

**MARCELO PARADISO MARINOVIC**

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS  
NOCAUTE PARA ADIPONECTINA INDUZIDOS A OBESIDADE POR  
DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM CHÁ VERDE**

---

**MARCELO PARADISO MARINOVIC**

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS  
NOCAUTE PARA ADIPONECTINA INDUZIDOS A OBESIDADE POR  
DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM CHÁ VERDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo**

**2020**

---

**MARCELO PARADISO MARINOVIC**

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS  
NOCAUTE PARA ADIPONECTINA INDUZIDOS A OBESIDADE POR  
DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM CHÁ VERDE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa Dra Alice Cristina Rodrigues

Coorientadora: Profa Dra Rosemari Otton

Versão original

**São Paulo  
2020**

---

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Paradiso Marinovic, Marcelo  
INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS  
NOCAUTE PARA ADIPONECTINA INDUZIDOS A OBESIDADE POR  
DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM CHÁ VERDE  
/ Marcelo Paradiso Marinovic; orientador Alice  
Cristina Rodrigues; coorientador Rosemari Otton. --  
São Paulo, 2020.  
121 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Chá Verde. 2. Catequinas. 3. Esteatose. 4.  
Metabolismo. 5. Obesidade. I. Cristina Rodrigues,  
Alice , orientador. II. Otton, Rosemari,  
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Investigação da função hepática em camundongos nocaute para adiponectina expostos a dieta hiperlipídica e tratados com chá verde*", registrado sob o protocolo nº **76/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **10/07/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Alice Cristina Rodrigues**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Marcelo Paradiso Marinovic (Pós-graduando), Rosemari Otton (Pesquisador colaborador)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Investigation of hepatic function in knockout mice for adiponectin exposed to the hyperlipidic diet and treated with green tea*", protocol nº **76/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **7/10/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

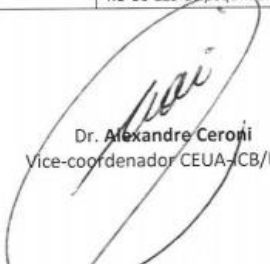
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Alice Cristina Rodrigues**

- Team members: *Marcelo Paradiso Marinovic (Graduate Student), Rosemari Otton (Colaborator Researcher)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6j KO-B6-129-adi <sup>poqtm1</sup> Chan/J	Macho/male Macho/male	8 semanas/weeks 8 semanas/weeks	60 60

São Paulo, 18 de julho de 2017.

  
Dr. Alexandre Ceronji  
Vice-coordenador CEUA-ICB/USP

  
Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretário CEUA-ICB/USP

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e perseverança para superar momentos difíceis de muito cansaço físico e psicológico.

Agradeço aos meus pais pelo apoio, compreensão, além do inabalável amor e carinho que me impulsionam a alcançar os meus objetivos. Vocês são meus exemplos e eu tenho muito orgulho de ser filho de vocês.

Agradeço a minha noiva Caroline Dosatti, amor da minha vida, por me apoiar e incentivar além de suportar os momentos de angústia. Você foi e é meu alicerce e me sinto mais seguro para enfrentar os desafios da vida.

Agradeço a minha Avó, Jesualda Ferrari por sempre ser tão presente na minha vida. Os ensinamentos que a senhora me passou eu irei levar para toda a vida.

Agradeço a minha avó Maria Rosa Paradiso pelo amor e carinho de uma vida. Os ensinamentos que a senhora me passou eu irei levar para toda a vida.

Agradeço a meus padrinhos Giulia Paradiso e Alexandre Mirachi pelo amor carinho e companheirismo.

Aos meus sogros Valquiria e Reinaldo Dosatti, por me tratarem como filho e me acolherem em sua família.

A minha cunhada Camila Dosatti e meu cunhado Felipe Dosatti pela simpatia e por representarem parte da minha família.

Ao meu irmão de criação Gustavo Tolentino pelo apoio e parceria durante este período. Obrigado por ter feito parte de mais este momento importante.

Aos meus amigos Fabio de Oliveira Matos e Pedro Conte pela parceria de uma vida e por todo o incentivo.

A UNICSUL e a USP, juntamente com os respectivos programas de pós graduação que me proporcionaram a possibilidade da realização deste projeto.

As minhas orientadoras Alice Cristina Rodrigues e Rosemari Otton por me proporcionar essa oportunidade e por todo o conhecimento que fui agraciado durante estes 3 anos e meio.

---

Agradeço ao professor Bruno Cogliati pela inestimável parceria não somente na realização de algumas metodologias mas também na colaboração na construção da idéia e seguimento do projeto.

Aos colegas de laboratório por toda a ajuda, sem os quais a realização deste projeto não seria possível.

Ao aluno de doutorado CELSO PEREIRA FILHO pelo apoio e companheirismo na bancada.

---



**“Quem já passou por essa vida e não  
viveu, pode ser mais, mas sabe  
menos do que eu.....**

Vinicius de Moraes

---

## RESUMO

MARINOVIC, M.P. **Investigação da função hepática de camundongos nocaute para adiponectina induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica e suplementados com chá verde. 2020. 121p.**Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A obesidade está envolvida com o desenvolvimento de diversas comorbidades, dentre elas a doença gordurosa hepática não alcoólica (NAFLD). Tal condição está associada com a redução dos níveis séricos de adiponectina, reduzindo assim a sinalização hepática, principalmente via AdipoR2, e como consequência, redução de vias oxidativas dependentes de PPAR $\alpha$ . O tratamento com chá verde (GT, do inglês *green tea*) está envolvido com o aumento de adiponectina circulante e melhora da esteatose hepática. Nosso objetivo foi investigar se a melhora da NAFLD induzida pelo tratamento com GT depende da ação da adiponectina. Utilizamos nesse estudo camundongos machos (selvagens) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) que receberam alimentação e água *ad libitum* por um período total de 20 semanas, sendo 8 semanas iniciais de indução de obesidade e 12 semanas com a suplementação com o extrato de GT. Na última semana de experimentação os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e tolerância a insulina, seguido da avaliação do gasto energético por calorimetria indireta. Após o período de experimentação, os animais foram eutanasiados e o fígado retirado para posteriores análises das rotas metabólicas por meio de expressão gênica (RT-PCR) e proteica (*Western Blotting*). Os animais AdipoKO tratados com GT apresentaram maior peso corporal e dos depósitos adiposos, associado a uma diminuição no gasto energético, assim como hiperinsulinemia em relação aos selvagens. Nesses animais houve uma piora na esteatose hepática, além do aumento na maquinaria lipogênica hepática. Observamos também que houve uma redução no *output* de glicose e na beta oxidação hepática, indicando que a presença da adiponectina é importante para os efeitos do GT. Adicionalmente, as catequinas do GT atuam sob a lipogênese e a beta oxidação de forma dependente de PPAR $\alpha$ , e, em particular, as catequinas EGC e EC podem ligar diretamente no PPAR $\alpha$ . Podemos concluir que os efeitos do GT são dependentes de adiponectina e também envolvem o PPAR $\alpha$ .

**Palavras-Chave:** Chá Verde. Catequinas. Esteatose. Obesidade. Metabolismo.

---

## ABSTRACT

MARINOVIC, M.P. **Investigation of hepatic function of knockout mice for adiponectin induced obesity by hyperlipid diet and supplemented with green tea. 2020. 121 p.Ph. D. these** (Department of Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Obesity is involved with the development of several comorbidities including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). This condition is associated with a reduction in serum adiponectin levels, thus reducing liver signaling, mainly via AdipoR2, and, as a consequence reduction of PPAR $\alpha$ -dependent oxidative pathways. The treatment with green tea (GT) is involved with the increase of circulating levels of this adipokine and improvement of liver steatosis. Our objective was to investigate if the improvement of NAFLD induced by treatment with green tea was dependent of adiponectin. In this study, we used male mice (wild-type) and knockout animals for adiponectin (AdipoKO) that received food and water ad libitum for a total period of 20 weeks, with an initial 8 weeks of obesity induction and 12 weeks with supplementation with GT extract. In the last week of experimentation, the animals were submitted to a glucose tolerance and insulin intolerance test, followed by an evaluation of energy expenditure by indirect calorimetry. After the experimentation period, the animals were euthanized and the liver removed for further analysis of the metabolic routes by means of gene expression (RT-PCR) and protein (Western Blotting). AdipoKO animals treated with GT had higher body weight and fat deposits, associated with a decrease in energy expenditure, as well as hyperinsulinemia. Regarding the liver of these animals, we can observe a worsening in hepatic steatosis accompanied by an increase in the levels of triglycerides and hepatic cholesterol, in addition to an increase in the hepatic lipogenic machinery. We also observed that there was a reduction in glucose output and hepatic beta oxidation, indicating that the presence of adiponectin is important for the effects of GT. In addition, GT catechins act on lipogenesis and beta oxidation in a PPAR $\alpha$ -dependent manner and particularly that the catechins EGC and EC can directly activate PPAR $\alpha$ . We can conclude that the effects of GT are dependent on adiponectin and also on PPAR $\alpha$ .

**Keywords:** Green tea. Catechins. Steatosis. Obesity. Metabolism

---

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Estrutura química das catequinas.

**Figura 2:** Representação estrutural das isoformas da adiponectina e sua seletividade para determinados receptores.

**Figura 3:** Efeitos da adiponectina sobre as vias metabólicas hepáticas.

**Figura 4:** Representação da via bioquímica da glicogênese (esquerda) e via de regulação (direita).

**Figura 5:** Representação da via bioquímica da lipogênese (esquerda) e via de regulação (direita).

**Figura 6:** Representação da via bioquímica da captação de AG (esquerda) e beta oxidação hepática (direita).

**Figura 7:** Representação da via bioquímica da gliconeogênese (esquerda) e via de regulação (direita).

**Figura 8:** Teorias do desenvolvimento da NAFD hepática, teoria de *two hits* (esquerda) e *multi hits* (direita)

**Figura 9:** Design experimental do ensaio *in vitro* com o meio enriquecido com adiponectina.

**Figura 10:** Avaliação do efeito do tratamento crônico com o GT no gasto energético de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 11:** Avaliação do efeito do tratamento crônico com o GT no consumo de oxigênio e no coeficiente respiratório (RER) de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com HFD e tratados com chá verde (GT).

**Figura 12:** Avaliação da resistência à insulina em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 13:** Avaliação da expressão proteica de marcadores da sinalização de insulina no fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

---

**Figura 14:** Avaliação da expressão de marcadores da lipólise hepática em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 15:** Avaliação dos níveis séricos de adiponectina e expressão e de marcadores da degradação de AGL no fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 16:** Avaliação histológica do fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 17:** Avaliação da esteatose e dos níveis lipídicos no fígado e no plasma de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (ADIPOKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 18:** Avaliação de marcadores da lipogênese hepática em camundongos Wild Type (WT) e nocautes para adiponectina (ADIPOKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 19:** Avaliação da expressão gênica e proteica de marcadores da síntese de colesterol hepática de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 20:** Avaliação da tolerância à glicose e de marcadores da síntese glicose hepático em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com GT.

**Figura 21:** Avaliação de marcadores da síntese e do conteúdo de glicogênio hepático em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

**Figura 22:** Avaliação do efeito das catequinas do GT no acúmulo lipídico de células HEPG2 tratadas com ácido oleico, glicose e anticorpo (Ant.) do receptor de adiponectina ADIPOR2

**Figura 23:** Efeito do mix de catequinas no acúmulo lipídico em células HepG2 induzidas à esteatose

**Figura 24:** Efeito do mix de catequinas na expressão de marcadores de lipogênese em células HepG2 induzidas à esteatose e tratadas com agonista de Ppar $\alpha$  na presença e ausência de antagonista

---

**Figura 25:** Efeito do mix de catequinas na expressão de marcadores de catabolismo lipídico em células HepG2 induzidas à esteatose e tratadas com agonista de PPAR $\alpha$  na presença e ausência de antagonista

**Figura 26:** Avaliação da transativação de PPAR $\alpha$  pelas catequinas do GT

**Figura 27:** Representação gráfica dos resultados obtidos a partir do tratamento crônico com GT em animais selvagens e AdipoKO e células HepG2 tratadas com as catequinas do GT em condições de antagonismo de PPAR $\alpha$ .

---

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Sequência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR.

**Tabela 2:** Descrição dos anticorpos utilizados para a realização dos ensaios de expressão proteica.

**Tabela 3 -** Caracterização do modelo experimental em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).

---

## Lista de Abreviaturas

**ACBP** – AcylCoA binding protein  
**ACC** - Acetil-CoA carboxilas  
**ACL** - Acetil citrato liase  
**ACRP30** - Proteína de adipócitos relacionado ao complemento  
**ACSL** - Long-chain acylCoA synthetases  
**AGCL** - Ácidos graxos de cadeia longa  
**AdipoR1** - Receptor de adiponectina 1  
**AdipoR2** - Receptor de adiponectina 2  
**AdipoKO** - Nocaute para Adiponectina  
**AG** - Ácido graxo  
**AGL** - Ácidos graxos livres  
**AKT** - Proteína quinase B  
**AMPc** - Monofosfato de adenosina cíclico  
**AMPK** - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina  
**apM1** - Transcrito genético 1 mais abundante em adipócitos  
**APPL-1** - PH domain and leucine zipper 1  
**ATP** - Adenosina-3-fosfato  
**AUC** - Área sob a curva  
**CAT** - Catalase  
**CBL** – Ligase protein ubiquitina E3  
**CAP** - Catabolite activator protein  
**CACT** - Acyl-carnitine cotransporter  
**cDNA** – ácido desoxirribonucleico complementar  
**ChREBP** - Carbohydrate-responsive element binding protein  
**COMT** - Catecol-O-metiltransferase  
**COX** - ciclooxigenase  
**CPT-1** – Carnitine palmitoyl transferase 1  
**CPT-2** – Carnitine palmitoyl transferase 2  
**CREBH** – Endoplasmic Reticulum-Bound Transcription Factor  
**CRKII** – Adapter molecule Crk  
**DGAT** - diacilglicerol transferase  
**DM-2** - Diabetes Melitus tipo 2

---



**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**EGCG** - Epigallocatequina 3-galato  
**EGC** - Epigallocatequina  
**ECG** - Epicatequina 3-galato  
**EC** - Epicatequina  
**ECL** – Enhanced chemiluminescence  
**ELOVL** – Elongation of very long chain fatty acids protein 5  
**EPM** - Erro padrão da média  
**ERE** - Estresse do reticulo endoplasmático  
**ERK 1-2** - Quinase de resposta extracelular  
**ERp44** – Endoplasmic Reticulum Protein 44  
**ERO1** –ER oxidoreductin 1  
**FAS** - Ácido graxo sintase  
**FAT/CD36** – Fatty acid transporter CD36  
**FATP** - Fatty acid transporter protein  
**FBPase** - Frutose-bi-fosfatase  
**FGF-21** - Fator de crescimento de fibroblasto 21  
**FOXO-1** - Forkhead Box protein O  
**Gama GT** – Gammaglutamyl transferase  
**GBP28** - Proteína ligante de gelatina 28  
**GF** - Glicogênio fosforilase  
**GLP-1** - Glucagon like peptide1  
**GLUT-1** - Glucose transporter 1  
**GLUT-2** - Glucose transporter 2  
**GLUT-4** - Glucose transporter 4  
**GPAT** - Glicerol-3-fosfato acetil transferase  
**GS** - Glicogênio sintase  
**GSK** - Glicogênio sintase quinase  
**GT** - Chá Verde  
**GTT** - Teste de tolerância a glicose  
**HDL** - High density lipoprotein  
**HE** - Hematoxilina e eosina  
**HFD** - High fat diet  
**HIF2 $\alpha$**  - Fator de hipoxia induzível

---

**HNF-4** - Hepatic nuclear factor-4  
**HSL** – Lipase hormônio sensível  
**IL1-β** - Interleucina 1 beta  
**IL-6** - Interleucina 6  
**IMC** - Índice de massa corpórea  
**INSIG** – Insulin induced gene  
**IRS-1** - Substrato do receptor de insulina 1  
**IRS-2** - Substrato do receptor de insulina 2  
**IRTK** - Receptor de insulina com atividade tirosina quinase intrínseca  
**ITT** - Teste de tolerância a insulina  
**JNK** - Janus Kinase  
**LDL** - Low density lipoprotein  
**LDH** - Lactato desidrogenase  
**LOX** - Lipoxigenase  
**LPL** - Lipoproteína lipase  
**LPS** - Lipopolissacarídeo  
**MCP-1** - Proteína ativadora de macrófagos 1  
**MAPK** - MAP quinases  
**MGL** - Monoacilglicerol lipase  
**NAFLD** - Doença hepática gordurosa não alcoólica  
**NASH** - Nonalcoholic steatohepatitis  
**ND** - Normal diet  
**NFκB** - Nuclear factor kappa B  
**p38MAPK** - Proteína de 38 kDa  
**PBS** – Tampão fosfato  
**PC** – Piruvato carboxilase  
**PDH** – Piruvato desidrogenase  
**PEPCK** – Fosfoenol piruvato carboxiquinase  
**PGC1α** - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha  
**PKA** - Proteína quinase A  
**PI3K** - Phosphoinositide-3-kinase  
**PP2** - Phosphatase protein 2  
**PPARα** - Peroxisome proliferator-activated receptor alpha  
**PPARβ/δ** - Peroxisome proliferator-activated receptor beta

---

**PPAR $\gamma$**  - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
**PPRE** – Elemento responsivo à PPAR  
**PRKAA2** - Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 2  
**PXR** - Pregnancy X Receptor  
**qPCR** - Quantitative polymerase chain reaction  
**RER** - Relação de troca respiratória  
**RI** - Resistência à Insulina  
**RIPA** – Radioimmunoprecipitation assay buffer  
**RNA** – Ácido Ribonucléico  
**ROS** - Espécies reativas de oxigênio  
**RXR** - Retnoid X receptor  
**SCAP** - SREBP cleavage activating protein  
**SCD** - Esteaoril desaturase 1  
**SIRT** - Sirtuin 1  
**SNC** - Sistema Nervoso Central  
**SOD** - Superóxido dismutase  
**SREBP1c** - Sterol regulatory element binding protein 1c  
**SREBP2** - Sterol regulatory element binding protein 2  
**STK11** - Serina-treonina quinase 11  
**TA** - Tecido adiposo  
**TAB** - Tecido adiposo branco  
**TAM** - Tecido adiposo marrom  
**TG** -Triglicerídeos  
**TGO** - Transaminase oxaloacética glutâmica  
**TGP** - Transaminase pirúvica glutâmica  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa  
**TZD** - Tiazolidinadionas  
**VCO<sub>2</sub>** - Produção de dióxido de carbono  
**VO<sub>2</sub>** - Consumo de oxigênio  
**VLDL** - Very low density lipoprotein  
**WT** - Wild type

---

## Sumário

<b>1.0. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1. Compostos naturais e chá verde .....	22
1.2. Considerações gerais sobre obesidade.....	26
1.3. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) e Obesidade.....	28
1.4. Adiponectina e obesidade .....	29
1.5. Fígado e suas funções metabólicas .....	34
1.6. Efeitos da obesidade e do PPAR no metabolismo hepático .....	41
1.7. Efeitos da obesidade e da adiponectina no metabolismo hepático .....	43
<b>2.0. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos Específicos.....	47
2.2.1. In vivo.....	47
2.2.2. In vitro.....	48
<b>3.0. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
3.1. Animais.....	50
3.2. Indução da obesidade .....	50
3.3. Grupos experimentais, tratamento com extrato de CV in vivo, eutanásia e acondicionamento das amostras .....	51
3.4. Avaliação da taxa metabólica basal (calorimetria) .....	51
3.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos .....	52
3.6. Teste de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT).....	52
3.7. Avaliação histológica do tecido hepático .....	53
3.8. Coloração do fígado para quantificação de glicogênio através do método de PAS	53
3.9. Coloração do fígado para quantificação de lipídios através do método de Oil Red O53	
3.10. Quantificação hepática de TG e Colesterol Total .....	54

---

<b>3.11. Extração de RNA total das células e ou tecidos .....</b>	<b>54</b>
3.11.1. Extração de RNA total .....	54
3.11.2. Reação de RT (transcrição reversa) .....	54
3.11.3. PCR quantitativo para análise da expressão gênica.....	55
<b>3.12. Avaliação da expressão proteica pelo método de <i>western blotting</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>3.13. Indução de esteatose <i>in vitro</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>3.14. Tratamentos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>3.15. Coloração <i>Oil Red O</i> e mensuração do conteúdo de triglicérides .....</b>	<b>59</b>
<b>3.16. Transativação do PPAR pelas catequinas do GT .....</b>	<b>60</b>
<b>3.17. Análise Estatística .....</b>	<b>60</b>
<b>4.0. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1. A falta de adiponectina prejudica o efeito antiobesidade do GT pela inibição da indução do gasto energético .....	61
4.2. O GT melhora a sensibilidade à insulina e a ausência de adiponectina atenua esse efeito resultando em hiperinsulinemia.....	66
4.3. A falta de adiponectina reduz a capacidade do GT de induzir a expressão de marcadores de “ <i>output</i> ” de lipídios hepáticos .....	69
4.4. Efeito do GT sobre a esteatose hepática é perdido com a falta de adiponectina	72
4.5. A falta de adiponectina aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese de TG e reduz a expressão gênica e proteica de marcadores de síntese de colesterol.....	75
4.6. A falta de adiponectina não interfere na capacidade do GT de melhorar a tolerância à glicose, porém reduz o conteúdo de glicogênio hepático .....	78
4.7. As catequinas do GT reduzem o acúmulo de TG em células HepG2 de forma independente do receptor de adiponectina ADIPOR2.....	81
4.8. O tratamento <i>in vitro</i> com as catequinas do GT reduziu o acúmulo de TG nas células HepG2 por reduzir a expressão de genes lipogênicos e aumentar a expressão de genes de oxidação de forma dependente de PPAR $\alpha$ .....	83
4.9. As catequinas do GT, EGC e EC são capazes de ligar diretamente ao PPAR $\alpha$ de maneira dose-dependente .....	87

---

<b>5.0. DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6.0. CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>7.0. REFERENCIAS .....</b>	<b>96</b>

---

## 1.0. INTRODUÇÃO

### 1.1. Compostos naturais e chá verde

Compostos naturais representam qualquer substância retirada de fonte vegetal e/ou animal (Newman e Cragg, 2016) que apresentam propriedades benéficas à saúde humana, além de possuir um valor nutricional básico, o que os caracteriza como compostos nutracêuticos (Rochlani *et al.*, 2017).

Os compostos naturais têm sido utilizados em diversas condições devido a sua ampla gama de efeitos benéficos. Dentre estes efeitos, destacam-se a modulação da proteína ATP sintase (Gibellini *et al.*, 2015), diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (Gibellini *et al.*, 2015), ação anti-inflamatória por ação sobre enzimas como a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), além de inibição da transcrição do fator de transcrição NFκB (nuclear factor kappa B) (Koeberle e Werz, 2014), dentre outros efeitos.

Adicionalmente diversos compostos naturais tem apresentado importantes ações metabólicas como: (1) aumento nos níveis de adiponectina e diminuição dos níveis de leptina plasmática (Rochlani *et al.*, 2017), (2) melhora da sensibilidade à insulina (Padiya *et al.*, 2011), (3) melhora do perfil glicêmico e lipídico plasmático (Ziegenfuss *et al.*, 2006), (4) diminuição da lipogênese (Yang *et al.*, 2012), (5) diminuição da atividade de glicosidases (Bhat *et al.*, 2011) e (6) diminuição da adipogênese (Leisher *et al.*, 2016), entre outros.

As plantas representam uma fonte importante de compostos naturais. Estes compostos podem em alguns casos, não serem importantes para o metabolismo da planta, mas exercem importantes ações sobre os mecanismos de defesa desempenhando atividade antimicrobiana (Ncube *et al.*, 2008) e antioxidante por exemplo (Rates, 2001; Samuelsson e Bohlin, 2017).

A escolha, de se estudar um determinado composto natural deve ser embasada nas características químicas, conteúdo disponível para prospecção, toxicidade e efeitos adversos. Uma das estratégias mais comuns para se iniciar os estudos sobre um determinado composto é conhecer sua aplicação *in natura* em diferentes condições de culturas celulares (Dixon, 2001; Samuelsson e Bohlin, 2017).

O estudo e o desenvolvimento de fármacos a partir de drogas encontradas em plantas têm sido alvo de diversos estudos (Dixon, 2001; Rates, 2001;

Samuelsson e Bohlin, 2017). No entanto, o isolamento de determinado composto em meio a um extrato qualquer pode representar um alto custo financeiro e ambiental, visto que, em muitos casos é necessário utilizar grandes quantidades de matéria bruta para se extrair pequenas quantidades do composto ativo (Dixon, 2001; Rates, 2001; Samuelsson e Bohlin, 2017). Diante disto é viável, ao invés de se isolar determinada substância, utilizar o próprio extrato na sua forma bruta e investigar suas funções fisiológicas.

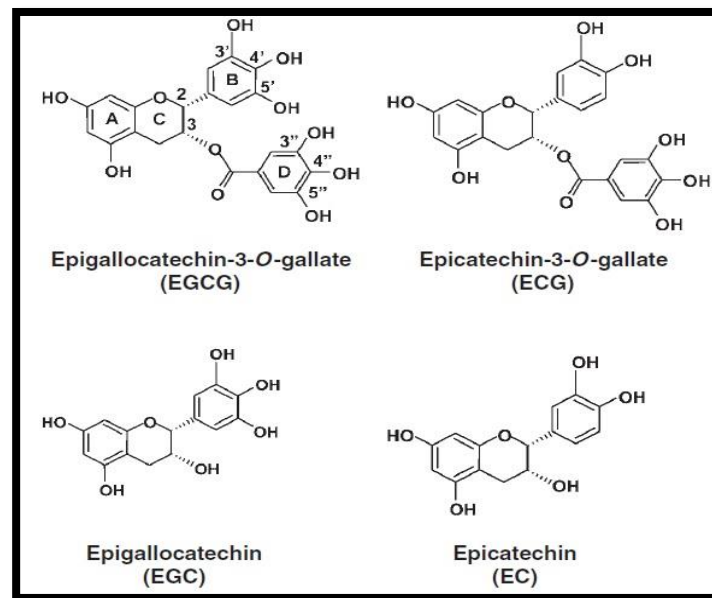
O chá verde (no inglês *green tea* - GT) produzido a partir da planta *Camelia sinensis* é uma bebida amplamente utilizada no mundo há milhares de anos, principalmente em países orientais (Tomata *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). O GT apresenta diversas atividades biológicas como: a diminuição dos níveis de leptina sérica, inibição da formação de tromboxano, redução da agregação plaquetária, redução da pressão arterial, supressão do metabolismo dos lipídios como diminuição do LDL colesterol e aumento do HDL colesterol, diminuição do ganho peso além da inibição da esteatose (Mukhtar e Ahmad, 2000; Skrzydlewska *et al.*, 2002; Yokozawa *et al.*, 2002; Crespy, V. e Williamson, G., 2004; Henning *et al.*, 2004; Negishi *et al.*, 2004; Cheng, 2006).

