peels of *Musa cavendish* Fruit

- Neiva VA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Cartágenes MSS, Coutinho-Moraes DF, Amaral FMM. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2014; 24:215-224.
- Neuschwandertetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology.* 2003; 38:1008-17.
- Nguyen TBT, Ketsa S, Van Doorn WG. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biol Technol.* 2003; 30:187-193.
- Nieman DC, Gillitt ND, Sha W, Meaney MP, John C, Pappan KL, Kinchen JM. Metabolomics-Based Analysis of Banana and Pear Ingestion on Exercise Performance and Recovery. *J Proteome Res.* 2015; 14:5367-77.
- Nogueira JM, Fernandes PJ, Nascimento AM. Composition of volatiles of banana cultivars from Madeira Island. *Phytochem Anal.* 2003; 14:87-90.
- Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2015; 15:145-50.
- Oliveira CP, Stefano JT. Genetic polymorphisms and oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): A mini review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015; 39 Suppl 1:S35-40.
- Oliveira L, Freire CS, Silvestre AJ, Cordeiro N. Lipophilic Extracts from Banana Fruit Residues: A Source of Valuable Phytosterols. *J Agric Food Chem.* 2008; 56:9520-4.
- Oliveira LS, Santos DA, Barbosa-da-Silva S, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. *J Nutr Biochem.* 2014; 25:193-200.
- Oni ET, Kalathiya R, Aneni EC, Martin SS, Blaha MJ, Feldman T, Agatston AS, Blumenthal RS, Conceição RD, Carvalho JA. Relation of physical activity to prevalence of nonalcoholic Fatty liver disease independent of cardiometabolic risk. *Am J Cardiol.* 2015; 115:34-39.
- Organization, WH. (2016). Obesity and overweight Fact sheet N°311. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em: 5 de março de 2017.

- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NFkappaB signaling through a cAMPdependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296-301.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:85-97.
- Pari L, Maheswari JU. Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 1999; 68:321-5.
- Passo Tsamo CV, Herent MF, Tomekpe K, Happi Emaga T, Quetin-Leclercq J, Rogez H, Larondelle Y, Andre C. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). *Food Chem*. 2015; 167:197-204.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997; 272: 29911-8.
- Pellieux C, Aasum E, Larsen TS, Montessuit C, Papageorgiou I, Pedrazzini T, Lerch R. Overexpression of angiotensinogen in the myocardium induces downregulation of the fatty acid oxidation pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41:459-66.
- Pereira A, Maraschin M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *J Ethnopharmacol*. 2015; 160:149-163.
- Pereira A, Maraschin M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *J Ethnopharmacol*. 2015; 160:149-63.
- Pérez AG, Cert A, Rios JJ, Olias JM. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: valery and Pequena Enana. *J Agric Food Chem*. 1997; 45:4393-4397
- Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014; 510:84-91.
- Pessayre D, Bearson A, Fromenty B, Mansour A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:57-69.

- Petta S, Eslam M, Valenti L, Bugianesi E, Barbara M, Cammà C, Porzio M, Rosso C, Fargion S, George J. Metabolic syndrome and severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: An age-dependent risk profiling study. *Liver Int.* 2017; 37:1389-1396.
- Petta S, Valenti L, Bugianesi E, Targher G, Bellentani S, Bonino F. A “systems medicine” approach to the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2016; 48:333-342.
- Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liver Dis.* 2009; 41:615-25.
- Pimentel GD, Zemdegs JCS. Alimentos e nutrientes modulam a liberação de hormonas intestinais anorexígenos. *Acta Med Port.* 2010; 23:891-900.
- Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem Toxicol.* 2015; 75:58-70.
- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008; 118:829-38.
- Pothavorn P, Kitdamrongsont K, Swangpol S, Wongniam S, Atawongsa K, Svasti J. Sap Phytochemical Compositions of Some Bananas in Thailand. *J Agric Food Chem.* 2010; 58:8782-8787.
- Povel CM, Boer JM, Reiling E, Feskens EJ. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev.* 2011; 12:952-67.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature.* 2003; 423:550-5.
- Raben A, Tagliabue A, Christensen NJ, Madsen J, Holst JJ, Astrup A. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response, and satiety. *Am J Clin Nutri.* 1994; 60:544-51.
- Ragheb R, Medhat AM. Mechanisms of fatty acid-Induced insulin resistance in muscle and liver. *J Diabetes Metab.* 2011; 2:127.
- Ramos DP, Leonel M, Leonel S. Amido resistente em farinhas de banana verde. *Alimentos e Nutrição Araraquara.* 2010; 20:479-484.