No entanto os efeitos biológicos mais bem estudados do GT são a atividade antioxidante (Delwing-Dal Magro *et al.*, 2016; Gerolis *et al.*, 2017) e anti-inflamatória (Li *et al.*, 2017), sendo que estes efeitos têm sido fortemente relacionados com a presença de grandes quantidades de compostos conhecidos como catequinas (Marinovic *et al.*, 2015).

As catequinas são classificadas como polifenóis e estão incluídas na subclasse de flavan-3-ols (Moser *et al.*, 2014; Watrelot *et al.*, 2016). As quatro principais catequinas encontradas no GT são epicatequina (EC), epicatequina 3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC) e epigalocatequina 3-galato (EGCG), sendo a EGCG a mais estudada e mais abundante (Figura 1) (Cooper *et al.*, 1994; Negishi *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Estrutura química das catequinas.



Adaptado de Negishi, H., J. W. Xu, et al. (2004). "Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *J Nutr* **134**(1): 38-42.

Uma vez dentro das células, estes compostos, podem atuar em diversas vias, modulando desta forma o processo inflamatório. Segundo (Singh *et al.*, 2010), a EGCG pode interagir com a via das MAP quinases, atuando na inibição da fosforilação da Janus Kinase (JNK), sem apresentar efeitos sobre a proteína de 38 kDa (p38) e a quinase de resposta extracelular (ERK). No entanto, a ação sobre a JNK já é suficiente para a diminuição do AP1, um fator de transcrição envolvido com a expressão de agentes pró-inflamatórios.

Durante a obesidade há o desenvolvimento de uma condição conhecida como inflamação crônica de baixo grau, que é caracterizada pelo aumento nos níveis circulantes de citocinas pro-inflamatórias apesar de não haver os sinais clássicos desta resposta (Mraz e Haluzik, 2014; Bleau *et al.*, 2015; Cooke *et al.*, 2016). A inflamação crônica de baixo grau é um dos principais responsáveis pelo surgimento de resistência à insulina e desenvolvimento da síndrome metabólica (Ding, Y. *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da síndrome metabólica tem sido inversamente relacionado com os níveis plasmáticos de adiponectina (Nigro *et al.*, 2014; Balsan *et al.*, 2015; Ohashi *et al.*, 2015), uma adipocina com conhecida atividade antioxidante (Neumeier *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015) e anti-inflamatória (Wang *et al.*, 2016;

Boursereau *et al.*, 2017). Por outro lado, estudos demonstram que o tratamento com GT é capaz de aumentar os níveis circulantes de adiponectina tanto em camundongos (Otton *et al.*, 2018) como em ratos (Rocha *et al.*, 2016) expostos a diferentes tipos de dieta hiperlipídica e hipercalórica, respectivamente.

Adicionalmente estudos do grupo da pesquisadora Rosemari Otton, co-orientadora neste projeto, indicam, que apesar de não ter sido observado inflamação hepática, por meio da realização do escore de NAS (Brunt *et al.*, 2011) após 20 semanas de dieta hiperlipídica, foi possível correlacionar a redução nos níveis de adiponectina com o aumento nos marcadores inflamatórios circulantes como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina1 beta (IL1- $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e a proteína ativadora de macrófagos 1 (MCP-1) (Otton *et al.*, 2018).

Por outro lado o tratamento com GT restabeleceu os níveis de adiponectina, reduzindo o ganho de peso, melhorando a sensibilidade a insulina e a inflamação crônica de baixo grau (Otton *et al.*, 2018).

Outros estudos realizados com GT nos últimos anos vêm propondo diversos mecanismos de ação para a redução do ganho de peso (Rains *et al.*, 2011). Uma das hipóteses propostas é o aumento do gasto energético através da inibição da enzima Catecol-O-metiltransferase (COMT) responsável pela degradação da norepinefrina. Outra possibilidade envolve a ação do GT sobre o coeficiente respiratório, induzindo uma maior oxidação de gordura por indivíduos que ingeriram 350mg de GT/dia (Dulloo *et al.*, 1999; Boschmann e Thielecke, 2007; Hursel *et al.*, 2011). Foi observado também recentemente, que as catequinas do GT atuam de forma dependente do receptor adrenérgico  $\beta$ -3, na indução de vias de gasto energético no tecido adiposo marrom (TAM) (Sousa-Filho, Celso Pereira Batista *et al.*, 2020).

Uma terceira possibilidade é a capacidade do GT em reduzir a absorção de certos nutrientes, por meio da ação das catequinas sobre a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase, responsáveis por quebrar moléculas de carboidrato a fim de facilitar a absorção de glicose. Quando estas enzimas estão inibidas a absorção deste nutriente é diminuída favorecendo o processo de perda de peso (Rains *et al.*, 2011).

Por fim, tem sido sugerido que a suplementação com GT, modula o perfil energético hepático, induzindo vias oxidativas, aumentando a produção de ATP (Friedman, 2007; Maki *et al.*, 2009). Este efeito resulta na indução de sinais enviados ao sistema nervoso central (SNC) pelo nervo vago, que sinalizam a

redução do apetite (Friedman, 2007; Maki *et al.*, 2009). Assim, quando há uma redução na oxidação de gordura hepática, isto poderia estar relacionado com a redução nos níveis de ATP, reduzindo a transmissão de sinal ao SNC e o aumento de apetite (Rains *et al.*, 2011).

A abrangente produção científica acerca de possíveis mecanismos de ação antiobesidade do GT, juntamente com o crescimento epidemiológico da obesidade (Who, 2017), aumenta o interesse da aplicação do GT na obesidade e suas complicações como a resistência à insulina e a esteatose hepática, condições que juntas representam a síndrome metabólica.

## **1.2. Considerações gerais sobre obesidade**

A obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura capaz de causar danos à saúde (Rothberg e Halter, 2015). Estudos sugerem que a principal causa do desenvolvimento desta condição é o desbalanço entre a ingestão e o gasto calórico, situação em que a primeira supera a segunda, resultando em um acúmulo de gordura sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo – TA (Johnson *et al.*, 2016).

A localização da deposição de gordura corporal na obesidade pode ser diferenciada como central e periférica. A obesidade central (caracterizada por um aumento no depósito visceral) está correlacionada com o aumento do risco de se desenvolver complicações como Diabetes Melitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Ahmad *et al.*, 2016; Kuwabara *et al.*, 2017). Já a obesidade periférica (caracterizada por um aumento na massa do tecido subcutâneo) relaciona-se com a melhora da sensibilidade à insulina e menores riscos de se desenvolver complicações cardiovasculares, comparado a obesidade central (Misra *et al.*, 1997; Snijder *et al.*, 2003).

Diante disto, estudos observacionais têm demonstrado que a obesidade abdominal, especialmente no que se refere ao aumento da massa do TA visceral (St-Pierre *et al.*, 2002), juntamente com o acúmulo de gordura hepática (esteatose) (Naukkarinen *et al.*, 2014), são os dois principais preditores dos distúrbios cardiometabólicos e do desenvolvimento de DM2 (Bogl *et al.*, 2016).

A principal função do TA é o estoque de energia sob a forma de triglicerídeos (TG) realizado durante o período prandial. Em condições de jejum, o TG é liberado

na forma de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, por meio da ação de hormônios como o glucagon e a noradrenalina (Vazquez-Vela *et al.*, 2008). Muitos estudos demonstram que a exposição a uma dieta hiperlipídica tanto em ratos (8 semanas) (Chien *et al.*, 2016) como em camundongos (12 semanas) (Ding *et al.*, 2016) são capazes de induzir um quadro de obesidade evidenciado pelo aumento dos depósitos adiposos, acompanhado por alterações nos genes lipogênicos e lipolíticos principalmente no fígado (Ding *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado também que uma dieta hipercalórica (Rocha *et al.*, 2016; Nam *et al.*, 2018) provoca alterações nas vias de lipogênese e lipólise, resultando em um aumento nos depósitos adiposos, principalmente, o depósito visceral.

Além da capacidade já bem descrita do TA, de estocar e liberar substratos energéticos para outros tecidos (Cryer e Jones, 1979), nos últimos anos vêm se dando muita atenção a capacidade do TA em secretar inúmeras adipocinas, substâncias que podem ser hormônios, citocinas ou peptídeos com diversas funções biológicas (Meister, 2000; Morrison e Farmer, 2000; Fasshauer e Blüher, 2015; Arner *et al.*, 2018). Por estas razões, podemos dizer que o TA possui uma importante influência nos processos fisiológicos como, por exemplo: (1) controle do perfil lipídico sistêmico e (2) participação na homeostase energética devido ao controle hormonal (Vazquez-Vela *et al.*, 2008).

Entre as diversas adipocinas produzidas pelo tecido adiposo destacam-se a adiponectina, leptina, resistina, visfatina, quemerina entre outras. Estas moléculas podem atuar em diversos mecanismos regulatórios assim como patológicos dependendo das características fenotípicas e genotípicas do TA (Zorena *et al.*, 2020). Altos níveis plasmáticos de leptina estão diretamente relacionados com: (1) o aumento da massa e do tamanho dos adipócitos (Zorena *et al.*, 2020), (2) a produção de espécies reativas de oxigênio por células imunes como macrófagos e células natural killers (Hsu *et al.*, 2015), (3) aumento dos níveis séricos de lipídios (Zorena *et al.*, 2020), (4) inibição do apetite (Zorena *et al.*, 2020), (5) arteriosclerose (Morioka *et al.*, 2014), (6) neuropatia entre outros efeitos.

Outros exemplos de adipocinas envolvidas com as complicações da obesidade são a resistina e a visfatina. A resistina produzida principalmente por células inflamatórias periféricas, tem sido relacionado com o surgimento de distúrbios vasculares, inflamatórios e como indutor de DM2 (Reilly *et al.*, 2005). A visfatina, por sua vez, atua em pré adipócitos estimulando sua diferenciação e

induzindo respostas vasculares como a vasodilatação via produção de óxido nítrico (NO) e inflamação via produção de TNF- $\alpha$  (Gulcelik *et al.*, 2009).

Por outro lado a adiponectina está inversamente relacionada com o tamanho dos adipócitos e é bem descrita por apresentar efeitos anti-inflamatórios e indutores de vias oxidativas no próprio tecido adiposo como no fígado de forma dependente de FGF-21 e PPAR $\alpha$  (Zorena *et al.*, 2020).

Tem se observado que a suplementação de compostos bioativos, como, por exemplo, a curcumina (Ding *et al.*, 2016), o GT (Rocha *et al.*, 2016) e a EGCG (Chien *et al.*, 2016), em modelos animais de obesidade, resultou na modulação de um importante fator de transcrição para os adipócitos, o PPAR $\alpha$  e o PPAR $\gamma$ , além do aumento nos níveis de adiponectina.

### **1.3. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) e Obesidade**

Os denominados PPARs são parte de uma superfamília de fatores de transcrição nucleares. Nesta classe, existem três isoformas, descritas como PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , expressas pelos genes NR1C1, NR1C2 e NR1C3, respectivamente (Dubois *et al.*, 2017). Tais receptores apresentam distribuição, sensibilidade e vias de regulação e atividade metabólica distintos. São em sua maioria ativados por ligantes endógenos como os AG e seus derivados, além de alguns agonistas sintéticos (Dubois *et al.*, 2017). Em geral os agonistas interagem com o domínio de ligação causando ao fator de transcrição uma mudança conformacional seguido de uma heterodimerização com o RXR (Retonoid X receptor), e, por fim a ligação com o elemento responsivo ao PPAR (PPRE) (Dubois *et al.*, 2017; Gross *et al.*, 2017a).

Como mencionado acima, os PPARs podem ser ativados por: (1) AG, oriundos de lipídios provenientes da dieta, lipólise do tecido adiposo e pela produção hepática (processo conhecido como *de novo* lipogênese) e (2) agonistas sintéticos como a classe dos fibratos e das tiazolidinadionas (TZDs) que podem ativar de forma seletiva ou inespecífica um ou mais subtipos de PPAR (Dubois *et al.*, 2017).

O PPAR $\alpha$ , é uma isoforma altamente expressa no fígado onde sua ativação regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e de lipoproteínas durante fases de transição nutricional. Por exemplo, durante o jejum, o

PPAR $\alpha$  induz vias de captação e de transporte mitocondrial de AG (Pawlak *et al.*, 2015; Dubois *et al.*, 2017).

Durante a obesidade, a ativação do PPAR $\alpha$  suprime a resposta inflamatória, através da diminuição da hipertrofia de adipócitos e pela direta regulação de genes inflamatórios. Foi demonstrado que animais PPAR $^{-/-}$  suplementados com dieta hiperlipídica apresentaram maiores níveis de marcadores inflamatórios e aumento na massa de tecido adiposo e tecido estromal (Tsuchida *et al.*, 2005; Jernås *et al.*, 2006; Stienstra *et al.*, 2007).

O PPAR $\delta$ , também expresso em hepatócitos, assim como em células de Kupffer e células estreladas, possui um papel importante na inflamação e na fibrose hepática (Vega *et al.*, 2003; Group, 2010; Sengupta *et al.*, 2010). Tem sido mostrado que a ativação do PPAR $\delta$  no tecido adiposo causa uma redução na expansão do tecido e a redução de marcadores inflamatórios, em animais induzidos a obesidade, por estimular vias de oxidação hepática (Wang *et al.*, 2003).

Ao contrário aos PPAR $\alpha$  e PPAR $\delta$  que atuam induzindo vias de oxidação, o PPAR $\gamma$  atua, durante a obesidade, através de múltiplos mecanismos que resultam na melhora da sensibilidade à insulina e da utilização de glicose pelo fígado e outros tecidos periféricos (Dubois *et al.*, 2017). Estes efeitos podem ocorrer através da: (1) interferência na via de sinalização do NF $\kappa$ B e na diferenciação de macrófagos melhorando o perfil inflamatório do tecido adiposo (Okuno *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998; Lehrke e Lazar, 2005) e (2) pelo aumento da expansividade do TA captando uma maior quantidade de lipídios e diminuindo assim acúmulos ectópicos em tecidos como fígado e músculo esqueléticos. Este mecanismo resulta também da capacidade da sinalização de PPAR $\gamma$  induzindo um aumento da produção de adiponectina pelos adipócitos (Schadinger *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006).

#### **1.4. Adiponectina e obesidade**

A adiponectina é uma proteína de 247 aminoácidos, estruturalmente formada por um domínio globular composto por 135 aminoácidos, uma porção mutável formada por colágeno e composta de 65 aminoácidos, uma sequência N-terminal sinal e um domínio variável (Ghadge *et al.*, 2018).

A adiponectina foi inicialmente identificada por quatro grupos de pesquisa, que utilizando diferentes métodos de identificação, designaram diferentes nomes para a mesma molécula. Em 1995 Scherer e Lodish, associaram a adiponectina com a diferenciação de células 3T3 (linhagem de adipócitos brancos) e a nomearam de proteína de adipócitos relacionado ao complemento (ACRP30) (Scherer *et al.*, 1995). No ano seguinte, Spiegelman e colaboradores demonstraram a expressão específica desta no TA, e a chamaram de proteína AdipoQ (Hu *et al.*, 1996).

No ano seguinte, houve a identificação da expressão de uma proteína em humanos que mantinha 83% de similaridade com a adiponectina de camundongos, sendo assim, recebeu o nome de transcrito genético 1 mais abundante em adipócitos (apM1) (Maeda *et al.*, 1996). E por fim, neste mesmo ano, Tomita e colaboradores, descreveram os níveis plasmáticos de adiponectina, chamando-a de proteína ligante de gelatina 28 (GBP28) (Nakano *et al.*, 1996).

Posteriormente em 1998, foi definido a estrutura globular da adiponectina e três a quatro anos depois, foi demonstrada pela primeira vez suas atividades fisiológicas que estavam relacionadas com ações anti-inflamatórias (Scherer e Lodish, 1999).

Em 2003 foram identificados os receptores de adiponectina, que passaram a ser conhecidos como AdipoR1 e AdipoR2. Cerca de 5 anos depois (2008), foi identificado parte do processo de síntese e maturação desta proteína, que envolve a ação de duas chaperonas, conhecidas como ERp44 e ERO1, importantes para o dobramento da adiponectina (Wang e Scherer, 2016).

Posteriormente entre 2010 a 2016, foi desvendada a estrutura dos receptores de adiponectina e também demonstrado a atividade ceramidase desta adipocina. Esta atividade biológica é extremamente importante para o fígado, uma vez que, as ceramidas estão relacionadas com o desenvolvimento da esteohepatite por induzir processos como o estresse oxidativo, a inflamação, a resistência à insulina e a apoptose de hepatócitos (Wang e Scherer, 2016).

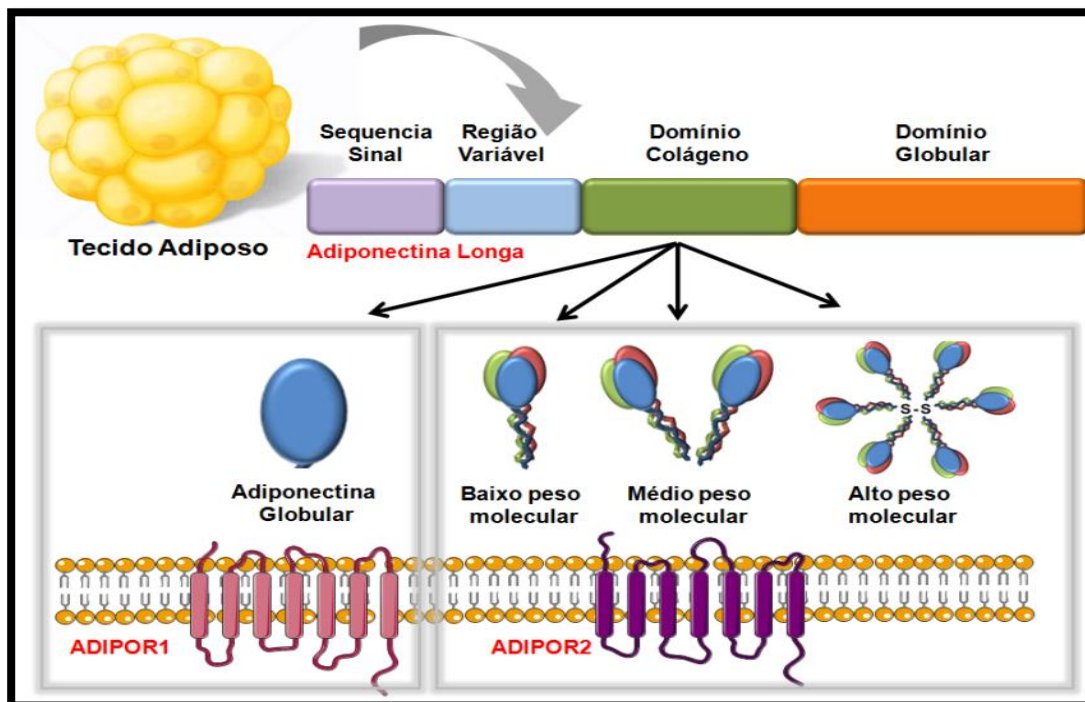
Por fim, em 2017, foi demonstrado que tal adipocina pode ser produzida por outros tipos celulares como osteoblastos, células do parênquima hepático, miócitos, células endoteliais entre outras (Achari e Jain, 2017).

Nos dias de hoje conhecemos duas estruturas diferentes da adiponectina: (1) a forma longa (sendo adicionalmente subdividida em de baixo, médio e de alto peso molecular) e (2) globular, que sofre clivagem na sua porção colágena e resulta na

separação da estrutura globular (Figura 2) (Fruebis *et al.*, 2001). As diferentes isoformas apresentam também diferentes efeitos biológicos. A adiponectina globular é capaz de estimular a  $\beta$ -oxidação no músculo esquelético, enquanto que a adiponectina “longa”, que não passa por clivagem, atua diminuindo a produção de glicose hepática (Berg *et al.*, 2001; Fruebis *et al.*, 2001).

Seus efeitos pleiotrópicos têm sido reportados por meio de sua interação com o AdipoR1 e o AdipoR2 (Ghadge *et al.*, 2018). O AdipoR1 é mais expresso no músculo esquelético e é responsável por ativar a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Ghadge *et al.*, 2018). O AdipoR2, predominantemente expresso no fígado, é responsável por regular o metabolismo lipídico e glicêmico, além do estresse oxidativo e processos inflamatórios (Kadowaki *et al.*, 2006; Ghadge *et al.*, 2018). Além de possuírem sítios e alvos diferentes, estes receptores possuem afinidades diferentes (Ghadge *et al.*, 2018). Por exemplo, o receptor AdipoR1 possui alta afinidade à adiponectina globular, e fraca afinidade à adiponectina longa, por outro lado o AdipoR2 apresenta sensibilidade inversa respondendo melhor à adiponectina longa que a globular (Figura 2) (Ghadge *et al.*, 2018).

**Figura 2:** Representação estrutural das isoformas da adiponectina e sua seletividade para determinados receptores.



Adaptado de Fruebis *et al.*, 2001 e Ghadge *et al.*, 2018.

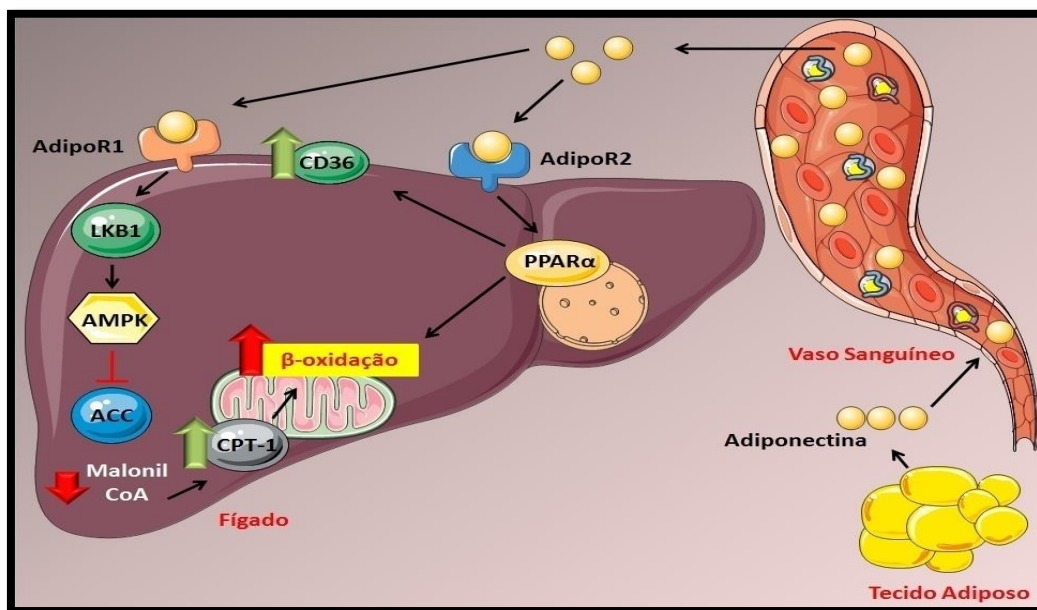


No fígado, a ação da adiponectina via seus receptores hepáticos pode induzir a redução da lipogênese e o aumento da beta oxidação por dois mecanismos distintos. O primeiro deles envolve a sensibilização do receptor AdipoR1, ativando a serina-treonina quinase 11 (STK11) também conhecida como LKB1 (Boudeau *et al.*, 2003), responsável pela fosforilação da proteína quinase ativada por 5'AMP (AMPK) (Hardie e Pan, 2002).

Depois de ativada, a AMPK fosforila e inibe a enzima acetilCoA carboxilase (ACC), reduzindo a formação de malonilCoA, responsável pela inibição da *Carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT-1), o que leva ao aumento da beta oxidação (Hardie e Pan, 2002) (Figura 3). A ativação de AdipoR1 também pode regular a capacidade do fígado em estocar gordura sob a forma de TG, pela diminuição da expressão do fator de transcrição SREBP1c, responsável pela regulação das enzimas lipogênicas hepáticas (Zietz *et al.*, 2003).

O segundo mecanismo envolve a sensibilização do receptor AdipoR2, que é responsável por aumentar a atividade de PPAR $\alpha$  (Yamauchi *et al.*, 2003; Neumeier *et al.*, 2005). O PPAR $\alpha$  induz a maior captação de ácidos graxos pelo fígado pela translocação do transportador de ácidos graxos FAT/CD36, assim como uma maior atividade da CPT-1 estimulando a beta oxidação, prevenindo desta forma o estoque de TG (Figura 3) (Wierzbicki *et al.*, 2009).

**Figura 3:** Efeitos da adiponectina sobre as vias metabólicas hepáticas.



Adaptado de Buechler, C., J. Wanninger, et al. (2011). "Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases." *World J Gastroenterol*17(23): 2801-2811.

Como podemos observar, a adiponectina é uma importante indutora das rotas metabólicas hepáticas, porém ela não é expressa no fígado, e sim no tecido adiposo subcutâneo principalmente (Fisher *et al.*, 2002; Lihn *et al.*, 2004). Adicionalmente, estas sua concentração podem aumentar de 50 a 100 vezes durante a diferenciação de adipócitos, o que a caracteriza como um importante marcador de adipócitos maduros (Lihn *et al.*, 2005).

Este aumento, segundo alguns autores, pode ser induzido pelo aumento na expressão de PPAR $\gamma$  no TA funcionando como um mecanismo de proteção contra a obesidade (Phillips *et al.*, 2008; Liu e Liu, 2009; Shiomi *et al.*, 2015). Esta relação foi sugerida mostrando que o tratamento com tiazolidinadionas (TZDs), um agonista de PPAR $\gamma$ , está relacionado com maiores níveis de adiponectina (Adamia *et al.*, 2007). No entanto, o mesmo perfil não foi observado durante o tratamento com outros hipoglicemiantes orais (Adamia *et al.*, 2007), como a metformina que pode atuar sob o receptor de insulina (IR), assim como aumentar os níveis circulantes de GLP-1 (*glucagon like peptide 1*) (Viollet *et al.*, 2012), e as sulfoniluréias, que estimulam a secreção de insulina por bloquear os canais de potássio sensíveis ao ATP (Ashcroft, 1996).

Por outro lado, os níveis plasmáticos de adiponectina estão significativamente diminuídos e seus receptores estão menos expressos em indivíduos obesos comparado a sujeitos magros (Kadowaki *et al.*, 2006). Adicionalmente existe uma correlação inversa entre os níveis de adiponectina com a circunferência abdominal (Isomaa *et al.*, 2001; Orchard *et al.*, 2003; Ghadge *et al.*, 2018) e com o índice de massa corpórea (IMC), tanto em humanos como em animais (Lihn *et al.*, 2005; Jung e Choi, 2014).

Apesar da obesidade, estar diretamente associada com os menores níveis de adiponectina, há relatos que alterações genéticas que afetem a expressão desta adipocina podem predispor o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Chang *et al.*, 2018). Tsai e colaboradores demonstraram que uma alteração no alelo T do gene da adiponectina estava presente em todos os indivíduos classificados como obesos portadores de anormalidades metabólicas (Chang *et al.*, 2018). Outro

estudo, também demonstrou uma relação inversa do polimorfismo do gene ADIPOQ com o IMC de jovens nigerianos (Ogundele *et al.*, 2018).

Nos últimos anos foi demonstrado que a adiponectina é capaz de modular a função hepática (Ghadge *et al.*, 2018). Existe uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos desta adipocina e biomarcadores de dano hepático como a transaminase oxaloacética glutâmica (TGO), a transaminase pirúvica glutâmica (TGP), a gamma glutamyltransferase (Gama GT) e a fosfatase alcalina (Ghadge *et al.*, 2018). Adicionalmente sabe-se que menores concentrações de adiponectina correlacionam-se com maior deposição de ácidos graxos hepáticos devido à diminuição da oxidação de AG neste tecido (Stern *et al.*, 2016).

### **1.5. Fígado e suas funções metabólicas**

O fígado é o maior órgão sólido do corpo humano e representa aproximadamente de 2% a 5% do peso corporal de uma pessoa adulta. Sua anatomia clássica distingue dois lobos principais, direito e esquerdo e dois acessórios, quadrado e caudado, além da vesícula biliar, que é um compartimento para armazenamento da bile produzida pelo próprio órgão (Protzer *et al.*, 2012; Hoekstra *et al.*, 2013).

Metabolicamente o fígado é o órgão mais versátil de todo o corpo, alternando diariamente entre o estado anabólico (alimentado), estimulado pela insulina, e catabólico (jejum), estimulado pelo glucagon (Bonnet *et al.*, 2011; Rui, 2014). Em condições pós-prandiais quando há saciedade e aumento plasmático de insulina (caracteristicamente um estado anabólico), o fígado por sinalização dependente deste hormônio direciona os açúcares simples como a glicose para diversas vias (Boon *et al.*, 2008). Entre elas, destacam-se: (i) para a conversão a piruvato pela via glicolítica, (ii) para o armazenamento sob a forma de glicogênio (iii) para a síntese de ácidos graxos (AG) (pela ativação da lipogênese *de novo*) e (iv) para a síntese de colesterol (Boon *et al.*, 2008).

Já em condições de jejum (estado caracteristicamente catabólico), o fígado inicia a produção de glicose estimulada pelo aumento do glucagon e queda da insulina (Camacho *et al.*, 2006; Byrne *et al.*, 2009; Ameer *et al.*, 2014). O estoque hepático de glicose sob a forma de glicogênio gera uma fonte energética eficiente, mas não muito duradoura, sendo usada como primeira opção em situações de

queda da glicemia (Camacho *et al.*, 2006; Byrne *et al.*, 2009; Ameer *et al.*, 2014). Posteriormente, inicia-se a ativação da via gliconeogênica, que produz glicose a partir de precursores não carboidratos como o lactato, alguns aminoácidos, piruvato e glicerol (proveniente tanto da lipólise do tecido adiposo, músculo e o próprio fígado) (Muoio *et al.*, 1999).

A ação da insulina depende da integridade molecular e funcional de seu receptor (IR, *insulin receptor*) e de uma série de proteínas e moléculas de sinalização intracelulares, responsáveis pela transdução de seu sinal (Thaler e Schwartz, 2010). O receptor de insulina com atividade tirosina quinase intrínseca (IRTK) (Gondoin *et al.*, 2017), é rapidamente auto-fosforilado após a ligação ao hormônio, catalisando a fosforilação em tirosina de substratos intracelulares 1 e 2 do IR (IRS1 e IRS2). Estes, por sua vez, quando fosforilados, desenvolvem sítios de ligação para numerosas proteínas, dentre elas a PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), que por sua vez, ativa a proteína quinase B, também conhecida como Akt (PKB/Akt) (Gondoin *et al.*, 2017). Esta ativação induz a captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo por meio da translocação do GLUT-4 (*glucose transporter4*). Em condições fisiológicas o GLUT4 fica armazenado em vesículas intracelulares. Essa translocação ocorre por meio da fosforilação de uma série de proteínas adaptadoras como as CAP, CBL e CRKII (Chang *et al.*, 2004; S Sahajpal e K Jain, 2016; Fontenelle *et al.*, 2018).

Por outro lado, o glucagon atua por meio da interação com seu receptor acoplado a proteína G estimulatória (Gs/Gq) (Zhang *et al.*, 2018). Quando o glucagon sensibiliza seu receptor, a subunidade alfa da proteína G se separa da beta/gama e ativa a adenilatociclase, que por sua vez transforma moléculas de ATP em um importante segundo mensageiro conhecido como monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez irá fosforilar diversas proteínas e fatores de transcrição ativando ou inibindo os mesmos (Rui, 2014).

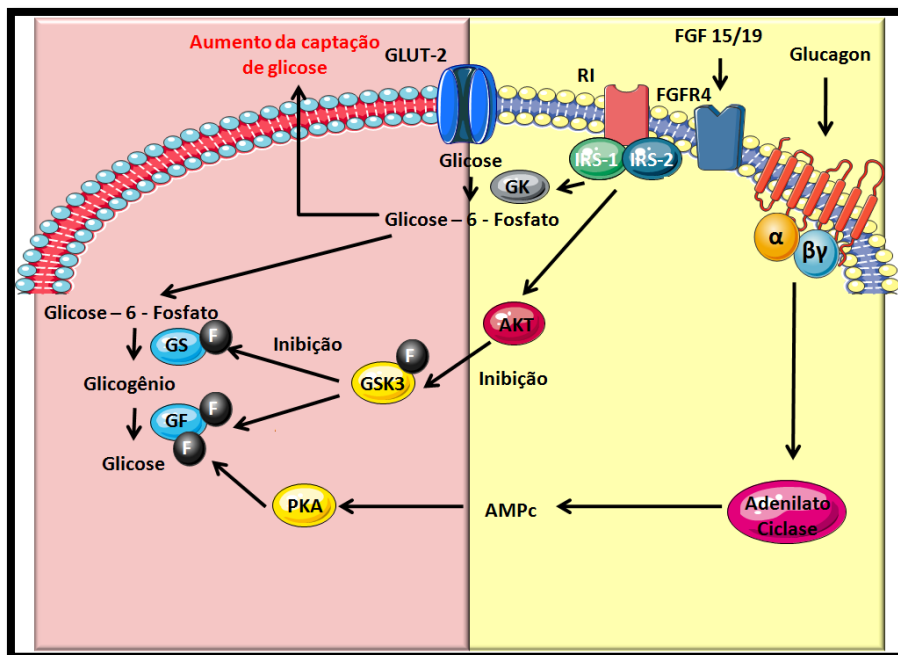
No fígado, a insulina não regula a captação de glicose, uma vez que, este órgão expressa transportadores constitutivos de membrana como o GLUT1 e também o GLUT2 que são ativados em resposta a um alto gradiente de concentração (Rui, 2014). A insulina no fígado regula as principais vias anabólicas como, por exemplo, a glicogênese e a lipogênese (Kawaguchi *et al.*, 2011), Enquanto que o glucagon estimula vias de degradação (glicogenólise, beta oxidação

e lipólise), além da síntese de glicose a partir de substratos não carboidratos (gliconeogênese) (Jerby *et al.*, 2010; Rui, 2014).

A glicogênese é estimulada pela sinalização da insulina aumentando a expressão da glicoquinase que converte a glicose captada pelo GLUT 2 formando glicose-6-fosfato. Esta conversão faz com que haja gradiente de concentração elevado a favor do ambiente extracelular aumentando assim a captação hepática de glicose. A glicose-6-fosfato é convertida a glicogênio pela ação da enzima glicogênio sintase (GS), enquanto que este é posteriormente degradado pela enzima glicogênio fosforilase (GF), gerando uma nova molécula de glicose (Rui, 2014).

Ambas as proteínas GS e GF são fosforiladas por outra enzima, a glicogênio sintase quinase (GSK), e esta fosforilação inibe a ação da GS e estimula a ação da GF. A insulina quando age sobre seu receptor induz a ativação da AKT/PKB e esta quinase fosforila a GSK inibindo-a (Irimia *et al.*, 2010; Couturier *et al.*, 2011). Sendo assim, a insulina tanto inibe a enzima que bloqueia a glicogênese, quanto a que estimula a glicogenólise. Por outro lado, em condições catabólicas, o glucagon é liberado e por meio da ativação da PKA induz a fosforilação apenas da GF, o que resulta no processo de degradação do glicogênio (Rui, 2014) (Figura 4).

**Figura 4:** Representação da via bioquímica da glicogênese (esquerda) e via de regulação (direita).



Adaptado de RUI, L. Energy metabolism in the liver. Comprehensive physiology, 2014. ISSN 0470650710.

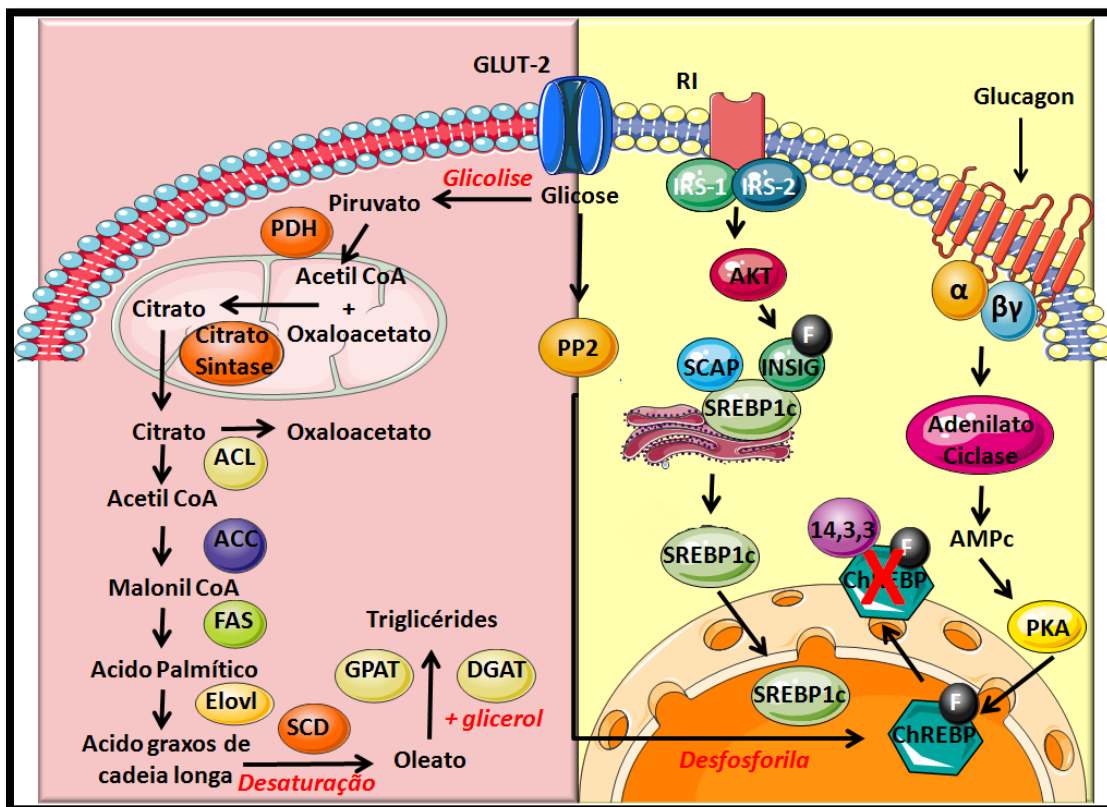
A lipogênese parte da formação de piruvato pela via glicolítica, que será então convertido a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH). O acetilCoA será então conjugado com o oxaloacetato para formar citrato pela ação da enzima citrato sintase dentro da mitocôndria. O citrato então é exportado para o citoplasma e reconvertido a acetilCoA pela acetil citratoliase (ACL), e em seguida carboxilado pela acetil-CoA carboxilase (ACC) formando malonil-CoA. O malonil-CoA servirá como substrato para a ação da ácido graxo sintase (FAS) que gerará ácido palmítico. Posteriormente, o ácido palmítico poderá ser alongado pela ELOVL, desaturado pela esteorildesaturase1 (SCD) e esterificado pela glicerol-3-fosfato acetiltransferase (GPAT) e/ou pela diacilglicerol transferase (DGAT) formando TG (Lambert *et al.*, 2014; Rui, 2014) (Figura 5).

A insulina é capaz de induzir avia lipogênica por meio da ativação da AKT/PKB, que fosforila a *insulin induced gene* (INSIG) que, em seguida libera o *Sterol regulatory element binding protein* (SREBP1c) (Shao e Espenshade, 2012). Neste ponto, o SREBP é liberado para migrar até o núcleo e induzir a transcrição das enzimas envolvidas na lipogênese (ACC, FAS, SCD, GPAT, entre outras) (Ferre e Foufelle, 2010; Pettinelli e Videla, 2011; Rui, 2014) (Figura 5).

A maior disponibilidade de glicose intracelular também pode induzir vias lipogênicas pela via das pentoses, resultando na ativação de *phosphatase protein 2* (PP2), que por sua vez, desfosforila a *Carbohydrate – responsive element binding protein* (ChREBP) e mantém este fator de transcrição ativo no núcleo (Eissing *et al.*, 2013; Rui, 2014) (Figura 5).

Em condições catabólicas o glucagon por meio da atividade quinase da PKA resulta na fosforilação do ChREBP, conseqüentemente este fator de transcrição sai do núcleo e se associa com a proteína 14-3-3 sendo então degradado pelo sistema proteossomal (Eissing *et al.*, 2013; Rui, 2014) (Figura 5).

**Figura 5:** Representação da via bioquímica da lipogênese (esquerda) e via de regulação (direita).



Adaptado de RUI, L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*, 2014. ISSN 0470650710.

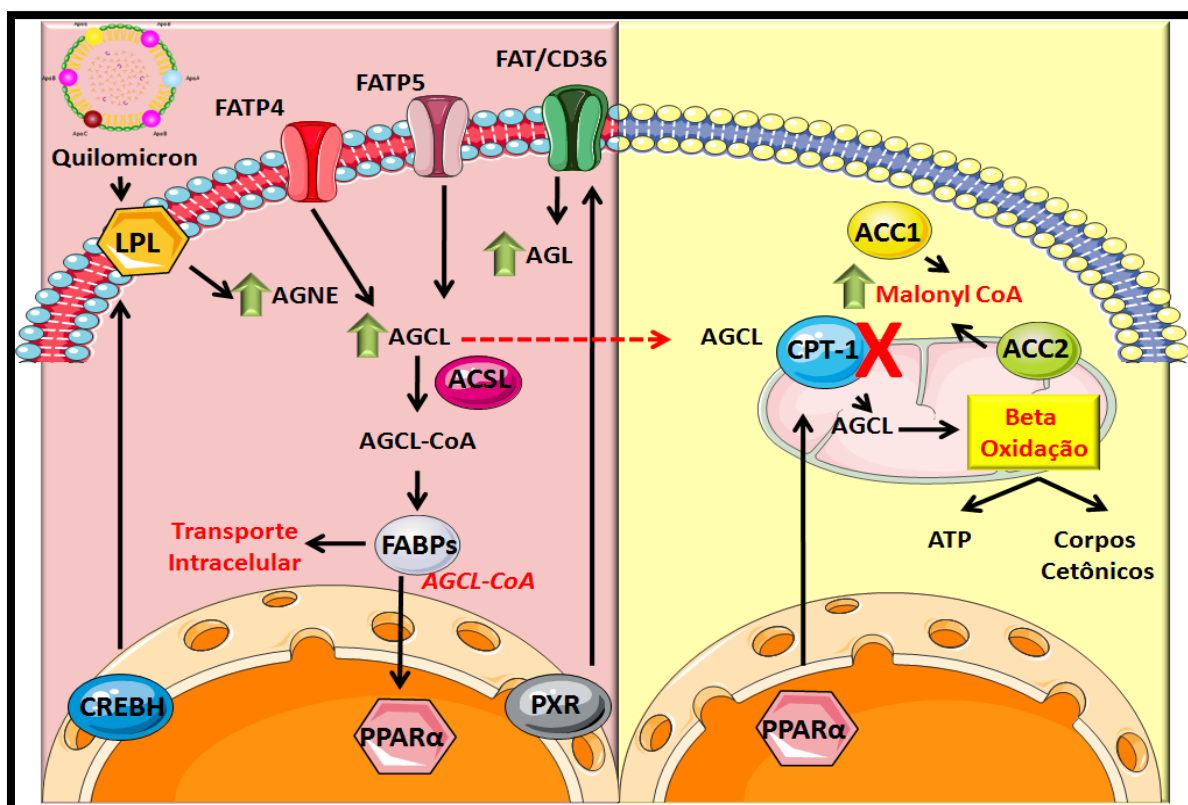
Em condições catabólicas, o glucagon, além de outros hormônios como, a adrenalina e a noradrenalina, podem aumentar as vias oxidativas hepáticas e também adiposas (Rui, 2014). A maior disponibilidade de AG na corrente sanguínea, resultado do estímulo da lipólise pelo glucagon (Lefebvre, 1983; Frühbeck *et al.*, 2014), provoca uma maior captação de gordura pelo fígado. Este mecanismo ocorre principalmente via proteínas membranares integrais como a lipoproteína lípase (LPL), as *Fatty acid transporter protein (FATP)* e os translocadores de ácidos graxos *fatty acid transporter CD36 (FAT/CD36)* (Hagenfeldt *et al.*, 1972; Park *et al.*, 2017).

Estas proteínas captadoras são transcritas pelo *Pregnance X Receptor (PXR)* e pelo *Endoplasmic Reticulum-Bound Transcription Factor (CREBH)*. A principal diferença entre estes transportadores é a seletividade por determinados ácidos graxos. Por exemplo, (1) a captação derivada de quilomícrons ocorre pela ação da LPL, que capta principalmente ácidos graxos livres (AGL) (Miquilena-Colina *et al.*, 2011; Rui, 2014), assim como o FAT/CD36 (Miquilena-Colina *et al.*, 2011; Rui,

2014); (2) enquanto que o FATP possui maior afinidade para ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (Figura 6).

É bem conhecido que a presença de AG no hepatócito serve como indutor da ativação de fatores de transcrição nucleares como o *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR $\alpha$ ) (Watt *et al.*, 2004; Pawlak *et al.*, 2015). A ativação deste fator de transcrição ocorre pela formação de AGCL-CoA pela ação da *Long-chain acylCoA synthetase* (ACSL) (Houten e Wanders, 2010; Rui, 2014). A ativação de PPAR- $\alpha$  serve como um elo entre a captação de AG aumentada e a ativação de vias oxidativas. O PPAR $\alpha$  é capaz de induzir a transcrição da CPT-1, uma proteína chave no processo de beta-oxidação gerando moléculas de adenosina-3-fosfato (ATP) e corpos cetônicos (Houten e Wanders, 2010; Rui, 2014). A principal forma de inibição desta via é a síntese de malonil-CoA que age como inibidor da CPT1 bloqueando a beta oxidação (Houten e Wanders, 2010; Rui, 2014) (Figura 6).

**Figura 6:** Representação da via bioquímica da captação de AG (esquerda) e beta oxidação hepática (direita).



Adaptado de RUI, L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*, 2014. ISSN 0470650710. Vide texto para detalhes das vias.



O processo de beta-oxidação, no entanto é um processo muito mais complexo. Ele ocorre principalmente na mitocôndria, utilizando como substrato principalmente ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico (Bargut *et al.*, 2014; Baruteau *et al.*, 2014). Este mecanismo ocorre fisiologicamente em períodos de jejum prolongado a fim de impedir a degradação de proteína e a perda de massa magra (Bargut *et al.*, 2014; Baruteau *et al.*, 2014) gerando energia sob a forma de corpos cetônicos (Lee *et al.*, 2016; Bjørndal *et al.*, 2018).

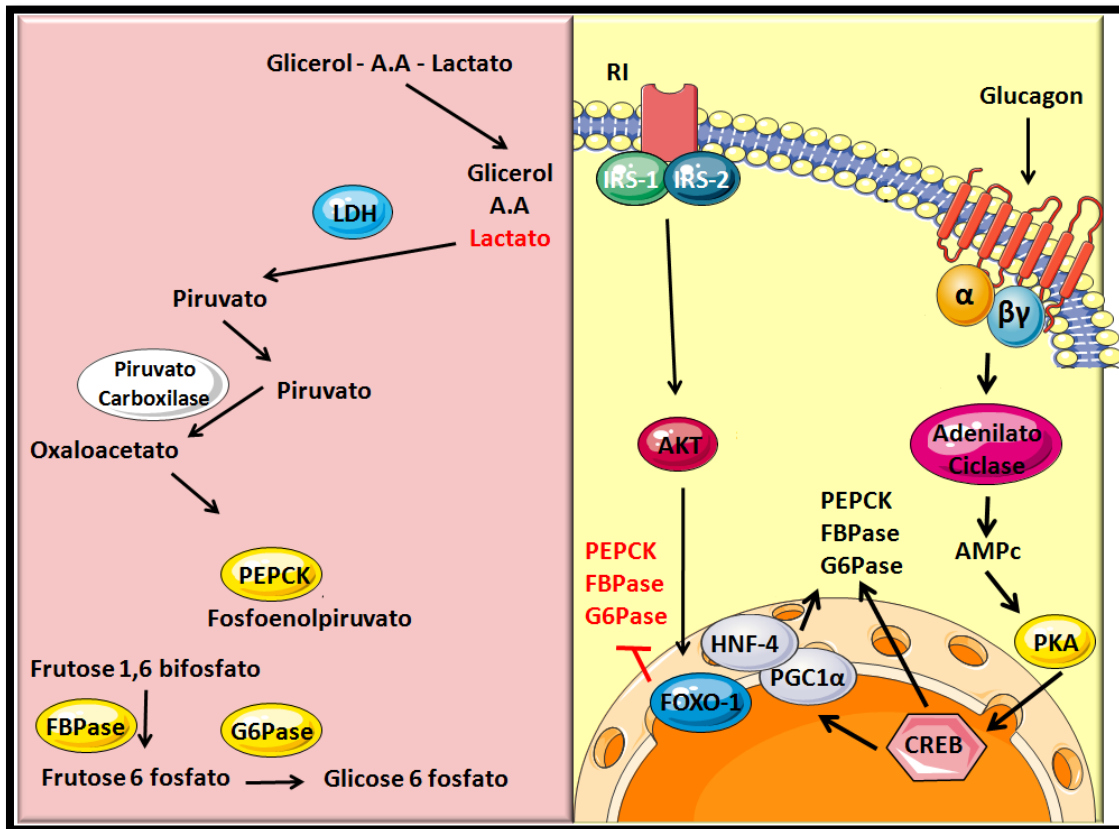
Além do aumento de vias de oxidação, o glucagon pode aumentar a síntese de glicose a partir de substratos não carboidratos (lactato, glicerol e determinados aminoácidos), processo conhecido como gliconeogênese (Rui, 2014). Um dos principais substratos é o lactato, produzido a partir do metabolismo anaeróbico (Derussi *et al.*, 2015).

O lactato é convertido a piruvato pela lactato desidrogenase (LDH), o piruvato dentro da mitocôndria será convertido a oxaloacetato, que quando exportado para o citoplasma, servirá de substrato para a fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) para a formação de fosfoenolpiruvato. Este por sua vez dará origem à frutose-1,6 bifosfato que sofrerá ação da frutose-bi-fosfatase (FBPase) gerando frutose-6-fosfato, que por fim será convertida em glicose-6-fosfato pela ação da glicose-6-fosfatase (G6Pase)(Figura 7) (Rui, 2014).

O principal estímulo para a gliconeogênese é a sinalização de glucagon responsável pela ativação da PKA, que fosforila o fator de transcrição CREB. Uma vez ativado, este fator de transcrição induzirá diretamente ou por meio da heterodimerização com o *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha* (PGC1 $\alpha$ ) a transcrição das enzimas gliconeogênicas (PEPCK, FBPase e G6Pase) (Li *et al.*, 2010; Rui, 2014) (Figura 7).