- Rascón-Valenzuela LA, Velázquez C, Garibay-Escobar A, Vilegas W, Medina-Juárez LA, Gámez-Meza N, Robles-Zepeda RE. Apoptotic activities of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J Ethnopharmacol*. 2016; 193:303-311.
- Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30:48-53.
- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595–1607.
- Rebello C, Greenway FL, Dhurandhar NV. Functional foods to promote weight loss and satiety. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014; 17:596-604.
- Rebello LPG, Ramos AM, Pertuzatti PB, Barcia MT, Castillo-Muñoz N, Hermosín-Gutiérrez I. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Res Int*. 2014; 55:397-403.
- Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21:193–230.
- Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:4012-7.
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:1708-17.
- Roberts LD, Hassall DG, Winegar DA, Haselden JN, Nicholls AW, Griffin JL. Increased hepatic oxidative metabolism distinguishes the action of Peroxisome proliferator-activated receptor delta from Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the ob/ob mouse. *Genome Med* 2009; 1: 115.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996; 97:2859-65.
- Rosser D, Ashby MN, Ellis JL, Edwards PA. Coordinate regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

reductase, and prenyl transferase synthesis but not degradation in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1989; 264:12653-12656.

Sakthivel R, Malar DS, Devi KP. Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential. *Biomed Pharmacother.* 2018; 105:742-752.

Sales Junior, JH. Efeitos metabólicos do extrato de *Musa cavedishii* em modelo experimental de síndrome metabólico em ratos induzido por prednisona. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Maranhão, Curso de Farmácia, 2015.

Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004; 279:32345-32353.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001; 120:1183-92.

Sardá FAH, Giuntini EB, Gomez MLPA, Lui MCY, Negrini JAE, Tadini CC, Lajolo FM, Menezes EW. Impact of resistant starch from unripe banana flour on hunger, satiety, and glucose homeostasis in healthy volunteers. *J Funct Foods.* 2016; 24: 63-74.

Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. In: Seminars in liver disease, 2015. vol 03. Thieme Medical Publishers, pp 221-235.

Satoh T, Enokido Y, Aoshima H, Uchiyama Y, Hatanaka H. Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 1997; 50:413-420.

Scarminio V, Fruet AC, Witaicenis A, Rall VL, Di Stasi LC. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutr Res.* 2012; 32:202-9.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends Food Sci Technol.* 2001; 12:401-413.

Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N and Ben-Attia M. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010; 73:1078-1083.

- Seo YS, Kim JH, Jo NY, Choi KM, Baik SH, Park JJ, Kim JS, Byun KS, Bak YT, Lee CH, Kim A, Yeon JE. PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23:102-109.
- Shi L, Qin H, Jin X, Yang X, Lu X, Wang H, Wang R, Yu D, Feng B. The natural phenolic peperobtusin A induces apoptosis of lymphoma U937 cells via the Caspase dependent and p38 MAPK signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 2018; 102:772-781.
- Silva, L. F. 2005. A persistência de um saber: medicina popular em goiás de 1930 a 1950. ANPUH – XXIII SIMPÓSIO NACIONAL DE HISTÓRIA – Londrina.
- Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008; 6:299-304.
- Singh M, Tyagi S, Bhui K, Prasad S, Shukla Y. Regulation of cell growth through cell cycle arrest and apoptosis in HPV 16 positive human cervical cancer cells by tea polyphenols. *Invest New Drugs*. 2010; 28:216-224.
- Sinha-Hikim AP, Sinha-Hikim I, Friedman TC. Connection of Nicotine to Diet-Induced Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Cellular and Mechanistic Insights. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8:23.
- Someya S, Yoshiki Y, Okubo K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). *Food Chem*. 2002; 79:351-354.
- Souza MRdA, Diniz MdFFd, Medeiros-Filho JEMd, Araújo MSTd. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*. 2012; 49:89-96
- Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015; 7:1012-9.
- Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003; 38:244-51.
- Stefan N, Staiger H, Haring HU. Dissociation between fatty liver and insulin resistance: The role of adipose triacylglycerol lipase. *Diabetologia*. 2011; 54:7–9.
- Stern MP, Williams K, González-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care*. 2004; 27:2676-2681.
- Tanaka N, Aoyama T, Kimura S, Gonzalez FJ. Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. *Pharmacol Ther*. 2017; 179:142-157.

- Tanti JF, Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, Barrès R, Le Marchand-Brustel Y. Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2004; 65:43-48.
- Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:293-303.
- Taubes G. Insulin resistance. Prosperity's plague. *Science*. 2009; 325:256-60.
- Tavakkoli-Kakhki M, Motavasselian M, Mosaddegh M, Esfahani MM, Kamalinejad M, Nematy M, Eslami S. Omega-3 and omega-6 content of medicinal foods for depressed patients: implications from the Iranian Traditional Medicine. *Avicenna J Phytomed*. 2014; 4:225-230.
- Taylor R. Insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012; 61:778-779.
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltim., Md.)*. 2010; 52:1836-46.
- Touwaide A, Appetiti E. Knowledge of Eastern materia medica (Indian and Chinese) in pre-modern Mediterranean medical traditions: a study in comparative historical ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2013; 148:361-378.
- Trojan-Rodrigues M, Alves TL, Soares GL, Ritter MR. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2012; 139:155-63.
- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014; 383:1749-1761.
- Uclés Santos J-R, Bakry F, Brillouet J-M. A preliminary chemotaxonomic study on the condensed tannins of green banana flesh in the *Musa* genus. *Biochem Syst Ecol*. 2010; 38:1010-1017.
- Uppal V, Mansoor S, Furuya KN. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2016; 18:1-9.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997; 389:610-614.
- Van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J Sci Food Agric*. 2000; 80:880-912.
- van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, de Bruin A, Hofker MH, Kleemann R, Koonen DP, Heeringa