Em contrapartida a insulina bloqueia a síntese de glicose por induzir a ativação de PKB/AKT e assim a fosforilação da *Forkhead Box protein O1* (FOXO-1). Este fator de transcrição, quando fosforilado, é exportado do núcleo e deixa de estimular a gliconeogênese (Li *et al.*, 2010; Rui, 2014) (Figura 7).

**Figura 7:** Representação da via bioquímica da gliconeogênese (esquerda) e via de regulação (direita).



Adaptado de RUI, L. Energy metabolism in the liver. Comprehensive physiology, 2014. ISSN 0470650710.

Com base no que foi descrito até aqui podemos afirmar que o fígado é um órgão metabolicamente muito versátil, por sofrer ação de diversos hormônios e neurotransmissores. Adicionalmente, o metabolismo hepático pode ser alterado por diversas condições metabólicas, principalmente pela obesidade (Dietrich e Hellerbrand, 2014). O ganho de peso está relacionado com o desenvolvimento da resistência à insulina, alterações no perfil da expressão de PPARs (Gross *et al.*, 2017b; Motawi *et al.*, 2017) e também com a diminuição dos níveis de adiponectina (Jung e Choi, 2014). Ambos os fatores podem alterar o funcionamento das vias descritas acima.

### 1.6. Efeitos da obesidade e do PPAR no metabolismo hepático

Diversos modelos animais têm sido utilizados para se estudar a evolução de doenças hepáticas como a doença gordurosa hepática não alcoólica (NAFLD) e

esteohepatite não alcoólica (NASH), com diferentes métodos de indução de obesidade (dieta hiperlipídica, dietas hipercalóricas e dietas deficientes de colina), e a participação dos PPARs neste processo (London e George, 2007; Hebbard e George, 2011; Maher, 2016).

Animais obesos, induzidos com dieta deficiente de colina, tratados com agonistas de PPAR $\alpha$ , na sua maioria da classe dos fibratos, tem demonstrado efeitos sobre o desenvolvimento de esteohepatite, acompanhado por redução nos níveis de triglicerídeos, ALT e aumento nos níveis de adiponectina (Peters *et al.*, 2003; Liss e Finck, 2017). A aplicação de benzofibrato, um agonista de PPAR $\alpha$ , tem demonstrado capacidade de aumentar a expressão de genes envolvidos com a oxidação de AG hepáticos reduzindo assim o desenvolvimento da NAFLD e da NASH (Nakano *et al.*, 2008; Liss e Finck, 2017).

Há muitas variações entre estudos que avaliam a participação do PPAR $\alpha$  em modelos de animais e de humanos. Tais efeitos podem ser explicados pela diferença na expressão deste fator de transcrição entre as espécies, sendo que, os roedores apresentam uma expressão cerca de 10x maior que humanos (Shan *et al.*, 2008).

Pouco dos efeitos do PPAR $\delta$  sobre a obesidade é conhecido, no entanto, a falta deste fator de transcrição em hepatócitos favorece o desenvolvimento de fibrose hepática. A aplicação de agonistas farmacológicos do PPAR $\delta$  tem demonstrado efeitos como a melhora da sinalização da insulina em animais obesos (Tanaka *et al.*, 2003; Liss e Finck, 2017). Foi observado também que uma dieta deficiente em colina apresentou aumento nos níveis de triglicérides hepáticos acompanhado por um aumento nos níveis de ALT (Nagasawa *et al.*, 2006; Liss e Finck, 2017). A aplicação de GW501516 (agonista de PPAR $\delta$ ) resultou em uma redução nos níveis de triglicérides, devido a aumento na expressão de genes envolvidos na oxidação de AG (Nagasawa *et al.*, 2006; Liss e Finck, 2017). No entanto, a redução nos níveis de ALT não foi observada o que pode sugerir que a reversão da esteatose pode não acompanhar a recuperação do tecido (Liss e Finck, 2017).

A aplicação de GFT505, um agonista duplo de PPAR $\alpha$  e PPAR $\delta$ , em um modelo de obesidade genético tem demonstrado uma redução na esteohepatite e também uma redução no perfil inflamatório hepático demonstrando a interação entre os dois fatores de transcrição (Staels *et al.*, 2013).

Apesar do PPAR $\gamma$  não ser classicamente muito expresso no fígado tem sido mostrado que sua ativação pode contribuir para a diminuição do acúmulo ectópico de lipídios no fígado. A ativação de PPAR $\gamma$  diminui a lipólise hepática o que por sua vez reduz a oferta de AG na corrente sanguínea (Esposito *et al.*, 2006; Liss e Finck, 2017). Outros estudos utilizando agonistas bem descritos de PPAR $\gamma$ , como as glitazonas, têm demonstrado que o tratamento durante 48 semanas em indivíduos obesos tem demonstrado uma melhora na tolerância à glicose acompanhado da melhora histológica, diminuição dos níveis de marcadores de dano como a ALT e menor incidência de NASH (Neuschwander-Tetri *et al.*, 2003; Liss e Finck, 2017; De Mendonça *et al.*, 2019).

Outros estudos randomizados aplicaram a rosiglitazona em indivíduos obesos. Estes estudos foram nomeados como FLIRT e FLIRT2. O primeiro demonstrou o efeito do tratamento na esteatose hepática, no entanto, não foi observado o mesmo efeito em outros parâmetros histológicos como fibrose, balonamento e inflamação (Ali e Cusi, 2009). O segundo estudo aplicou o mesmo protocolo em um período de dois anos e os resultados se mantiveram iguais aos do primeiro (Ratziu *et al.*, 2010).

A obesidade é responsável por uma redução na expressão de todos os tipos de PPARs, tanto no tecido adiposo como no fígado. A redução da expressão do PPAR $\gamma$  diminui a capacidade plástica do tecido adiposo diminuindo assim a capacidade de estoque fisiológico de gordura. A diminuição da adipogênese é acompanhada da diminuição dos níveis de adiponectina e a redução da sua ação hepática. A diminuição desta sinalização provoca a redução da expressão de PPAR $\alpha$  e PPAR $\delta$ , ambos clássicos indutores de vias oxidativas hepáticas. Sendo assim podemos afirmar que a adiponectina atua na sinalização dos PPAR e assim nos mecanismos de controle da obesidade (Liss e Finck, 2017; Ishtiaq *et al.*, 2019).

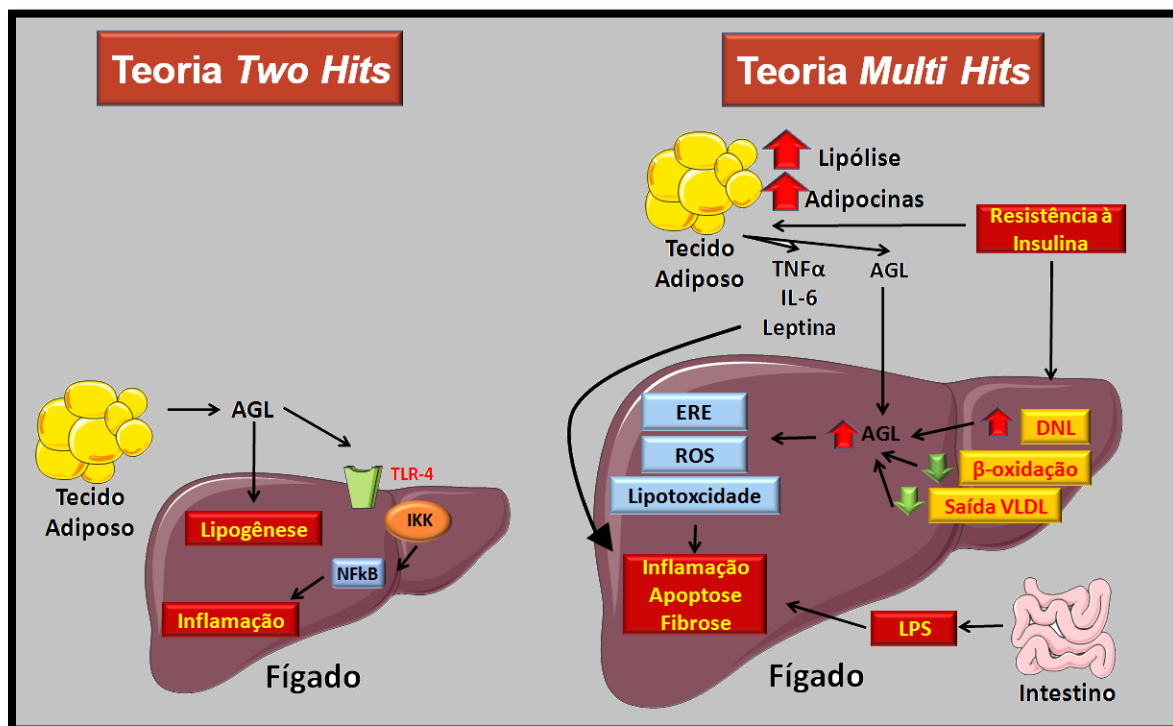
### **1.7. Efeitos da obesidade e da adiponectina no metabolismo hepático**

Com o desenvolvimento da obesidade, o fígado é um dos órgãos mais afetados, e apresenta um acúmulo importante de triglicerídeos (TG), na etapa inicial dessa doença que caracteriza a NAFLD (Polyzos *et al.*, 2010). O processo de lesão hepática como um todo se inicia com o surgimento da NAFLD e diante disto, muitos grupos de pesquisa direcionaram a atenção para o entendimento do processo de

evolução desta condição (Mcpherson *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2016; Umpleby *et al.*, 2016). Posteriormente foram elaboradas duas teorias que explicam o desenvolvimento da NAFLD, sendo que a primeira divide este processo em duas etapas enquanto a segunda, em múltiplas etapas (Byrne e Targher, 2015).

A primeira teoria proposta (duas etapas ou *two hits*) descreve o desenvolvimento da esteatose hepática a partir do aumento da disponibilidade de AGL em resposta a uma maior liberação destes compostos pelo TA. O excesso de lipídios sob a forma de AGL pode tanto ser direcionado para a lipogênese gerando TG, como também servir como indutores de vias inflamatórias (Figura 8) (Buzzetti *et al.*, 2016). No entanto, a teoria mais aceita e atual é a de múltiplas etapas ou *Multi Hits*, mais ampla e complexa, parte da resistência à insulina (RI) como evento principal, sendo este processo responsável por aumentar a lipólise e a produção de adipocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptina) pelo TA. Adicionalmente, a RI também induz vias lipogênicas hepáticas e inibe vias de oxidação (beta – oxidação) e de efluxo lipídico (secreção de VLDL). Os efeitos da RI no TA e também no fígado, resultam em um aumento nos níveis de AG no interior do hepatócito (Buzzetti *et al.*, 2016; Fotbolcu e Zorlu, 2016). O aumento do conteúdo lipídico hepático pode levar a indução do estresse de retículo endoplasmático (ERE), ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e indução de lipotoxicidade. Todos esses eventos juntamente com o aumento dos níveis circulantes de adipocinas e o aumento da absorção de LPS intestinal provocado pela disbiose intestinal, pode levar ao desenvolvimento de inflamação, vias apoptóticas e posteriormente acúmulo de fibrina (Buzzetti *et al.*, 2016; Fotbolcu e Zorlu, 2016; Leung *et al.*, 2016). Como já destacado a obesidade induzida tanto por dieta hipercalórica (Rocha *et al.*, 2016) quanto por hiperlipídica (Nakamura e Terauchi, 2013), além de ser capaz de induzir o quadro de RI levando ao desenvolvimento de NALFD (Anstee e Goldin, 2006), reduz os níveis de adiponectina.

**Figura 8:** Teorias do desenvolvimento da NAFLD hepática, teoria de *two hits* (esquerda) e *multi hits* (direita)



.Adaptado de: Takei, Y. and N. Sato (2006). "[Adipokine interrelationship with the liver]." *Nihon Rinsho* 64(6): 1083-1087.

Esta correlação entre RI e adiponectina é importante, uma vez que, a adiponectina possui diversos efeitos hepáticos que ocorrem por meio de sua interação com os receptores AdipoR1 e AdipoR2 presentes no fígado (Trujillo, M. E. e Scherer, P. E., 2006). A ativação destes receptores resulta em uma melhora na sensibilidade à insulina seja por aumento no perfil oxidativo hepático ou pela indução da expressão de APPL1 (*PH domain and leucine zipper 1*), uma proteína adaptadora que é estimulada a partir da ligação de adiponectina, e está envolvida com o aumento na sensibilidade à insulina (Hosch *et al.*, 2006).

Um dos efeitos mais importantes da adiponectina é sua capacidade de reduzir os níveis séricos de lipídios (Ayina *et al.*, 2016; Katsiki *et al.*, 2017; Yanai e Yoshida, 2019). Assim como demonstrado estudos que evidenciaram a correlação negativa da adiponectina com os níveis plasmáticos de triglicérides e a apolipoproteína B

(ApoB), o que sugere a capacidade desta adipocina em reduzir a liberação de VLDL hepática (Matsubara *et al.*, 2002; Zietz *et al.*, 2003).

Além da capacidade de reduzir o acúmulo de gordura hepática, a adiponectina também é capaz de atuar como antioxidante e anti-inflamatório. A atividade antioxidante ocorre principalmente devido a inibição da aldeído oxidase (AOX1), uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (Neumeier *et al.*, 2006). Ela também induz enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) via sensibilização do receptor AdipoR2 (Yamauchi, T. *et al.*, 2007). O efeito anti-inflamatório ocorre devido a capacidade da adiponectina em bloquear a via do NFκB, diminuindo assim a ocorrência de inflamação crônica de baixo grau (Buechler *et al.*, 2011).

Diante das ações biológicas da adiponectina destacadas até aqui, podemos afirmar que as alterações plasmáticas que ocorrem com a obesidade, como o aumento de TNFα (Hui *et al.*, 2004; Ozturk e Soylu, 2014) e de AGL podem estar relacionados aos menores níveis de adiponectina (Trujillo, Maria E e Scherer, Philipp E, 2006).

Para finalizar o que se associa hoje com a obesidade e os menores níveis circulantes de adiponectina, é: (i) o acúmulo de gordura no fígado resultado da maior quantidade de AGL (Fabbrini *et al.*, 2010), (ii) indução de estresse oxidativo (Savini *et al.*, 2013), (iii) indução de quadro de inflamação crônica sistêmica de baixo grau (Monteiro e Azevedo, 2010) e (iv) o desenvolvimento da RI (Hardy *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o tratamento com GT restaura os níveis de adiponectina (no modelo de obesidade por dieta hiperlipídica) juntamente com a inibição de PPARγ e indução de PPARα no fígado (Bolin *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020).

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho é que o GT atua como um redutor da esteatose por alterar o perfil metabólico do fígado para um perfil catabólico, de maneira dependente da adiponectina.

## 2.0. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar se a adiponectina medeia os efeitos do chá verde nas vias metabólicas e de sensibilidade à insulina no fígado de camundongos nocaute de adiponectina (AdipoKO) alimentados com dieta hiperlipídica.

### 2.2. Objetivos Específicos

#### 2.2.1. *In vivo*

- Caracterizar o modelo AdipoKO alimentado ou não com dieta hiperlipídica e os efeitos do tratamento com extrato de chá verde.
  - (i) Avaliar a composição corporal por meio da determinação do peso dos órgãos; índice de adiposidade e ganho de peso;
  - (ii) Avaliar o balanço energético pela ingestão alimentar semanal e gasto energético por calorimetria indireta;
  - (iii) Determinar a tolerância à glicose e à insulina (GTT e ITT), avaliar a glicemia de jejum e quantificar parâmetros bioquímicos lipídicos no soro (TG, colesterol total);
  - (iv) Caracterizar o perfil fenotípico do fígado de animais tratados com GT pela avaliação histológica com coloração de HE.
  - (v) Avaliar níveis plasmáticos de insulina no plasma.
  
- Investigar a participação da sinalização por AdipoR2 nos efeitos do GT
  - (i) Avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas na indução da beta-oxidação: *Cpt1*, *Ppara*, *Fgf-21* e *AdipoR2*.
  - (ii) Avaliar a expressão proteica da AMPK e do PPAR $\alpha$ .
  
- Avaliar a atuação do GT na via da gliconeogênese hepática e a participação da adiponectina neste cenário
  - (i) Avaliar a expressão gênica a *Pepck* (fosfoenol piruvato carboxiquinase), *FBPase* (frutose-1,6-bisfosfatase) e *G6Pase* (glicose-6-fosfatase).
  
- Avaliar os efeitos do GT e a participação da adiponectina na via lipolítica no fígado



- (i) Avaliar a expressão gênica de *Hsl* (*hormone-sensitive lipase*) e a *Mgl* (monoacilglicerol lipase).
- Avaliar os efeitos do GT e a importância da adiponectina na via lipogênica hepática assim como dos fatores de transcrição envolvidos neste processo
  - (i) Avaliação da esteatose hepática pela coloração de hematoxilina e eosina e oil red.
  - (ii) Quantificação dos níveis de TG e colesterol total no fígado.
  - (iii) Avaliar a expressão gênica de *Fas*, *Scd-1* e *Dgat*.
  - (iv) Avaliar a expressão gênica dos fatores de transcrição *Srebp1c*.
- Avaliar a participação da adiponectina no efeito do GT sob a via de síntese de colesterol hepático
  - (i) Avaliar a expressão gênica de *HMG CoA sintase*.
  - (ii) Avaliar a expressão gênica do fator de transcrição *Srebp-2*.
- Avaliar a participação da adiponectina no efeito do GT sob a via da glicogênese hepática
  - (i) Mensuração dos níveis hepáticos de glicogênio pela coloração de PAS
  - (ii) Avaliar a expressão gênica das enzimas glicoquinase, fosfoglicomutase, *Gsk-2* e *Glut-1*.
- Avaliar o efeito da GT sob a via de sinalização da insulina no fígado e o papel da adiponectina neste processo
  - (i) Avaliar a expressão gênica de receptor de insulina (*RI*).
  - (ii) Avaliar a expressão protéica da IR e AKT.

### 2.2.2. In vitro

- Investigar o papel de um mix de catequinas e de um meio condicionado de adipócitos e, portanto, rico em adiponectina, sobre a ativação do PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$  no desenvolvimento da esteatose induzida *in vitro* com ácido oléico (1,6 mM) e glicose (8mM) em células HepG2, utilizando os antagonistas do

PPAR $\gamma$  (GW9662) e PPAR $\alpha$  (GW6471) e os agonistas de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona) e PPAR $\alpha$  (Fenofibrato).

- Investigar os efeitos do cultivo de hepatócitos (HepG2) com o sobrenadante de adipócitos (3T3F442A) recém diferenciados (rico em adiponectina) e o mix de catequinas induzidos a esteatose para avaliar a expressão de enzimas chave na lipogênese e oxidação hepática.
- Avaliar a transativação de PPAR $\alpha$  pelas catequinas do chá verde.

## 3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Utilizamos nesse estudo camundongos C57Bl/6 machos selvagens (WT do inglês wild-type) e camundongos AdipoKO (B6;129-Adipoq<sup>tm1Chan</sup>/J, The Jackson laboratory) (Ma *et al.*, 2002). Os animais foram criados no Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade II (biotério de camundongos) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e após desmame e genotipagem, foram transferidos para o biotério de experimentação animal do laboratório de fisiologia celular, da Universidade Cruzeiro do Sul, onde foram mantidos durante o período do protocolo.

Os animais receberam alimentação e água *ad libitum* por um período total de 20 semanas (5 meses) e foram mantidos em sala com temperatura constante de 23 ± 2°C, sob ciclo de iluminação de 12/12 horas. Decorridas 8 semanas iniciais de indução de obesidade, os animais foram suplementados com extrato aquoso de GT por gavagem orogástrica durante 12 semanas. Após o período de experimentação total de 20 semanas, os animais foram eutanasiados entre 9:00 e 12:00 h, para a posterior realização dos experimentos. Para todos os parâmetros propostos, o número de camundongos por grupo variou de 5 a 10. O pedido de aprovação para uso de animais em pesquisa foi submetido para a Comissão de Ética para Experimentação em Animais do ICB-USP e aprovado sob o número CEUA/USP 76/2017 e CEUA/UNICSUL 029/2016.

### 3.2. Indução da obesidade

Os animais foram induzidos à obesidade através de uma dieta hiperlipídica (HFD), obtida da Prag Soluções Comércio e Serviços Ltda, por 20 semanas. A ração foi composta por 20,3% de proteína, 35,95% de carboidratos, 34,00% de lipídeos, qsp 100% de fibras, vitaminas e minerais. A dieta padrão foi composta de 22% de proteína, 43,50% de carboidratos, 4% de lipídeos e qsp 100% de fibras, vitaminas e minerais. A dieta hiperlipídica apresentou 531 kcal/100g enquanto a dieta padrão 288 kcal/100g.

### **3.3. Grupos experimentais, tratamento com extrato de CV in vivo, eutanásia e acondicionamento das amostras**

Os animais (n=5-10 por grupo) foram divididos em 6 grupos: (i) animais que receberam dieta padrão + (SD) + gavagem com água; (ii) HFD (HFD + gavagem com água); (iii) HFD + GT (HFD + gavagem com GT) (iv) animais AdipoKO alimentados com dieta padrão (SD) + gavagem com água; (v) HFD AdipoKO (HFD + gavagem com água) e (vi) AdipoKO HFD + GT (HFD + gavagem com GT). Administramos 500 mg/kg de extrato padronizado de GT adquirido comercialmente da empresa Tovani-Benzaquen, São Paulo, SP. Os animais foram suplementados de 2<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> feira com extrato aquoso de GT através de gavagem orogástrica. O GT utilizado neste estudo possui um conteúdo total de polifenóis em torno de 39% (392 µg/mg de extrato de CV). Análises de HPLC demonstraram que dentre os polifenóis presentes no CV o conteúdo de catequinas representa em torno de 30% (117 µg/mg). Essa análise também mostrou que a soma de EGC e EGCG contribuem com mais de 85% das catequinas totais do extrato. O conteúdo de cafeína é de 0,4% e o de quercetina está em torno de 1,5% do peso seco (Rocha et al., 2016). O extrato foi pesado diariamente de acordo com os pesos corporais dos animais, e então solubilizado em água a 70°C para posterior administração orogástrica.

O período total de suplementação com extrato de GT foi de 12 semanas. Neste período os animais foram suplementados com extrato de GT todas as tardes antecedendo o período de alimentação (por volta das 17:00h). Durante todo o período de suplementação, os camundongos foram pesados semanalmente para avaliação do ganho de peso. Além da pesagem semanal, avaliamos a ingestão diária de ração pelos animais. Decorridas as 20 semanas de suplementação os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue dos animais no momento da eutanásia foi coletado em tubos contendo anticoagulante e posteriormente centrifugado para obtenção do plasma. O plasma foi acondicionado em freezer -80°C até o momento das análises. O fígado foi removido e imediatamente acondicionado em freezer -80° C para posterior determinação dos objetivos propostas no projeto. O tecido adiposo visceral (epididimal), o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo marrom foram removidos dos animais e imediatamente pesados para determinação do índice de adiposidade.

### **3.4. Avaliação da taxa metabólica basal (calorimetria)**

A taxa metabólica basal dos camundongos foi avaliada após 18 semanas de experimentação por calorimetria indireta de circuito aberto (modelo OxyMax, Columbus Instruments, Ohio, EUA). Os animais foram transportados até o laboratório de experimentação, aclimatados por 24 h em gaiolas individuais sob as mesmas condições empregadas no período de experimentação que perdurou por mais de 24 h. Estas condições foram ciclo claro/escuro (12/12 h cada), com ração e água, recebendo diariamente (durante os cinco dias que os animais permaneceram no laboratório de experimentação) o tratamento com o GT. Os camundongos foram submetidos à monitoração não invasiva de trocas gasosas e de atividade física. Foram determinadas as taxas de consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) e a produção de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) a partir de sensores gasométricos, com estes dados foi definido e a taxa de troca respiratória (RER - relação de troca respiratória) e a produção de calor (Heat). Os resultados foram calculados através do software Oxymax.

### **3.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos**

O plasma coletado conforme mencionado anteriormente foi aliquoteado e estocado em microtubos do tipo eppendorf a -80°C para posterior determinação de colesterol total e triglicerídeos totais (Kits Bioclin) além de leptina, adiponectina, insulina, por Miliplex MAP utilizando beads magnéticos com painel para múltiplos analitos (Mouse Cytokine/ChemokinePanel) baseados na tecnologia MAGPIX xMAP conforme instruções do fabricante.

### **3.6. Teste de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT)**

Uma semana antes da eutanásia dos animais realizamos o ensaio de i.p.GTT nos animais submetidos a um jejum de 8h pela de mensuração de glicose após a administração intraperitoneal de glicose (1g glicose/Kg do peso corpóreo em solução a 20% em salina 0,9%). O teste de i.p. ITT foi realizado em animais com 6h de jejum pela mensuração de glicose após administração de insulina (Humulin R, Lilly, 0,5 UI/kg de peso corpóreo). Os testes foram realizados em diferentes dias da mesma semana e as amostras de sangue coletadas através de uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal antes da aplicação de glicose ou insulina (tempo 0) e a 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a aplicação. A glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225/Bioeasy Diagnóstica Ltda/MG - Brasil). Calculamos a área total sob a curva (AUC) da concentração plasmática de

glicose entre os grupos para o GTT e a constante de decaimento de glicose durante o ITT ( $K_{ITT}$ ).

### **3.7. Avaliação histológica do tecido hepático**

Imediatamente após a eutanásia dos animais foi realizado uma laparotomia mediana para extração do tecido hepático. Os diferentes tecidos foram pesados em uma balança analítica. Após a pesagem dos tecidos os mesmos foram fixados em paraformaldeído a 4%. As amostras fixadas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, limpas em xileno e emblocadas em parafina. As amostras foram, então, seccionadas e os cortes histológicos (5  $\mu$ m) foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A avaliação do score de esteatose foi realizada pelo doutor Bruno Cogliati às cegas, segundo Liang (Liang *et al.*, 2014).

### **3.8. Coloração do fígado para quantificação de glicogênio através do método de PAS**

Foi realizada a secção do tecido hepático (aproximadamente 50mg). Posteriormente o tecido foi embebido em formol 10%, para fixação, por um período de 24 horas, seguidos com a incubação com álcool 95%. Em seguida o tecido foi cortado em blocos de parafina. O tecido foi em seguida desparafinado e hidratado com água, oxidado com ácido periódico 0.5% por 5 minutos, incubado com reagente de Schiff por 15 minutos e em seguida lavado por mais 5 minutos (Sutcliffe e Poole, 1978; Liquori *et al.*, 2009). Este protocolo foi realizado pelo prof. Dr. Bruno Cogliati.

### **3.9. Coloração do fígado para quantificação de lipídios através do método de Oil Red O**

Foi realizada a secção do tecido hepático (aproximadamente 50mg) imediatamente congelado em gelo seco, sendo em seguida cortado em criostato. O tecido foi lavado com isopropanol 60% e incubado por 15 min com a solução de trabalho de Oil Red O. Em seguida foi realizada nova lavagem com isopropanol 60% e marcação do núcleo com hematoxilina 5. Por fim seguiu-se com uma nova lavagem com água e análise dos resultados (Davison e Cohle, 1987). Este protocolo foi realizado pelo prof. Dr. Bruno Cogliati

### **3.10. Quantificação hepática de TG e Colesterol Total**

O tecido foi homogeneizado com álcool isopropílico durante 2 minutos, seguidos de centrifugação a 1400rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e em seguida utilizado para a quantificação de TG e colesterol total por método enzimático colorimétrico. Para as análises foi utilizado kits da Bioclin.

### **3.11. Extração de RNA total das células e ou tecidos**

#### **3.11.1. Extração de RNA total**

O RNA total das células ou dos tecidos foi obtido utilizando-se TRIzol Reagente, uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, seguindo-se o procedimento proposto pelo fabricante. Inicialmente foi adicionado 1mL de reagente de TRIzol a  $1 \times 10^7$  células ou 50 mg de tecido. Os homogenatos foram incubados por 5 min a 15-30° C para permitir completa dissociação de complexos núcleo proteicos. 0,5 mL de clorofórmio foi adicionado sob agitação vigorosa por 15 segundos, seguido de incubação a 15-30°C por 2-3 min. A centrifugação a 12.000  $\times$ g, por 15 min e a 2-8°C favorece a separação de três fases. A fase aquosa inferior contendo o RNA foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 0,5mL de isopropanol. O material foi incubado por 10 min. a 15-30°C e centrifugado a 12.000  $\times$ g por 10 min, a 2-8°C. O sedimento foi lavado pela adição de etanol a 75%, seguido de centrifugação a 7.000 $\times$ g, por 5 min, 2-8°C. O precipitado foi seco ao ar e dissolvido em água DEPC. Após a extração do RNA, utilizamos 1ul de amostra para a quantificação do RNA total (Nanodrop, ThermoScientific). Após quantificação foi avaliado a integridade da amostra através do método de eletroforese em gel de agarose a 2%.

#### **3.11.2. Reação de RT (transcrição reversa)**

As amostras de RNA (2 $\mu$ g) obtidas dos animais ou células em cultura ou dos tecidos foram transcritas para cDNA em um termociclador (Veriti, Life Technologies) à 72 °C utilizando “random primers” (5  $\mu$ M), trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTP, 2.5 mM) e a enzima transcriptase reversa (SuperScript II RNase H – reverse transcriptase). Anteriormente à RT, procedemos a inativação de eventuais moléculas de DNA presentes nas amostras, utilizando-se DNase (5U/mg).

### 3.11.3. PCR quantitativo para análise da expressão gênica

O cDNA foi utilizado para a análise da expressão dos genes descritos na Tabela 1. Os primers utilizados na reação de PCR foram desenhados (Tabela 1) e adquiridos da Sigma. A amostra de DNA complementar foi diluída 20 vezes para a reação de qPCR utilizando Eva Green® e AriaMx 96 Real Time PCR System seguindo as indicações do fabricante.

Para o cálculo dos resultados referente à expressão gênica, utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador a expressão do gene endógeno 18s (Livak e Schmittgen, 2001).

**Tabela 1:** Sequência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR

Símbolo oficial	Gene	Sequência Foward	Sequência Reverse
<b>Genes de Camundongo</b>			
<b>Prkacb</b>	Proteína quinase cAMP-ativada, subunidade catalítica beta	GGAGATCATCTCAGCAAGG	GCAGAAGGTCTTGAGATCG
<b>Srebp1</b>	Fator de transcrição 1 do elemento regulatório de esterol	GGAGGCAGAGAGCAGAGATG	CACAGGTTCCCATAGACAAA
<b>Insr</b>	Receptor de Insulina	GAATGTGACAGCCACAC	CTGGGGAATCTTGATTGCAT
<b>Hmgcs1</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1	CCTAAGAGACCCAGGGAAG	CGGCAGACTCTTGTGAGGAT
<b>Lipe (HSL)</b>	Lipase hormônio sensível	AGGATACCGTAGTTTGGTGC	TCCAGAAGTGCACATCCAGGT
<b>Gsk3b</b>	Glicogênio sintase quinase 3 beta	TTCTTTGGAATCTGCCATC	GGTGCCCTGTATACCGAGA
<b>PPARY</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gama	ACCCTTGCATCCTTACAAG	TCAGCTCTGTGGACCTCTCC
<b>Rn18s</b>	RNA ribossomal 18S	CGCTCCACCAACTAAGAACG	CTCAACACGGGAAACCTCAC
<b>Fbp</b>	Fructose 1,6-bisphosphatase	GGCCAACATTCATTCGGTCTC	GCTATCCCAAGGGAGAGTCC
<b>Ppard</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	CGAGTTCTTGCGAAGTCTCC	TGTCCTGGATGGCTTCTACC
<b>Pck1 (Pepck)</b>	Fosfoend piruvato carboxiquinase 1, citosólica	TGTGGGCGATGACATTGC	TGGCATTGGATTTGTCTTCAC
<b>Fasn (Fas)</b>	Ácido graxo sintase	GAGGACACTCAAGTGGCTGA	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT
<b>Ppara</b>	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomo	TGCTGCTGTTTCTGTTTTT	TCTTGCAGCTTCGATCACAC
<b>Cpt1a</b>	Carnitina palmitoil transferase 1a, fígado	CTCCATGACTCGGCTCTTC	AGCTTGAACCTCTGCTCTGC
<b>Foxo1</b>	<i>Forkhead box O1</i>	CGCAGATTTACGAGTGGATGG	CACTCTTGCCTCCCTCTGG
<b>Adipor2</b>	Receptor de adiponectina 2	TATAAGCGGCTTCTCCAGGTC	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG
<b>Pgm</b>	Fosfoglicomutase	GAGTGCAGTGTCTTCACCA	CAGTTCACCTGCTCAGACA



<b>Gck</b>	Glicoquinase	AACAAGAATGGTGGGCAGTC	TTTGCAAAGTTGGGTCTCC
<b>G6pc (G6Pase)</b>	Glicose-6-fosfato, catalítica	GATAAAGCAGTTCCCGGTCA	GCAGACATTCAGTTGCACGA
<b>Glut1</b>	translocador de glicose 1	GCTTCCTGCTCATCAATCGTAA	CATCGGCTGTCCCTCGAA
<b>Fgf21</b>	Fator de crescimento de fibroblasto 21	CTGCTGGGGTCTACCAAG	CTGCGCCTACCACTGTTCC
<b>Slc2a1 (Glut-1)</b>	Carregador de soluto família 2 (Transportador facilitado de glicose), membro 1	TGATTCTGCTGCCCTTCTGT	GGACATTGGACGCTCTCTCT
<b>Scd-1</b>	Estearoil desaturase 1	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
<b>Dgat1</b>	diacilglicerol transferase	AAAGCTGTGTCTGCAGGAA	TGAAAGAAAGCTGACGCCCA
<b>Hmgcs1 (HMGCoAs)</b>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	CTCCTCTCCACAAAGCTTGC	CTGGTACTCCTTCCCATCCA
<b>Ucp-2</b>	Uncoupling protein 2	GGTCGGAGATACCAGAGCAC	TGTCATGAGGTTGGCTTTCA
<b>Srbf2</b>	Fator de transcrição 2 do elemento regulatório de esteroide	CTCCTCCTGTGGCTGGTAAA	AGCTGCGAAATCACCTTTGG
<b>Cd36 (Fat/CD36)</b>	Fatty acid transporter CD36	TGGAGCTGTTATTGGTGCAG	TGGGTTTTGCACATCAAAGA
<b>Chrebp</b>	Carbohydrate-responsive element binding protein	AGATGGAGAACCGACGTATCA	ACTGAGCGTGCTGACAAGTC
<b>Genes Humanos</b>			
<b>FASN (FAS)</b>	Ácido graxo sintase	TGGGAGAACTTGCAGGAGTT	CGAAGAAGGAGGCATCAAAC
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor alfa	GTGTGGAAGCAGTTGGTGAA	GGTAACCTGGTCTTGAGGA
<b>CPT1a</b>	Carnitina palmitoil transferase 1 <sup>a</sup>	AACCCAGAGTACGTGTCCAG	TTTCAGGTGCTTCCAAAGC
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gama	CTCCGTGGATCTCTCCGTAA	GATGCAGGCCCACTTTGAT

Nota: Em parêntesis símbolo mais conhecido

### 3.12. Avaliação da expressão proteica pelo método de *western blotting*

Foi separado aproximadamente 50mg de tecido hepático previamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o mesmo foi embebido em tampão RIPA com adição de inibidores de proteases (1:1). Foi realizado processamento do tecido hepático com auxílio de homogeneizador ultrassônico em três pulsos de 10 segundos em baixas temperaturas (cerca de  $8^{\circ}\text{C}$ ). As amostras foram posteriormente centrifugadas e o sobrenadante retirado e posteriormente usado para a quantificação de proteínas segundo o método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram misturadas em tampão Laemli com beta-mercaptoetanol a 5% carregadas em um gel de poliacrilamida de 5-15% dependendo do tamanho da proteína seguido pelo processo de eletroforese por aproximadamente 2h. A seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas com vermelho de Ponceau para avaliar eficiência da transferência e como controle de carregamento. As membranas

foram bloqueadas em leite 5% e incubada com anticorpos primários para cada proteína (Tabela2).

**Tabela 2:** Descrição dos anticorpos utilizados para a realização dos ensaios de expressão proteica.

Anticorpo	Diluição	Catalogo	Empresa
IR	1:1000	sc-711	Santa Cruz Biotechnology
AKT	1:1000	9272	Cellsignaling
AMPK	1:1000	sc-74461	Santa Cruz Biotechnology
p-AMPK	1:1000	sc-33524	Santa Cruz Biotechnology
PPAR $\alpha$	1:1000	sc-398394	Santa Cruz Biotechnology
PPAR $\gamma$	1:1000	Sc-7273	Santa Cruz Biotechnology
ACC	1:1000	sc-271965	Santa Cruz Biotechnology
p-ACC	1:1000	sc-137104	Santa Cruz Biotechnology
SREBP-1c	1:1000	sc-365513	Santa Cruz Biotechnology
SREBP-2	1:1000	sc-271615	Santa Cruz Biotechnology
FAS	1:1000	sc-55580	Santa Cruz Biotechnology

Após incubação com o anticorpo secundário (coelho, diluição 1:10.000) marcado com peroxidase, as membranas foram reveladas com o kit ECL e o sinal quimioluminescente capturado em fotodocumentador AmershamMager 680 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Swenden). Posteriormente utilizamos o software UN SCAN IT gel 6.1 para quantificação da intensidade das bandas e normalizamos os resultados com a membrana corada com Ponceau.

### 3.13. Indução de esteatose *in vitro*

Com o intuito de elucidar o mecanismo pelo qual as catequinas do GT atuam sobre a esteatose hepática, nós transpusemos a condição de obesidade *in vivo* para uma condição *in vitro*. Para isto utilizamos hepatócitos da linhagem HepG2, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Bruno Cogliati, que foram utilizadas para avaliação *in vitro* dos efeitos das catequinas. A esteatose *in vitro* foi induzida pela adição de ácido oléico na concentração final de 1,6mM e glicose 8mM por 24h (Ding, J. *et al.*, 2015).

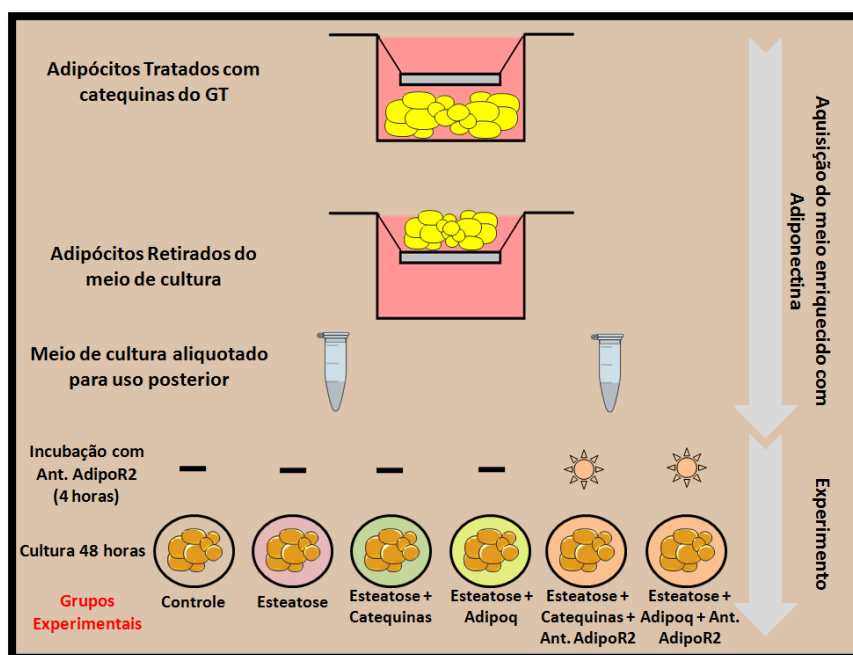
### 3.14. Tratamentos *in vitro*

Para os tratamentos *in vitro*, as células HepG2 foram tratadas com o mix de catequinas preparado com as principais catequinas encontrada no GT (Chen *et al.*, 2008). Para a preparação da mistura com as quatro principais catequinas do GT utilizamos a epigalocatequina-galato (EGCG) (100nM), epigalocatequina (EGC) (50nM), epicatequinagalato (ECG) (30nM) e epicatequina (EC) (20nM) (SigmaAldrich) totalizando 200nM. A mistura de catequinas foi adicionada juntamente com o ácido oléico (1,6mM) e glicose (8mM) a fim de observar se o tratamento seria capaz de prevenir a indução de esteatose.

Para avaliar a participação de PPAR no efeito das catequinas, as células foram pré-tratadas com antagonista de PPAR $\gamma$  (GW9662) – 5 $\mu$ M ou PPAR $\alpha$  (GW6471) 5 $\mu$ M por 4 horas e a seguir tratadas com as catequinas do GT.

Avaliamos os possíveis efeitos preventivo, agudo e/ou terapêutico do tratamento da adiponectina e do mix de catequinas na regulação das vias metabólicas hepáticas após indução de esteatose. O design experimental (Figura 9) foi realizado com a cultura de células HepG2 expostas ao meio DMEM na presença ou não de ácidos graxos e glicose (grupo controle e esteatose, respectivamente). Em seguida as células tratadas com o mix de catequinas ou com o sobrenadante proveniente das células adiposas 3T3F442A, previamente tratadas com o mix de catequinas (Adipoq). Para testar se o efeito das catequinas é via AdipoR2, adicionalmente dois grupos foram feitos em que as células receberam pré-incubação durante 4 h com o anticorpo para AdipoR2 (Ant. AdipoR2). O período de cultura das células foi de 48 h realizado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 9:** Design experimental do ensaio *in vitro* com o meio enriquecido com adiponectina.



### 3.15. Coloração *Oil Red O* e mensuração do conteúdo de triglicérides

Para a realização da coloração com *Oil Red O*, inicialmente foi preparado uma solução estoque (0,2g de *Oil Red O* em 40mL de isopropanol). A partir desta solução foi preparada uma solução de trabalho diluindo-se, com água destilada, a solução estoque em uma proporção de 2:3; esta solução de trabalho foi preparada imediatamente anterior ao uso e a sobra descartada. Após as células alcançarem 100% de confluência, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e em seguida fixadas com uma solução de formaldeído a 4% por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida a formalina foi removida e a solução de trabalho foi adicionada às células por 30 min à temperatura ambiente. Por fim as células foram lavadas com água destilada por 5 vezes (Kraus *et al.*, 2016).

Para a determinação do conteúdo de triglicérides e colesterol, os hepatócitos foram lavados uma vez com PBS, lisados com tampão de lise NP40 (10% de NP40 diluído em água deionizada), centrifugados e o sobrenadante foi congelado. Para a reação foi adicionado 200  $\mu$ L do TG reagente (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) a 2 $\mu$ L de sobrenadante. A absorbância a 505 nm foi medida após 30 min de incubação a 37°C. Os níveis de TG foram normalizados pela concentração de proteína da amostra, de acordo com Bradford (Bradford, 1976).

### 3.16. Transativação do PPAR pelas catequinas do GT

O ensaio de transativação celular foi realizado de acordo com o protocolo descrito em (Ribeiro Filho *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). Este protocolo foi realizado pela profa Dra. Ana Carolina Migliorini.

Resumidamente, as células 293T (ATCC® CRL-3216™) foram cultivadas em placas de 24 poços (densidade de  $1,0 \times 10^5$  células / poço) e transfectadas transitoriamente com Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) e 0,4 µg dos seguintes plasmídeos: pRL-TK, um controle de transfecção; pGRE-LUC, que contém elemento responsivo à proteína GAL4, seguido pelo gene repórter da luciferase; pBIND-PPAR $\beta$ , pBIND-PPAR $\gamma$  ou pBIND-PPAR $\alpha$ , proteínas quiméricas compostas por GAL4-DBD e PPAR-LBD, sob controle do promotor de citomegalovírus (CMV), na proporção de 1,5 µg de DNA: 2 µL de lipofectamina.

O plasmídeo pcDNA vazio foi usado em vez de pBIND-PPAR $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$  como controle negativo. Quatro horas após a transfecção, 1 µM de GW0742, Rosiglitazona, Bezafibrato ou 1% de DMSO foi adicionado a cada poço. Foi adicionado em seguida as catequinas EGCG nas concentrações 0,37 - 0,75 - 1,5 - 3 - 6 - 12 - 24 - 48µM, EGC 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32Mm, ECG 0,05 - 0,1 - 0,19 - 0,38 - 0,77 - 1,53 - 3,07 - 6,13µM, EC nas concentrações 0,25 - 0,5 - 1,06 - 2,12 - 4,25 - 8,5 - 17 - 34Mm e Mix 11,1 - 22,3 - 44,5 - 89 - 178 - 355 - 710 - 1420µM. Após 24 horas de tratamento, a expressão do gene repórter foi medida com o Sistema de Ensaio Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) (Promega), de acordo com as instruções do fabricante em um Sistema de Detecção GloMax-Multi + (Promega)

### 3.17. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA One-way com Tukey como pós-teste ou através de Teste T não-pareado. Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para verificar a normalidade e variância dos dados, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4.0. RESULTADOS

### 4.1. A falta de adiponectina prejudica o efeito antiobesidade do GT pela inibição da indução do gasto energético

Avaliamos o efeito do GT sobre o ganho de peso corporal e dos depósitos adiposos, assim como no índice de adiposidade. O tratamento com GT na condição Wild-Type reduziu o ganho de peso, o que não foi observado na condição AdipoKO (**Tabela 3**). O efeito sobre os depósitos adiposos foi ao encontro do observado no ganho peso dos animais. O tratamento com GT na condição Wild-Type preveniu o aumento do peso dos depósitos adiposos epididimal, subcutâneo e marrom, o que não foi observado na condição AdipoKO (**Tabela 3**). Em adição, o índice de adiposidade também foi reduzido pelo GT na condição Wild-Type, porém não na condição AdipoKO (**Tabela 3**).

Avaliamos as transaminases hepáticas, assim como o peso do fígado como forma de caracterização inicial da função hepática. Nós observamos que o tratamento com o GT na condição Wild-Type não alterou a quantidade plasmática de ALT, e reduziu a quantidade de AST. Já na condição AdipoKO houve um aumento na quantidade de ambas as enzimas ALT e AST no grupo tratado como GT indicando que a obesidade na ausência da adiponectina pode ser desencadear uma hepatotoxicidade, e o GT não é capaz de reverter tal processo (**Tabela 3**). Nós avaliamos também o peso do fígado e não observamos qualquer alteração nos grupos experimentais em ambos os genótipos (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Caracterização do modelo experimental em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat HFD e tratados com chá verde (GT).

	Wild-Type			AdipoKO		
	SD	HFD	HFD+GT	SD	HFD	HFD+GT
<b>Weight gain (g)</b>	4,12 ± 0,73	12,72 ± 1,31 (a)	5,31 ± 0,42 (b)	5,18 ± 0,45	12,65 ± 1,7 (a)	9,10 ± 1,30 (c)
<b>eWAT (g)</b>	0,21 ± 0,02	1,80 ± 0,12 (a)	0,63 ± 0,05 (b)	0,38 ± 0,03	1,51 ± 0,19 (a)	1,42 ± 0,19 (c)
<b>scWAT (g)</b>	0,20 ± 0,01	1,22 ± 0,15 (a)	0,38 ± 0,02 (b)	0,29 ± 0,03	1,32 ± 0,24 (a)	0,93 ± 0,13 (c)
<b>BAT (g)</b>	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,01 (a)	0,07 ± 0,01 (b)	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,02 (a)	0,13 ± 0,01 (c)
<b>Adiposity Index (g)</b>	0,56 ± 0,09	3,15 ± 0,97 (a)	1,07 ± 0,22 (b)	0,73 ± 0,17	2,65 ± 0,93 (a)	2,47 ± 0,56 (c)
<b>AST</b>	38,87 ± 7,54	83,52 ± 7,57	33,17 ± 6,25	28,47 ± 3,90	129,59 ± 16,60 (a)	226,16 ± 23,96 (c)
<b>ALT</b>	53,85 ± 10,55	117,88 ± 24,72	160,16 ± 27,99	125,65 ± 21,55	214,44 ± 25,29 (a)	488,29 ± 42,77 (c)
<b>Liver weight (g)</b>	1,29 ± 0,03	1,22 ± 0,06	1,00 ± 0,06	0,98 ± 0,04	1,38 ± 0,17	1,22 ± 0,12

Nota: Os resultados representam um n = 5-6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type, (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

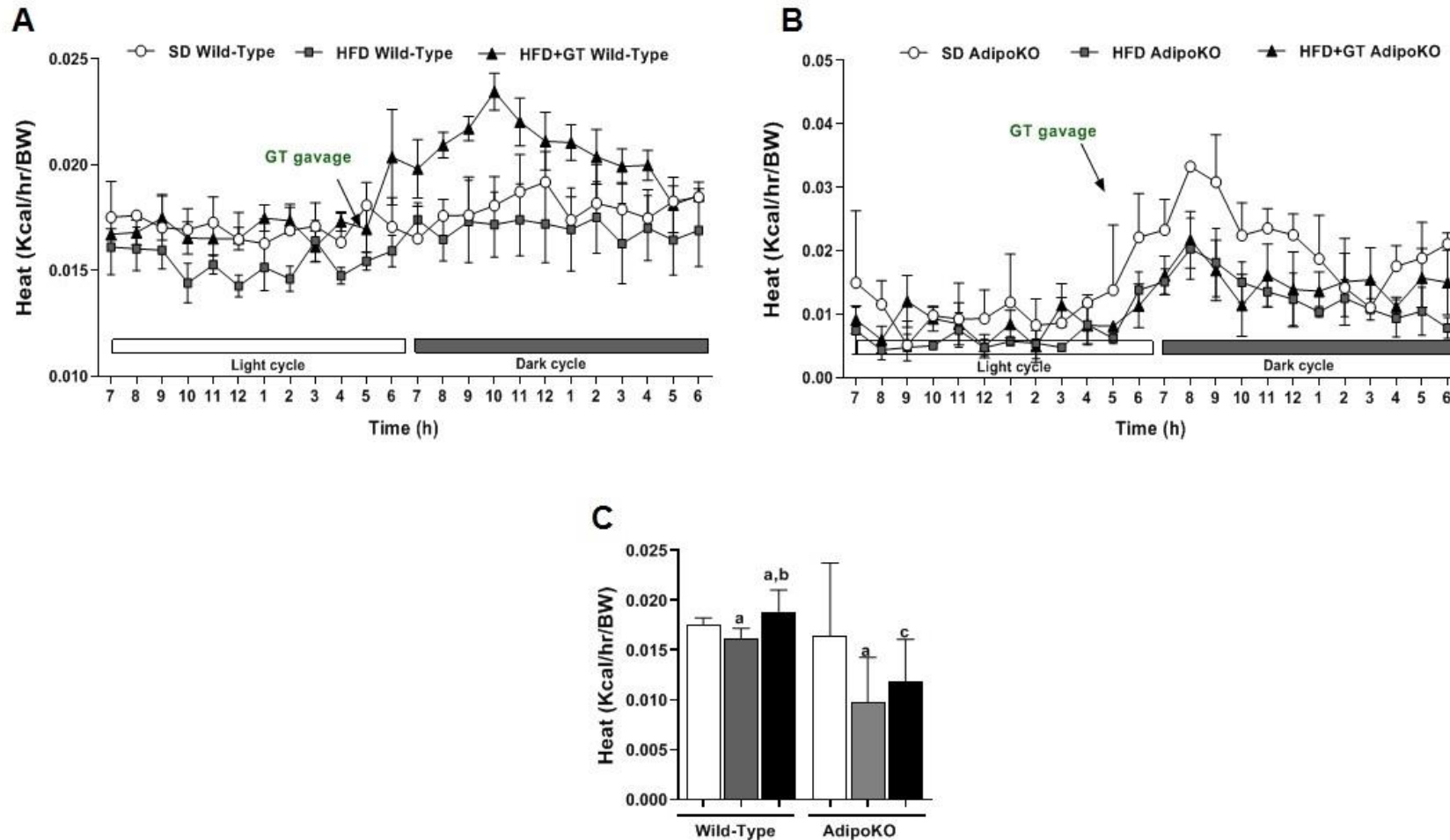
O gasto energético foi avaliado pelo teste de calorimetria indireta (**Figura 10**). Podemos observar que na condição Wild-Type, o tratamento com GT apresentou um aumento significativo no gasto energético após as 19h, cerca de 1h após a gavagem com GT (**Figura 10A**). Na condição AdipoKO não foi observado alteração após o tratamento com GT (**Figura 10B e C**).