- P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7:256-68.
- Vanden Berghe W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol Res*. 2012; 65:565-576.
- Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:969-76.
- Vasques AC, Novaes FS, de Oliveira Mda S, Souza JR, Yamanaka A, Pareja JC, Tambascia MA, Saad MJ, Geloneze B. TyG index performs better than HOMA in a Brazilian population: a hyperglycemic clamp validated study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93:e98-e100.
- Verde-Mendez CDM, Forster MP, Rodríguez-Delgado MA, RodríguezRodríguez EM, Romer CD. Contento f free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canery Island) and Ecuador. *Eur Food Res Technol*. 2003; 217:287-290.
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34:274-85.
- Victorino VJ, Barroso WA, Assunção AK, Cury V, Jeremias IC, Petroni R, Chausse B, Ariga SK, Herrera AC, Panis C, Lima TM, Souza HP. PGC-1 β regulates HER2-overexpressing breast cancer cells proliferation by metabolic and redox pathways. *Tumour Biol*. 2016; 37:6035-6044.
- Vijayakumar S, Presannakumar G, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of banana flavonoids. *Fitoterapia*. 2008; 79:279-82.
- Vilela C, Santos SA, Villaverde JJ, Oliveira L, Nunes A, Cordeiro N, Freire CS, Silvestre AJ. Lipophilic phytochemicals from banana fruits of several Musa species. *Food Chem*. 2014; 162:247-52.
- Visnyei K, Onodera H, Damoiseaux R, Saigusa K, Petrosyan S, De Vries D, Ferrari D, Saxe J, Panosyan EH, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Bradley KA, Huang J, Sabatti C, Nakano I, Kornblum HI. A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma multiforme stem cells. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10:1818-1828.
- Vu HT, Scarletta CJ, Vuonga QV. Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *J Funct Foods*. 2018; 40:238-248.

- Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 1997; 45:304-9.
- Wang R, Feng X, Zhu K, Zhao X, Suo H. Preventive activity of banana peel polyphenols on CCl₄-induced experimental hepatic injury in Kunming mice. *Exp Ther Med.* 2016; 11:1947-1954.
- Williams L. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*; 2002; 106:3143-3143.
- Winzell MS, Ahren B. The High-Fat Diet-Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2004; 53:S215-S9.
- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 323:630-5.
- Wright ME, Park Y, Subar AF, Freedman ND, Albanes D, Hollenbeck A, Leitzmann MF, Schatzkin A. Intakes of fruit, vegetables, and specific botanical groups in relation to lung cancer risk in the nih-aarp diet and health study. *Am J Epidemiol.* 2008; 168:1024-1034.
- Wu-Yang H, Yi-Zhong C, Yanbo Z. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2009; 62:1-20.
- Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis.* 2013; 33:301-11.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976 Apr;15(2):212-6.
- Ye X, Yu S, Liang Y, Huang H, Lian XY, Zhang Z. Bioactive triterpenoid saponins and phenolic compounds against glioma cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24:5157-5163.
- Yeon JE, Choi KM, Baik SH, Kim KO, Lim HJ, Park KH, Kim JY, Park JJ, Kim JS, Bak YT, Byun KS, Lee CH. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19:799-804.
- Yilmaz Y. Review article: Is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Therap.* 2012; 36:815-23.

- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease - Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64:73-84.
- Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, Robino G, Tamagno E, Aragno M, Danni O, Autelli R, Colombatto S, Dianzani MU, Pinzani M, Parola M. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2004; 40:60-8.
- Zhang J, Zhu WF, Xu J, Kitdamrongtham W, Manosroi A, Manosroi J, Tokuda H, Abe M, Akihisa T, Feng F. Potential cancer chemopreventive and anticancer constituents from the fruits of *Ficus hispida* L.f. (Moraceae). *J Ethnopharmacol*. 2018; 214:37-46.
- Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2006; 281:10105-17.
- Zheng H, Li S, Ma L, Cheng L, Deng C, Chen Z, Xie C, Xiang M, Jiang W, Chen L. A novel agonist of PPAR- γ based on barbituric acid alleviates the development of non-alcoholic fatty liver disease by regulating adipocytokine expression and preventing insulin resistance. *Eur J Pharmacol*. 2011; 659:244-51.