Através do mesmo método avaliamos o consumo de oxigênio e o coeficiente respiratório (RER) (**Figura 11**). O consumo de oxigênio foi aumentado pelo tratamento com GT na condição Wild-Type (**Figura 11A e C**). O mesmo perfil não pode ser observado na condição AdipoKO (**Figura 11B e C**). Em relação ao RER podemos observar que em ambas as condições, o grupo SD, tende a ficar mais próximo de 1,0, já os animais alimentados com HFD tanto na condição Wild-Type (**Figura 11D**) como AdipoKO ficam, de forma significativa, mais próximos de 0.7 (**Figura 11D**). Estes dados indicam a preferência na degradação de lipídios para síntese de energia nos animais que receberam a HFD independentemente da adiponectina e do GT.

Diante destes resultados podemos afirmar que a presença de adiponectina é necessária para que o GT atue prevenindo o ganho de peso corporal dos animais. A prevenção do ganho de peso ocorre, provavelmente, devido ao aumento agudo observado nas 5 horas após a administração de GT na condição Wild-Type, o mesmo não sendo observado nos animais AdipoKO.

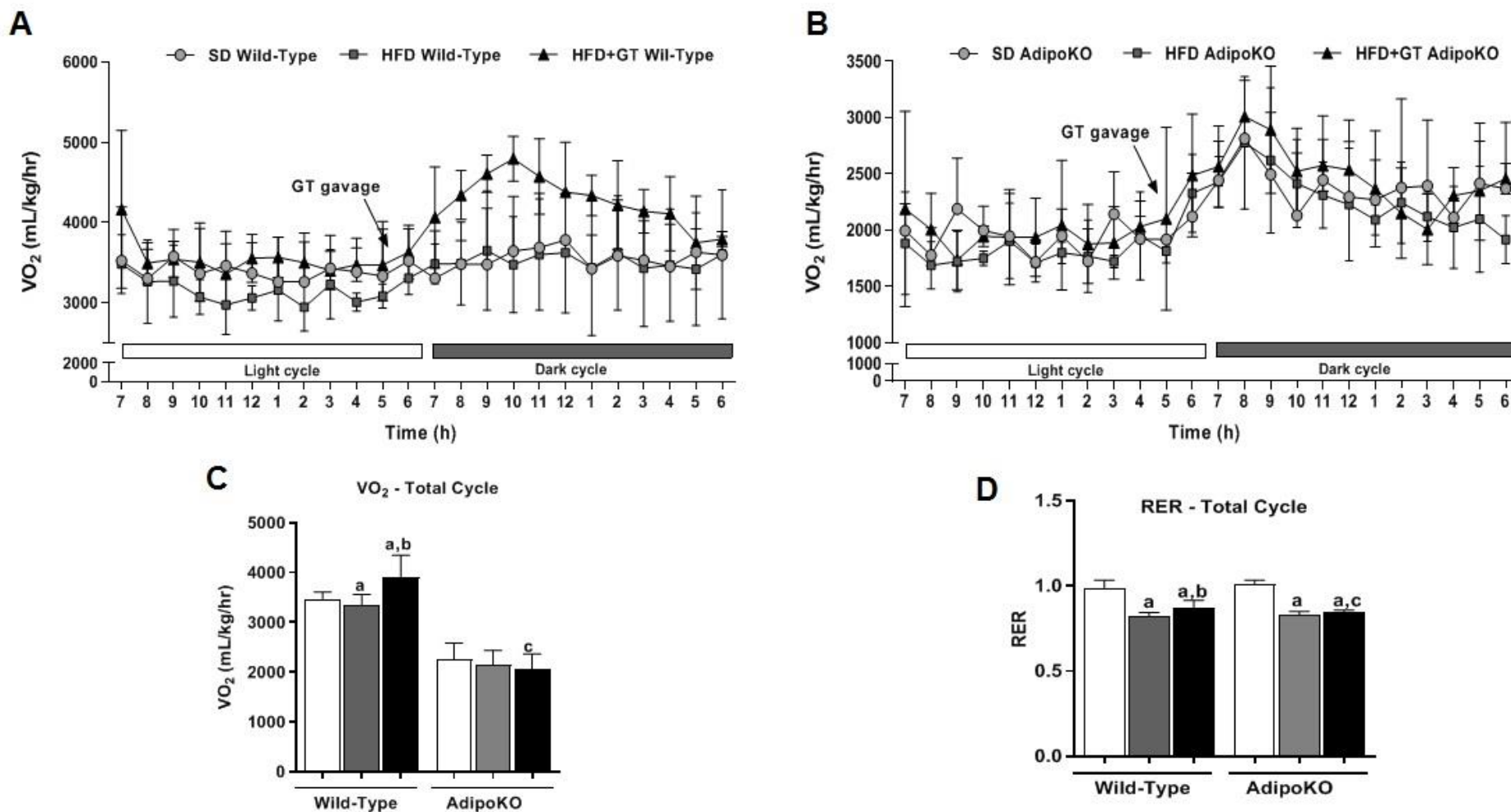


**Figura 10:** Avaliação do efeito do tratamento crônico com o GT no gasto energético de camundongos wild-type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Média do gasto energético no ciclo claro (7h - 18h) e ciclo escuro (19h - 06h) em camundongos Wild-Type, (B) média do gasto energético no ciclo claro (7h - 18h) e ciclo escuro (19h - 06h) em camundongos AdipoKO, (C) AUC do gasto energético em animais Wild-Type e AdipoKO em 24h (D) AUC do gasto energético no período das 19-00hrs em animais Wild-Type e AdipoKO. As barras brancas horizontais representam o período claro e as barras pretas horizontais o período escuro. Os resultados representam um n = 5 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

**Figura 11:** Avaliação do efeito do tratamento crônico com o GT no consumo de oxigênio e no coeficiente respiratório (RER) de camundongos wild-type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com HFD e tratados com chá verde (GT).



(A) Média do consumo de oxigênio no ciclo claro (7h - 18h) e ciclo escuro (19h - 06h) em camundongos na condição Wild-Type, (B) média do consumo de oxigênio no ciclo claro (7h - 18h) e ciclo escuro (19h - 06h) em camundongos na condição AdipoKO, (C) AUC do consumo de oxigênio em 24h em camundongos na condição Wild-Type e AdipoKO e (D) média do coeficiente respiratório (RER) de 24h em camundongos nas condições Wild-Type e AdipoKO. Os resultados representam um n = 4animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

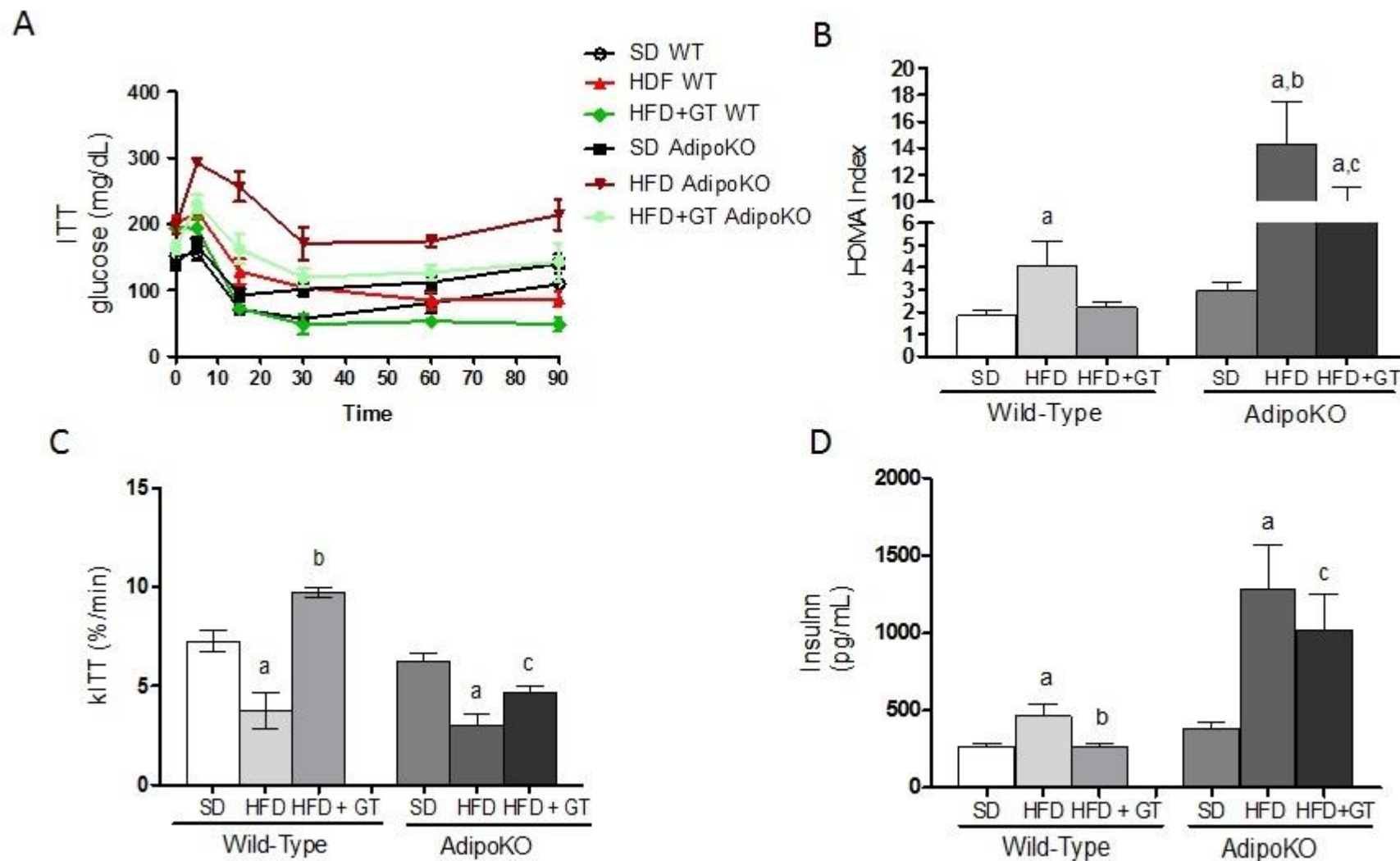
#### 4.2. O GT melhora a sensibilidade à insulina e a ausência de adiponectina atenua esse efeito resultando em hiperinsulinemia

Nós avaliamos o efeito do GT através de indicadores de resistência à insulina sistêmica e da expressão de marcadores hepáticos envolvidos na sinalização da insulina (expressão gênica e proteica) (**Figuras 12 e 13**).

Podemos observar que o tratamento com GT melhorou a sensibilidade à insulina em ambas as condições (Wild-Type e AdipoKO), no entanto, os animais AdipoKO apresentaram significativamente menor sensibilidade comparado aos animais selvagens (**Figura 12A**). Na condição AdipoKO houve um aumento no índice HOMA comparado ao grupo Wild-Type (**Figura 12B**). O  $K_{ITT}$ , calculado a partir da curva do ITT (**Figura 12C**), foi aumentado pelo tratamento com GT na condição Wild-Type, efeito que não foi observado na condição AdipoKO (**Figura 12C**), mostrando assim que a melhora da sensibilidade à insulina induzida por GT depende de adiponectina. Corroborando com esses dados, a hiperinsulinemia nos animais obesos Wild-Type foi revertida pelo tratamento com GT, enquanto que nos animais AdipoKO houve um aumento significativo dos níveis séricos deste hormônio, mesmo após tratamento com GT (**Figura 12D**).

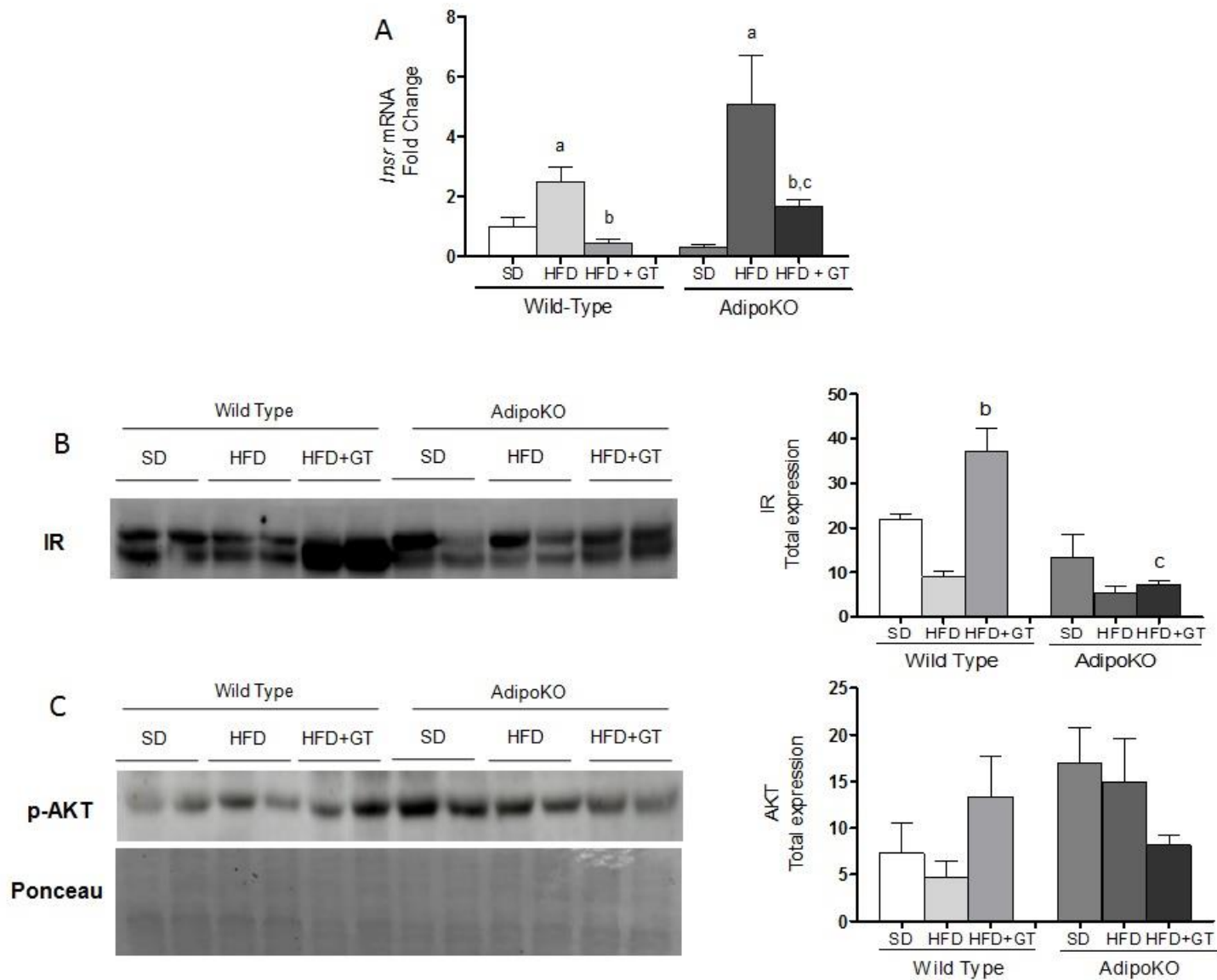
Avaliamos também a expressão gênica do *Insr* no fígado, que foi reduzida pelo tratamento com GT na condição Wild-Type e AdipoKO, no entanto a expressão foi significativamente maior na condição AdipoKO comparado com a condição Wild-Type (**Figura 13A**). A expressão proteica de IR mostrou-se aumentada pelo tratamento com GT na condição Wild-Type, enquanto que foi reduzida significativamente pelo tratamento com o GT na condição AdipoKO (**Figura 13B**). Avaliamos a expressão de AKT e não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais (**Figura 13C**). Com base nos resultados podemos sugerir que a ausência de adiponectina interfere diretamente na sensibilidade sistêmica à insulina e que o GT atua via adiponectina para melhorar a sensibilidade a insulina.

**Figura 12:** Avaliação da resistência à insulina em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Sensibilidade à insulina avaliada pelo teste de tolerância a insulina (ITT), (B) Índice HOMA, (C) taxa de decaimento da glicose e (D) níveis plasmáticos de insulina. Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de Oneway Anova com pós-teste de Tukey.

**Figura 13:** Avaliação da expressão proteica de marcadores da sinalização de insulina no fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Expressão proteica do *Irsr* e (B) Akt. Os resultados representam um n = 4 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de Oneway Anova com pós-teste de Tukey.

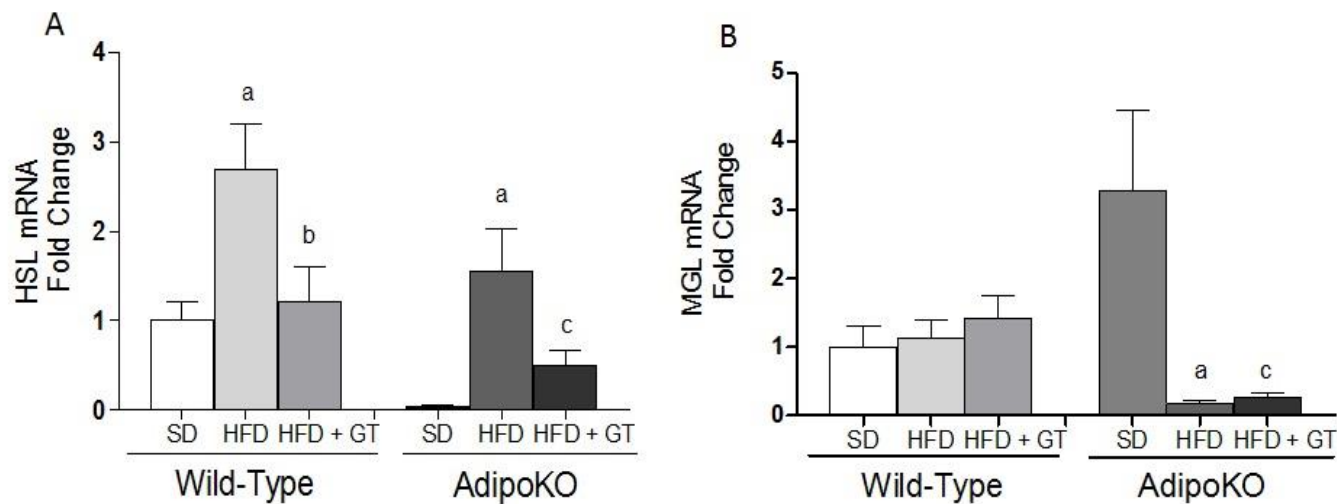
### 4.3. A falta de adiponectina reduz a capacidade do GT de induzir a expressão de marcadores de “output” de lipídios hepáticos

Nós avaliamos a expressão de marcadores de lipólise (**Figura 14**) e beta-oxidação (**Figura 15**) hepática. Nós observamos que a expressão de *Hsl*, foi reduzido pelo tratamento com GT na condição Wild-Type (**Figura 14A**). Adicionalmente a expressão de *Hsl* (**Figura 14A**) e *Mgl* (**Figura 14B**) foi reduzida pelo tratamento com GT na condição AdipoKO comparado com o mesmo grupo na condição Wild-Type.

Avaliamos a concentração plasmática de adiponectina e observamos que o tratamento com GT aumentou a concentração plasmática desta adipocina na condição Wild-Type comparado com o grupo obeso, sendo que os níveis plasmáticos na condição AdipoKO não foram detectáveis, como esperado (**Figura 15A**). Enquanto a expressão de *Adipor2* (**Figura 15B**), *Fgf-21* (**Figura 15C**), *Cpt-1* (**Figura 15D**) e *Ppara* (**Figura 15E**) foi aumentada pelo tratamento com o GT na condição Wild-Type quando comparado ao grupo obeso, o tratamento com GT na condição AdipoKO reduziu significativamente a expressão de todos estes marcadores comparado à condição Wild-Type.

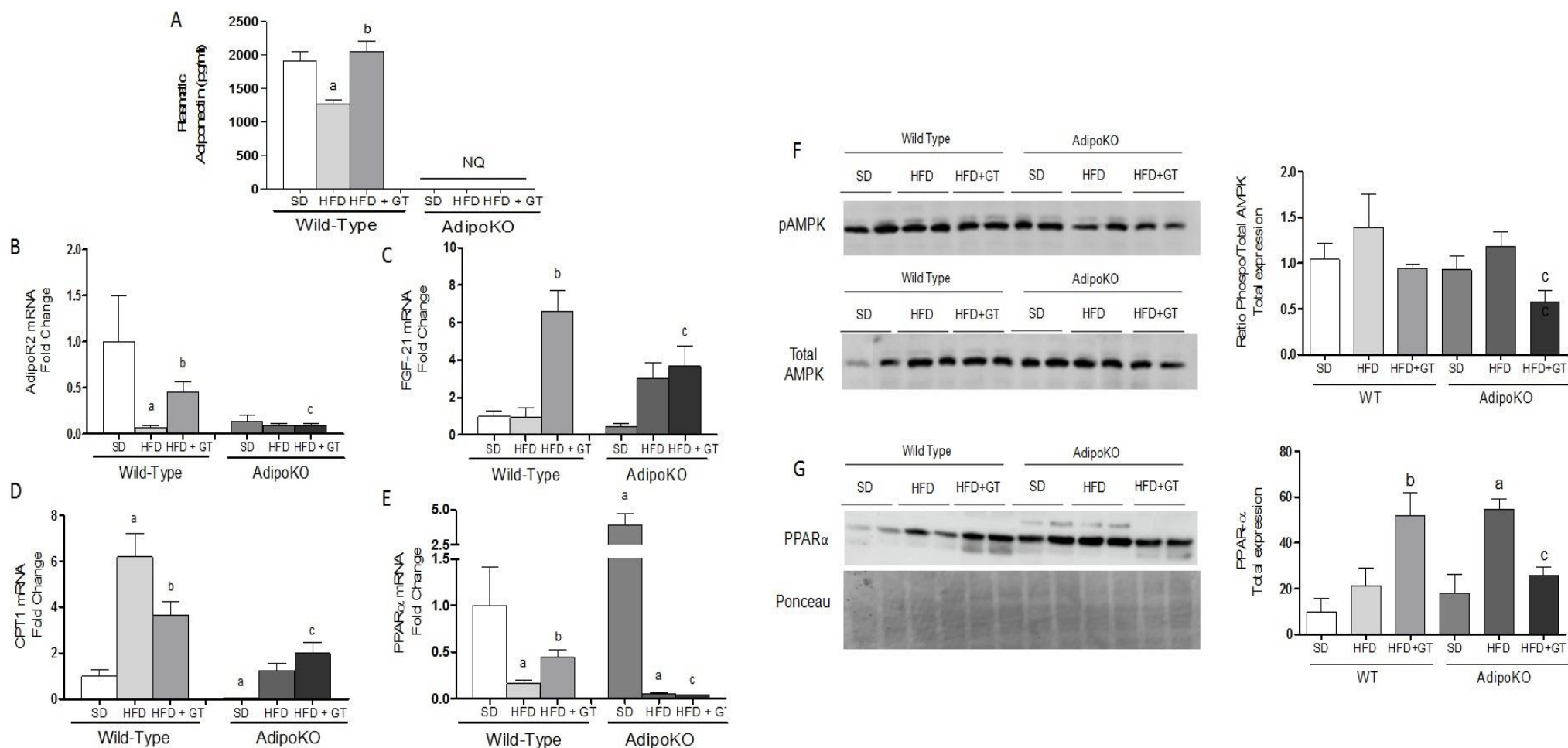
Avaliamos também a razão entre a expressão proteica de AMPK fosforilada e total (**Figura 15F**) e observamos que houve redução significativa entre os animais tratados com GT na condição AdipoKO comparado à condição Wild-Type. Por outro lado, a expressão proteica de *Ppara* foi aumentada pelo tratamento com GT na condição Wild-Type e reduzida na condição AdipoKO (**Figura 15G**). Com base nestes resultados podemos sugerir que a falta de adiponectina faz com que o tratamento com GT perca sua capacidade de induzir vias de degradação (lipólise e beta oxidação) hepáticas.

**Figura 14:** Avaliação da expressão de marcadores da lipólise hepática em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



Avaliação da expressão gênica de (A) *Hsl* e (B) *Mgl*. Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

**Figura 15:** Avaliação dos níveis séricos de adiponectina e expressão e de marcadores da degradação de AGL no fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Avaliação dos níveis séricos de adiponectina, (B) expressão gênica de *AdipoR2*, (C) *Fgf-21*, (D) *Cpt-1*, (E) *Ppar $\alpha$* , e (F) relação da expressão proteica do pAmpk e Ampk (G) *Ppar $\alpha$* . Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild Type. Realizado análise de Oneway Anova com pós-teste de Tukey. NQ= não quantificável



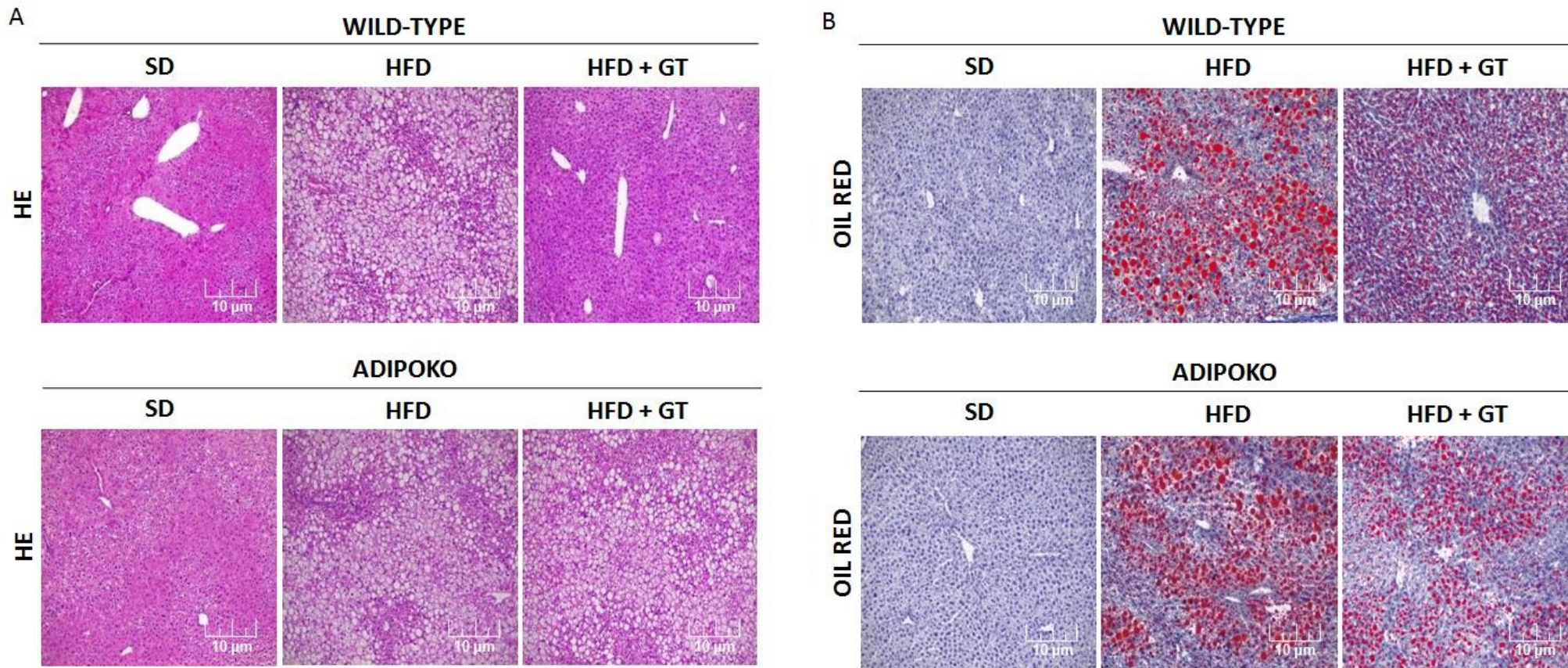
#### **4.4. Efeito do GT sobre a esteatose hepática é perdido com a falta de adiponectina**

Realizamos a avaliação histológica do tecido hepático e a quantificação do conteúdo lipídico neste tecido (**Figura 16**). Através do método de coloração com hematoxilina e eosina (**Figura 16A, superior**), observamos na condição Wild-Type que o tratamento com GT consegue prevenir a esteatose hepática induzida pela HFD. No entanto, na condição AdipoKO o tratamento com GT perde tal efeito (**Figura 16A, inferior**).

Utilizamos também o método de coloração *Oil Red O* (**Figura 16B**) e observamos o mesmo padrão de resultado da coloração HE. Nós observamos que o tratamento com GT reduziu o acúmulo de gordura hepática na condição Wild-Type, porém em menor extensão na condição AdipoKO (**Figura 16B, inferior**).

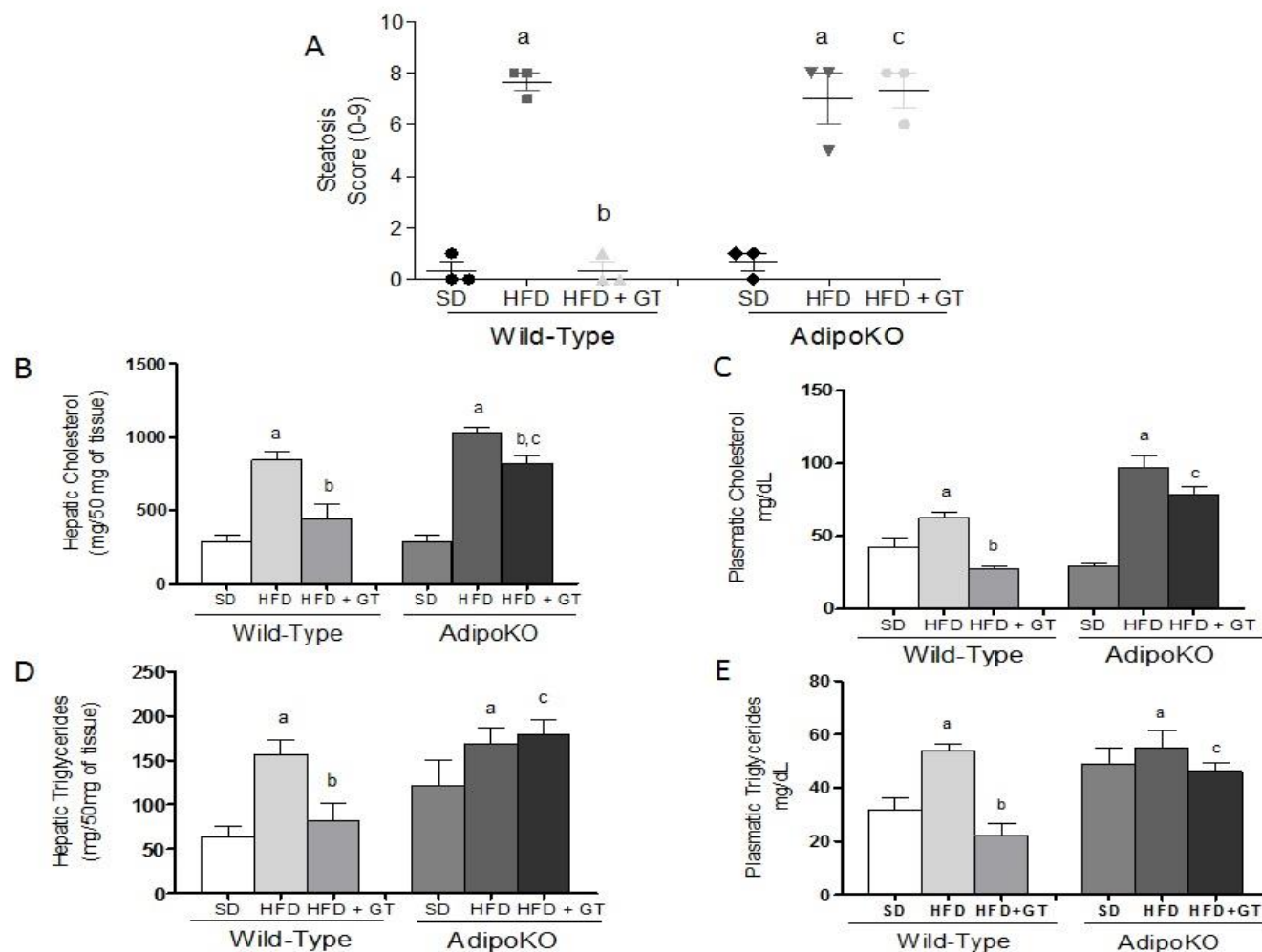
Apartir das análises histológicas realizamos o escore de esteatose e também dosamos a quantidade de lipídios intra- e extra-hepático (**Figura 17**). Nós observamos que o tratamento com GT na condição Wild-Type reduziu o escore de esteatose, efeito que não foi observado na condição AdipoKO (**Figura 17A**). Quantificamos os níveis de colesterol total e TG no plasma e fígado dos animais e observamos que o tratamento com o GT reduziu a quantidade hepática (**Figura 17B**) e plasmática (**Figura 17C**) de colesterol na condição Wild-Type, porém houve um aumento na mesma condição de animais AdipoKO. Avaliamos também os níveis de TG hepático (**Figura 17D**) e plasmático (**Figura 17E**) e observamos o mesmo padrão, ou seja, o tratamento com o GT reduziu os níveis de TG na condição Wild-Type, porém não houve redução na condição AdipoKO.

**Figura 16:** Avaliação histológica do fígado de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) avaliação através da coloração de hematoxilina e eosina e (B) oil-red O. Os resultados representam a análise histológica de um n = 3 animais/grupo.

**Figura 17:** Avaliação da esteatose e dos níveis lipídicos no fígado e no plasma de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (ADIPOKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Escore de esteatose de acordo com a análise histológica (grau 0 – acometimento inferior a 5% dos hepatócitos, grau 1 – acometimento de até 33% dos hepatócitos, grau 2- acometimento de 33-66% dos hepatócitos e grau 3- acometimento superior a 66% dos hepatócitos avaliados), (B) níveis de colesterol hepático e (C) plasmático, (D) níveis de TG hepático e (E) plasmático. Os resultados representam um n = 5 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

#### 4.5. A falta de adiponectina aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese de TG e reduz a expressão gênica e proteica de marcadores de síntese de colesterol.

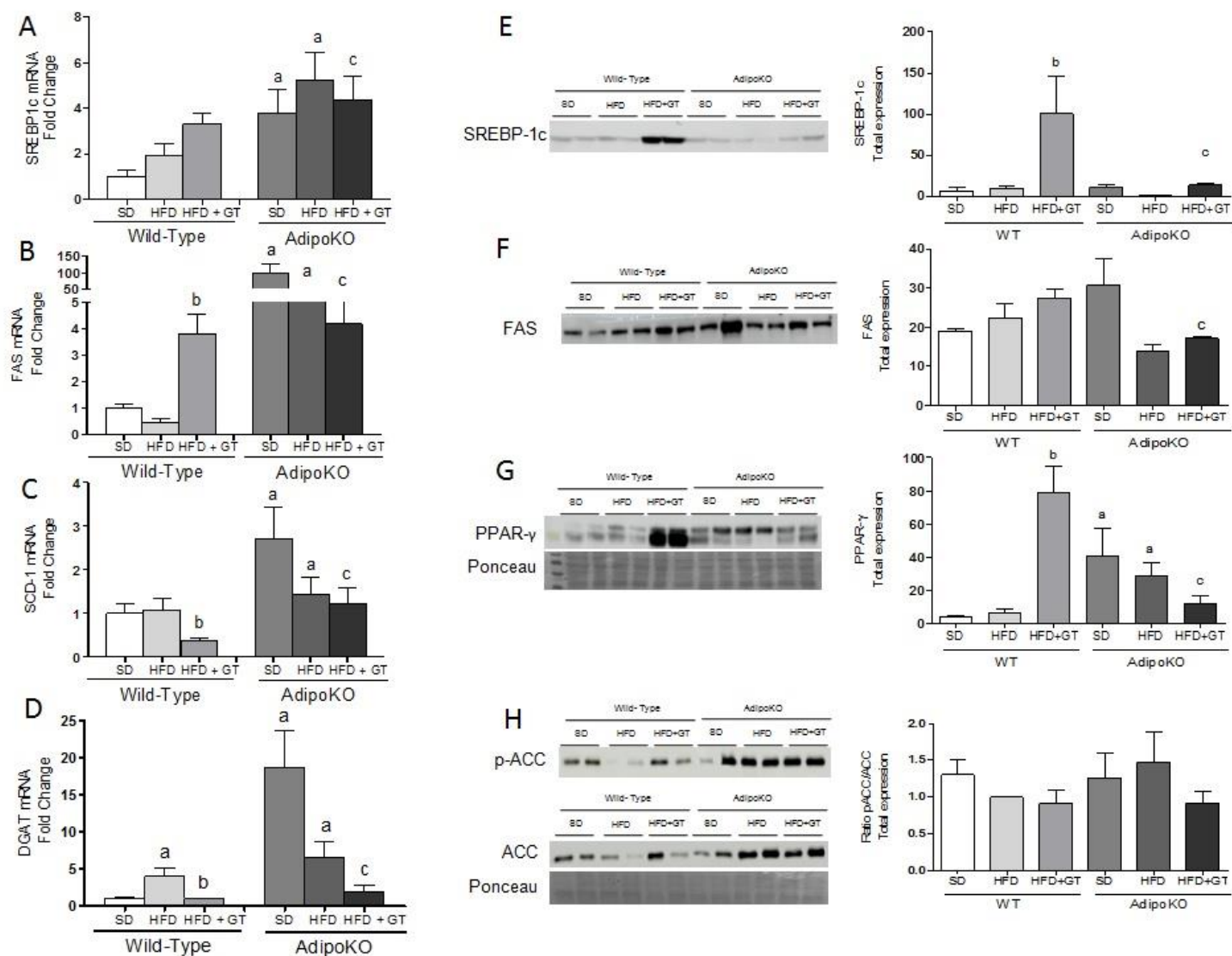
Nós avaliamos a expressão gênica e proteica (**Figuras 18 e 19**) de marcadores das vias de síntese de lipídios no fígado. Nós podemos observar que a expressão gênica de marcadores da síntese de TG, como a *Scd-1* (**Figura 18C**) e *Dgat* (**Figura 18D**) foram diminuídos pelo tratamento com GT na condição Wild-Type, enquanto que, *Srebp-1c* (**Figura 18A**), *Fas* (**Figura 18B**), *Scd-1* (**Figura 18C**) e *Dgat* (**Figura 18D**) foram aumentados pelo tratamento com GT na condição AdipoKO comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type.

Em relação a expressão proteica observamos que o tratamento com GT aumentou a expressão de *Srebp-1c* (**Figura 18E**), e *Ppar $\gamma$*  (**Figura 18G**) na condição Wild-Type, comparado com o grupo obeso, enquanto houve uma redução significativa na condição AdipoKO comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type. Observamos também que a relação da expressão entre a *Acc* fosforilada e total (**Figura 18H**) não apresentou diferença significativa entre grupos. No entanto a expressão proteica de *Fas*, esteve reduzida, pelo tratamento com GT na condição AdipoKO comparada ao seu mesmo grupo na condição Wild-Type (**Figura 18F**).

Por outro lado, a expressão de genes envolvidos com a síntese de colesterol, sendo eles *Srebp2* (**Figura 19A**) e *Hmg coa sintase* (**Figura 19C**) foram aumentados pelo tratamento com GT na condição Wild-Type comparado ao grupo obeso e reduzidos na condição AdipoKO comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type. A expressão proteica de *Srebp-2* (**Figura 19B**) aumentou significativamente na condição Wild-Type pelo tratamento com GT comparado ao grupo obeso, enquanto reduziu significativamente na condição AdipoKO tratada com GT comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type.

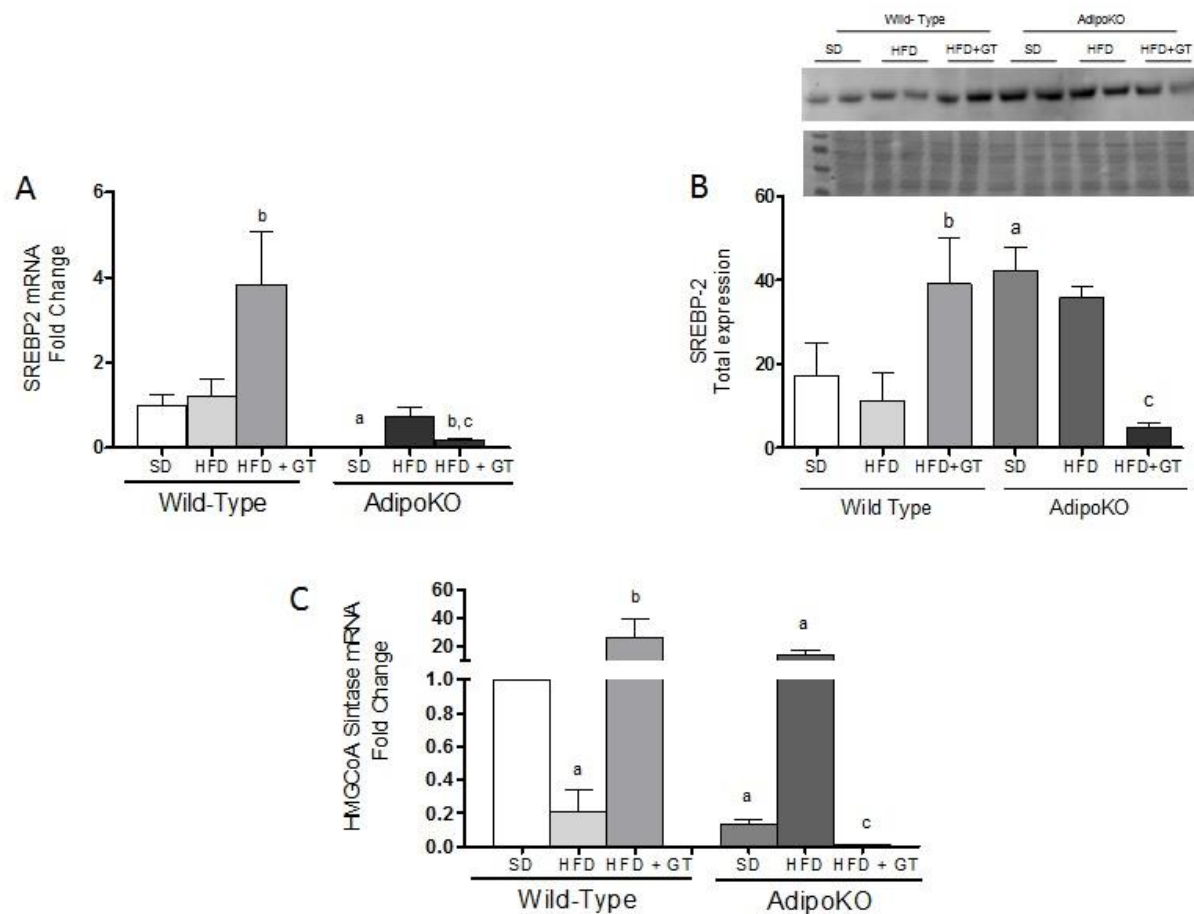
Com base nestes resultados podemos sugerir que o efeito do tratamento com GT, na condição AdipoKO, aumenta a expressão gênica de marcadores da síntese de TG, o que não é refletido na expressão proteica. No entanto, a expressão gênica e proteica de marcadores da síntese de colesterol mostra-se diminuída pelo tratamento com GT na condição AdipoKO.

**Figura 18:** Avaliação de marcadores da lipogênese hepática em camundongos Wild Type (WT) e nocautes para adiponectina (ADIPOKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT)



Avaliação da expressão gênica de (A) *Srebp 1-c*, (B) *Fas*, (C) *Scd*, (D) *Dgat* e expressão proteica de (E) *Srebp-1c*, (F) *Fas*, (G) *Pparγ*, (H) relação *p-Acc/Acc*. Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

**Figura 19:** Avaliação da expressão gênica e proteica de marcadores da síntese de colesterol hepática de camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT)



(A) Expressão gênica de *Srebp2*, (B) expressão proteica do *Srebp 2* e (C) expressão gênica de *Hmg coa Sintase*. Os resultados representam um n = 4 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

#### **4.6. A falta de adiponectina não interfere na capacidade do GT de melhorar a tolerância à glicose, porém reduz o conteúdo de glicogênio hepático**

Nós avaliamos o metabolismo da glicose hepática por meio da tolerância sistêmica da glicose (**Figura 20**) e do metabolismo de glicogênio no fígado (**Figura 21**).

Em relação à tolerância a glicose podemos observar que o tratamento com GT melhora a tolerância à glicose tanto na condição Wild-Type quanto na condição AdipoKO comparado com seus respectivos grupos HFD (**Figura 20A**). Adicionalmente, os níveis de glicose de jejum mostraram-se menores pelo tratamento com o GT em ambas as condições (**Figura 20B**).

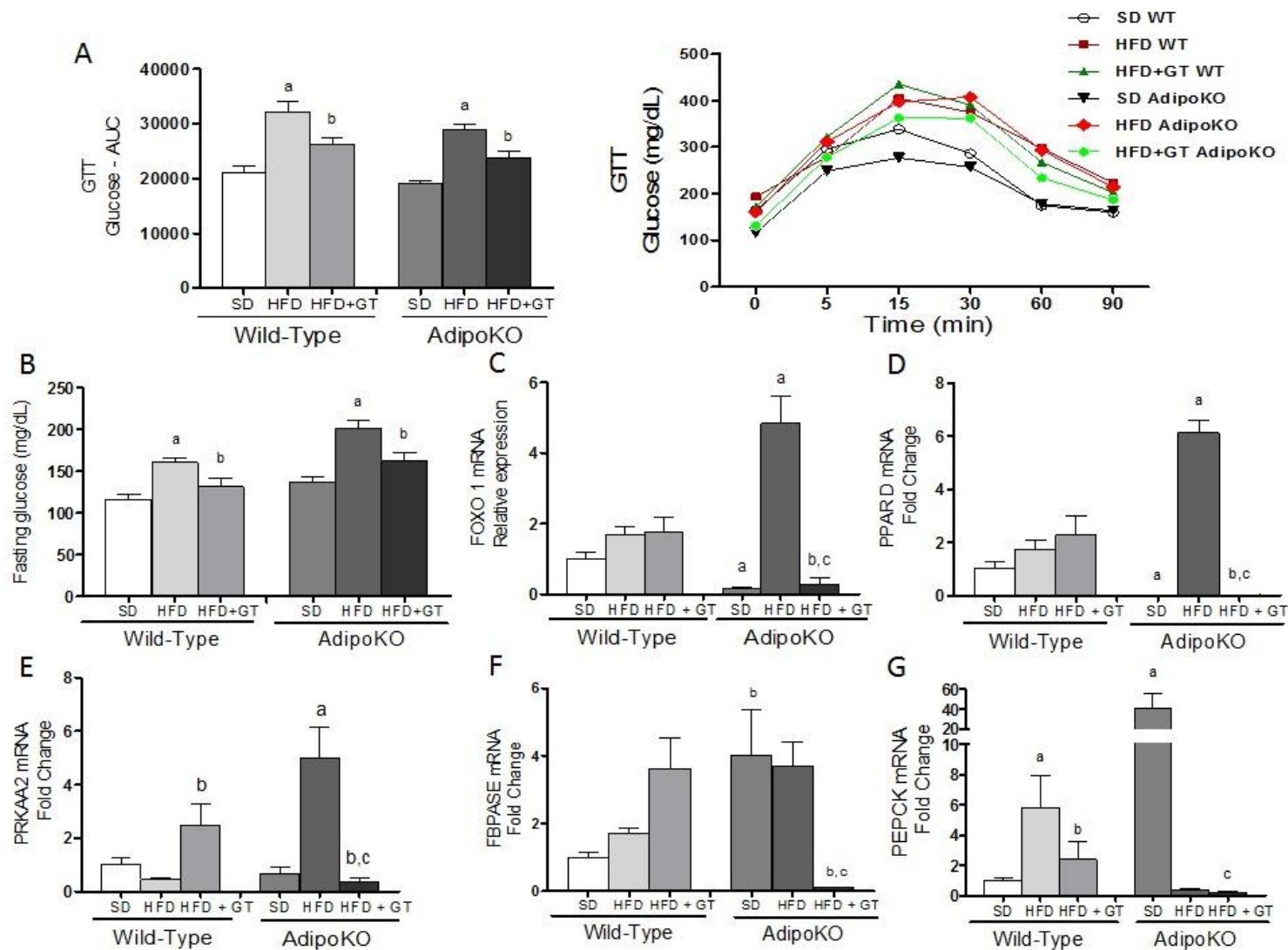
Nós avaliamos a expressão gênica de alguns marcadores da produção hepática de glicose e observamos que apesar do tratamento com GT na condição Wild-Type não ter apresentado efeitos significativos em relação ao grupo HFD, o tratamento com GT na condição AdipoKO reduziu a expressão de *Foxo 1* (**Figura 20C**), *Ppar delta* (**Figura 20D**), *Fbpase* (**Figura 20E**) e *Pepck* comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type (**Figura 20F**).

Avaliamos também a produção de glicogênio hepático (**Figura 21**). A avaliação histológica, realizada através da coloração de PAS, mostra claramente que a deposição de glicogênio aumenta com o tratamento com GT na condição Wild-Type comparado ao grupo HFD (**Figura 21A e B**), evento que não se repete na condição AdipoKO.

A expressão de *Glut-1* (**Figura 21C**), Fosfoglicomutase (**Figura 21D**) e Glicoquinase (**Figura 21E**), apresentaram-se diminuídos pelo tratamento com GT na condição AdipoKO comparado ao mesmo grupo na condição Wild-Type. Por outro lado, a expressão de *Gsk-3* foi reduzida pelo tratamento com GT na condição Wild-Type enquanto houve um aumento nos animais tratados com GT condição AdipoKO comparado ao mesmo grupo na condição Wild-type (**Figura 21F**).

Com base nestes resultados podemos sugerir que o GT melhora a tolerância à glicose, provavelmente por reduzir a produção de glicose mesmo na ausência de adiponectina, enquanto que os níveis de glicogênio hepático, assim como os marcadores de síntese apresentam-se diminuídos nos animais AdipoKO.

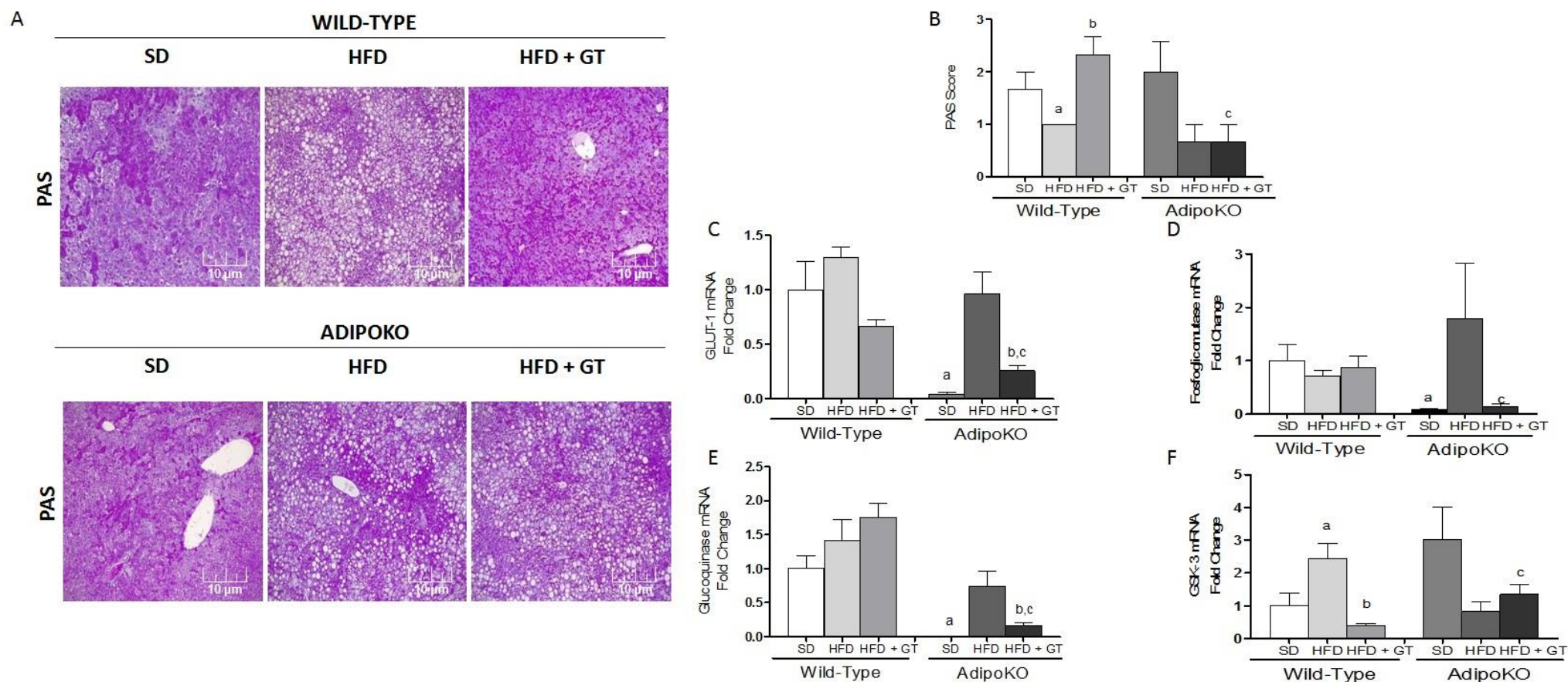
**Figura 20:** Avaliação da tolerância à glicose e de marcadores da síntese glicose hepático em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com GT.



(A) Teste de Tolerância à glicose, (B) glicemia de jejum, (C) Avaliação da expressão gênica de *Foxo-1*, (D) *Ppard*, (E) *Fbpase* e (F) *Pepck*. Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.



**Figura 21:** Avaliação de marcadores da síntese e do conteúdo de glicogênio hepático em camundongos Wild-Type (WT) e nocautes para adiponectina (AdipoKO) induzidos a obesidade com dieta high fat (HFD) e tratados com chá verde (GT).



(A) Avaliação dos níveis hepáticos de glicogênio através da coloração de PAS, (B) escore de PAS de acordo com histologia, (D) expressão gênica de *Glut-1*, (E) Fostoglicomutase, (F) Glicoquinase e (G) *Gsk-3*. Os resultados representam um n = 6 animais/grupo, sendo (a) diferente do grupo SD Wild-Type, (b) diferente do respectivo grupo HFD Wild-Type ou HFD AdipoKO e (c) diferente do grupo HFD + GT Wild-Type. Realizado análise de One-way Anova com pós-teste de Tukey.

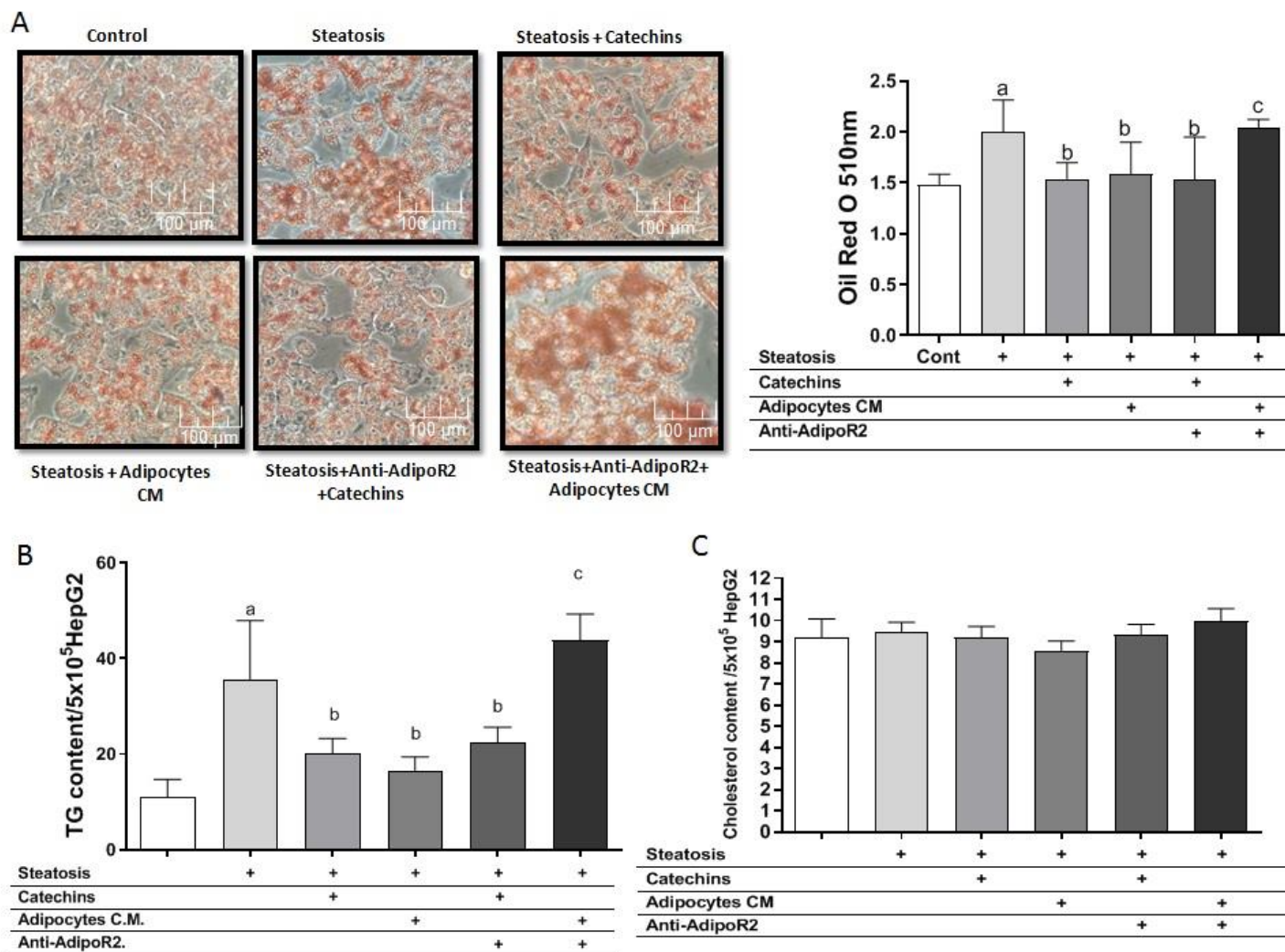
#### **4.7. As catequinas do GT reduzem o acúmulo de TG em células HepG2 de forma independente do receptor de adiponectina ADIPOR2**

Com o objetivo de avaliarmos o mecanismo pelo qual as catequinas agem nos hepatócitos, iniciamos análises *in vitro* bloqueando o receptor de adiponectina AdipoR2. Nos questionamos se os efeitos das catequinas poderiam estar relacionados com a ativação de AdipoR2. Para tanto células HepG2 foram incubadas com o anticorpo de AdipoR2 e após 4 h, o anticorpo foi retirado e então iniciamos a indução da esteatose (ácido oléico e glicose) por 24 h na presença das catequinas do GT e/ou do meio enriquecido de adipócitos, previamente adquiridos conforme descrito na metodologia. Nós podemos observar que o tratamento das células com uma mistura de catequinas, assim como com um meio condicionado (CM), proveniente de adipócitos maduros diferenciados e tratados com catequinas, reduziu o acúmulo lipídico evidenciado pelo método de *Oil-Red O* (**Figura 22A**). Podemos observar também que quando pré-incubamos as células com o anticorpo de AdipoR2, com o intuito de avaliarmos a participação deste receptor nos efeitos das catequinas, foi evidenciado que o efeito inibitório das catequinas se manteve, enquanto que o efeito observado pelo meio condicionado foi inibido (**Figura 22A**), o que nos sugere que o CM possui adiponectina e que esta atua pela ativação de AdipoR2, por outro lado as catequinas parecem estar atuando por outro mecanismo.

Analisamos também sob as mesmas condições o conteúdo de TG e colesterol total *in vitro*. Nós observamos que o tratamento com as catequinas e com o CM de adipócitos reduziu os níveis de TG nas células HepG2 (**Figura 22B**). O efeito do CM foi bloqueado pelo pré-tratamento com o anticorpo do AdipoR2, enquanto que o efeito das catequinas se manteve mesmo com o bloqueio do AdipoR2 (**Figura 22B**). Avaliamos também a quantidade de colesterol total, porém esta não apresentou diferenças significativas entre os grupos (**Figura 22C**).

Com base nestes resultados podemos afirmar que os efeitos das catequinas do GT observados até aqui não envolvem a sua interação com o receptor ADIPOR2, podendo apresentar outro alvo celular como o PPAR- $\alpha$ .

**Figura 22:** Avaliação do efeito das catequinas do GT no acúmulo lipídico de células HEPG2 tratadas com ácido oleico, glicose e anticorpo (Ant.) do receptor de adiponectina ADIPOR2



Grupos experimentais: Controle, esteatose, esteatose+catequinas, esteatose + meio condicionado (CM) de adipócitos, esteatose + catequinas + anti-AdipoR2 e esteatose + CM + anti-AdipoR2. (A) Análise histológica do acúmulo de lipídios com o método de Oil Red O, (B) OD referente à histologia, (C) quantificação de triglicerídeos e (D) colesterol. Os resultados representam um "n" = 3 experimentos, em duplicata, sendo (a) diferente do grupo controle, (b) diferente do grupo esteatose e (c) mix de catequinas + esteatose. Realizado análise de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

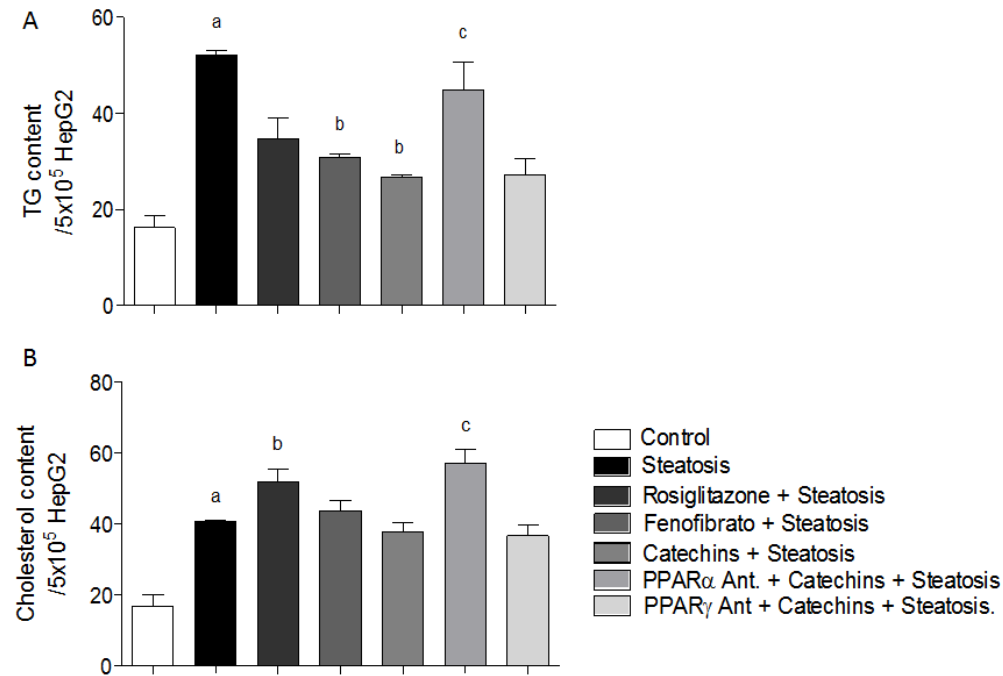
#### 4.8. O tratamento *in vitro* com as catequinas do GT reduziu o acúmulo de TG nas células HepG2 por reduzir a expressão de genes lipogênicos e aumentar a expressão de genes de oxidação de forma dependente de PPAR $\alpha$

A ativação da via de sinalização do AdipoR2 induz PPAR $\alpha$ , que consequentemente aumenta vias de oxidação de lipídios (Chen *et al.*, 2017). Para avaliarmos essa via nos hepatócitos, tratamos as células HepG2 induzidas à esteatose com agonista e antagonista de PPAR $\gamma$  e de PPAR $\alpha$ . Nós observamos que a esteatose em células HepG2 foi capaz de aumentar a deposição de TG e de colesterol total (**Figura 23A e B**). Em relação à quantificação de TG celular observamos que o tratamento com fenofibrato, um agonista de PPAR $\alpha$ , e catequinas foi capaz de reduzir significativamente a deposição deste lipídio comparado ao grupo esteatose (**Figura 23A**). No entanto quando pré-incubamos as células com um antagonista de PPAR $\alpha$ , observamos que o efeito das catequinas foi bloqueado (**Figura 23A**). A quantificação de colesterol total não foi reduzida pelo tratamento com o fenofibrato e com as catequinas comparado ao grupo esteatose (**Figura 23B**). No entanto, quando pré-incubamos as células com o antagonista de PPAR $\alpha$ , o tratamento com as catequinas do GT não conseguiu reduzir a deposição de colesterol comparado ao grupo esteatose (**Figura 23B**).

Nós avaliamos posteriormente a expressão de genes lipogênicos e observamos que o tratamento com o fenofibrato assim como as catequinas reduziram a expressão de *FAS* (**Figura 24A**), *PPAR $\gamma$*  (**Figura 24B**), *CHREBP* (**Figura 24C**), *FAT/CD36* (**Figura 24D**) e *SCD-1* (**Figura 24E**) comparado ao grupo esteatose. Porém, quando às células foram pré-incubadas com o antagonista de PPAR $\alpha$ , o efeito das catequinas foi perdido.

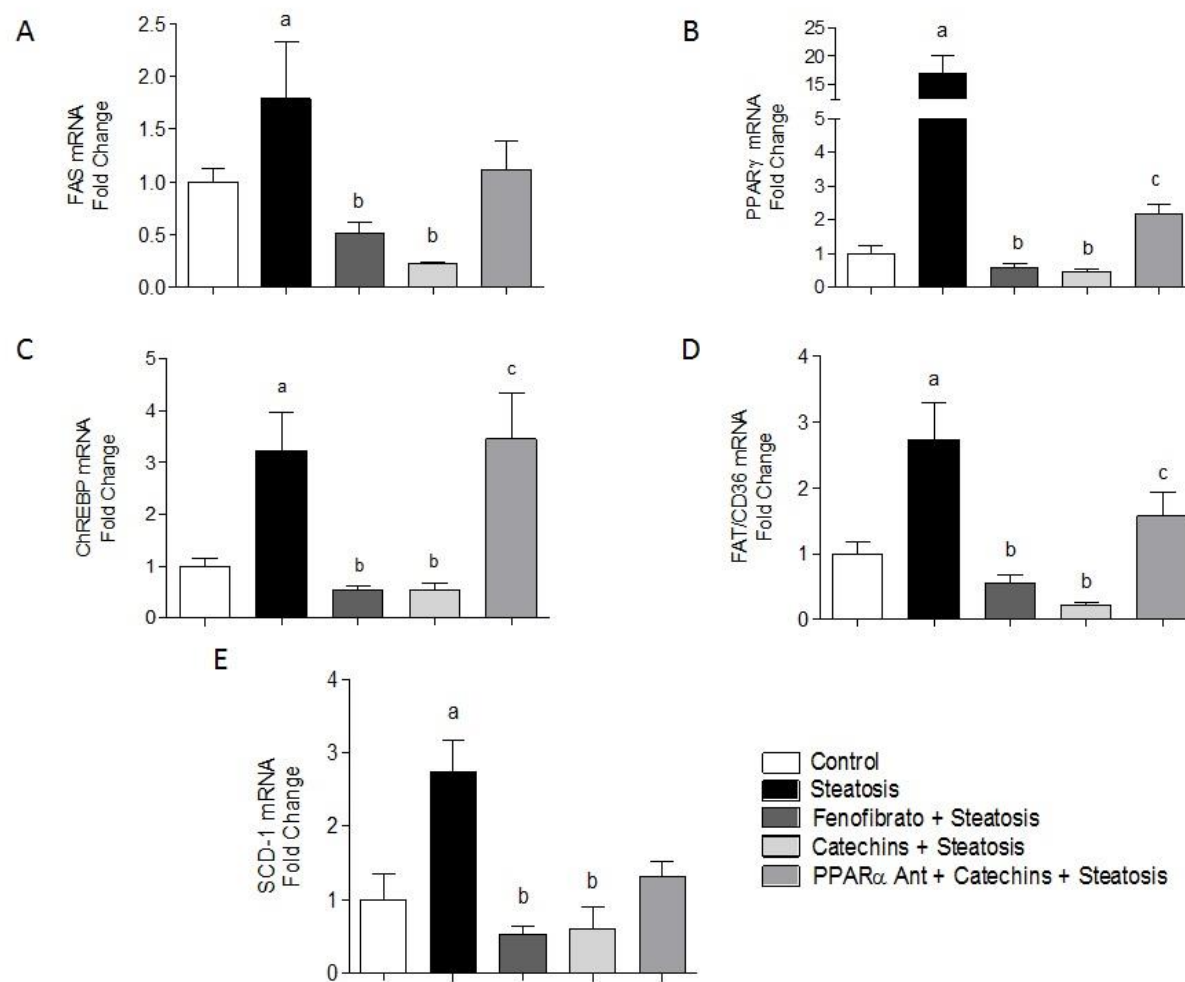
Por fim foi analisado a expressão de genes envolvidos com a oxidação de AG hepáticos. Podemos observar que o tratamento com o fenofibrato, assim com as catequinas, aumentaram a expressão de *PPARA* (**Figura 25A**), *FFG-21* (**Figura 25B**), *CPT-1* (**Figura 25C**) e *UCP-2* (**Figura 25D**). Por outro lado, a pré-incubação com o antagonista do PPAR $\alpha$  inibiu o efeito das catequinas. Podemos concluir que a ativação de PPAR $\alpha$  tem papel central no efeito das catequinas em reduzir o acúmulo lipídico no fígado.

**Figura 23:** Efeito do mix de catequinas no acúmulo lipídico em células HepG2 induzidas à esteatose



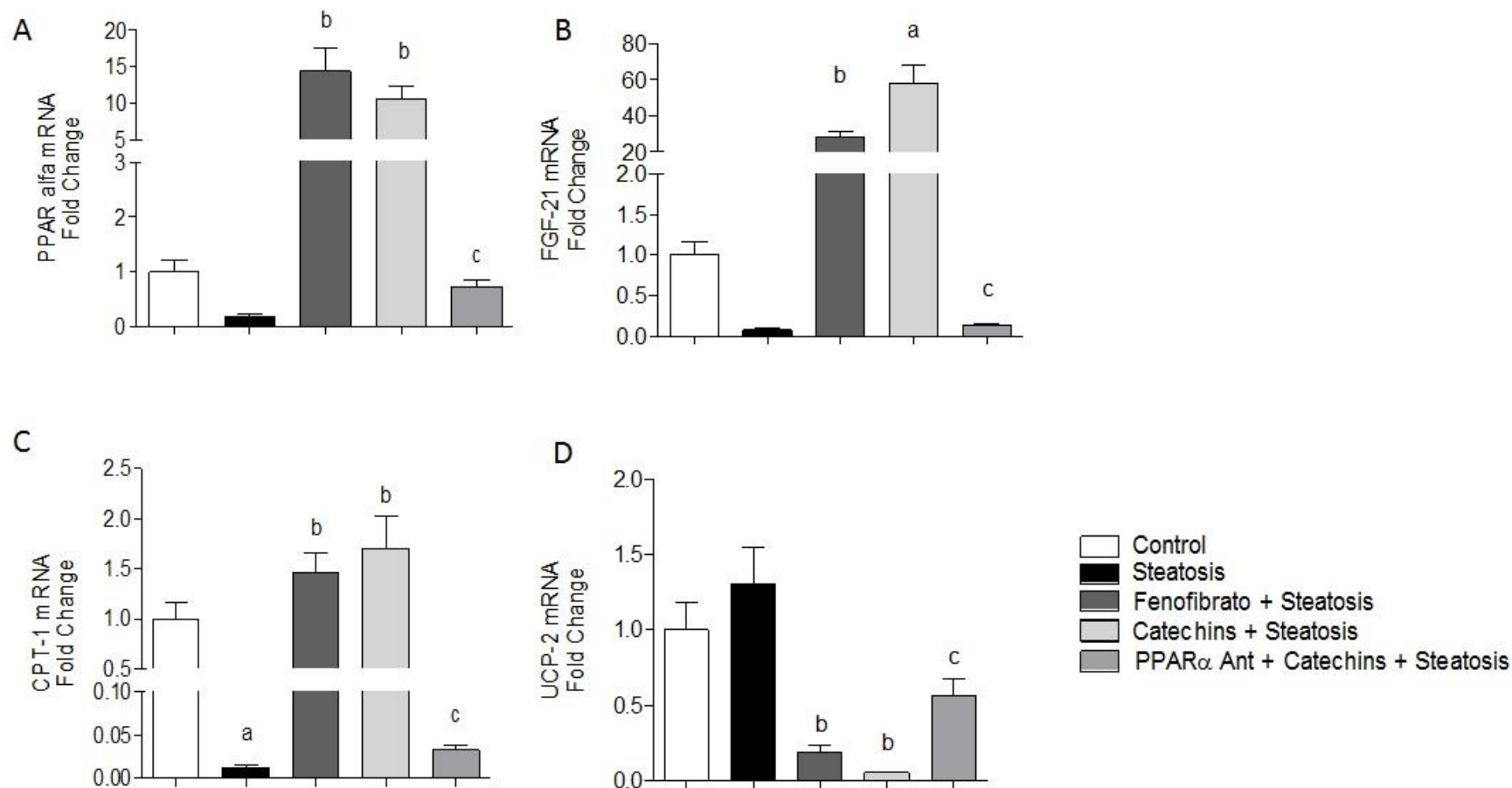
Esteatose induzida (durante 24 h) com ácido oléico + glicose em células pré tratadas com 5 $\mu$ M de agonista PPAR $\alpha$  (Fenofibrato) e de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona), 5 $\mu$ M de antagonistas de PPAR $\alpha$  (GW6471) e de PPAR $\gamma$  (GW9662), por 6 h, antes da indução da obesidade. As células foram tratadas durante 48h com as catequinas do GT. (A) quantificação de TG nas células HepG2 e (B) quantificação de colesterol total nas células HepG2. Os resultados representam um "n" = 3 experimentos, em duplicata em 48 h de cultura sendo (a) diferente do grupo controle, (b) diferente do grupo esteatose e (c) diferente do grupo mix de catequinas + esteatose. Realizado análise de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

**Figura 24:** Efeito do mix de catequinas na expressão de marcadores de lipogênese em células HepG2 induzidas à esteatose e tratadas com agonista de Ppar $\alpha$  na presença e ausência de antagonista



Esteatose induzida por 24 h com ácido oléico + glicose em células pré-tratadas com 5 $\mu$ M de agonista PPAR $\alpha$  (Fenofibrato) e de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona), 5 $\mu$ M de antagonistas de PPAR $\alpha$  (GW6471) e de PPAR $\gamma$  (GW9662), por 6 h previamente à indução da esteatose. As catequinas do GT foram adicionadas por 48h. Avaliação da expressão gênica (mRNA) de (A) *Fas*, (B) *Ppar $\gamma$* , (C) *ChREBP*, (D) *Srebp-1c* e (E) *Scd-1*. Os resultados representam um "n" = 3 experimentos, em duplicata, sendo (a) diferente do grupo controle, (b) diferente do grupo esteatose e (c) mix de catequinas + esteatose. Realizado análise de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

**Figura 25:** Efeito do mix de catequinas na expressão de marcadores de catabolismo lipídico em células HepG2 induzidas à esteatose e tratadas com agonista de Ppara na presença e ausência de antagonista



Esteatose induzida (durante 24 horas) com ácido oléico + glicose e pré tratadas com 5 $\mu$ M de agonista PPAR $\alpha$  (Fenofibrato) e de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona), 5 $\mu$ M de antagonistas de PPAR $\alpha$  (GW6471) e de PPAR $\gamma$  (GW9662), por 6 horas, antes da indução da esteatose, e tratadas durante 48h com as catequinas do GT. Expressão gênica de (A) *Ppara*, (B) *Fgf-21* e (C) *Cpt-1* e (D) *Ucp-2*. Os resultados representam um "n" = 3 experimentos, em duplicata, sendo (a) diferente do grupo controle, (b) diferente do grupo esteatose e (c) mix de catequinas + esteatose. Realizado análise de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

#### 4.9. As catequinas do GT, EGC e EC são capazes de ligar diretamente ao PPAR $\alpha$ de maneira dose-dependente

Foi avaliado o efeito das catequinas do GT sobre a ativação do PPAR $\alpha$  (**Figura 26**). Primeiramente com as doses usadas nos experimentos descritos acima e posteriormente realizamos uma curva dose-resposta de cada catequina na ativação de PPAR $\alpha$ .

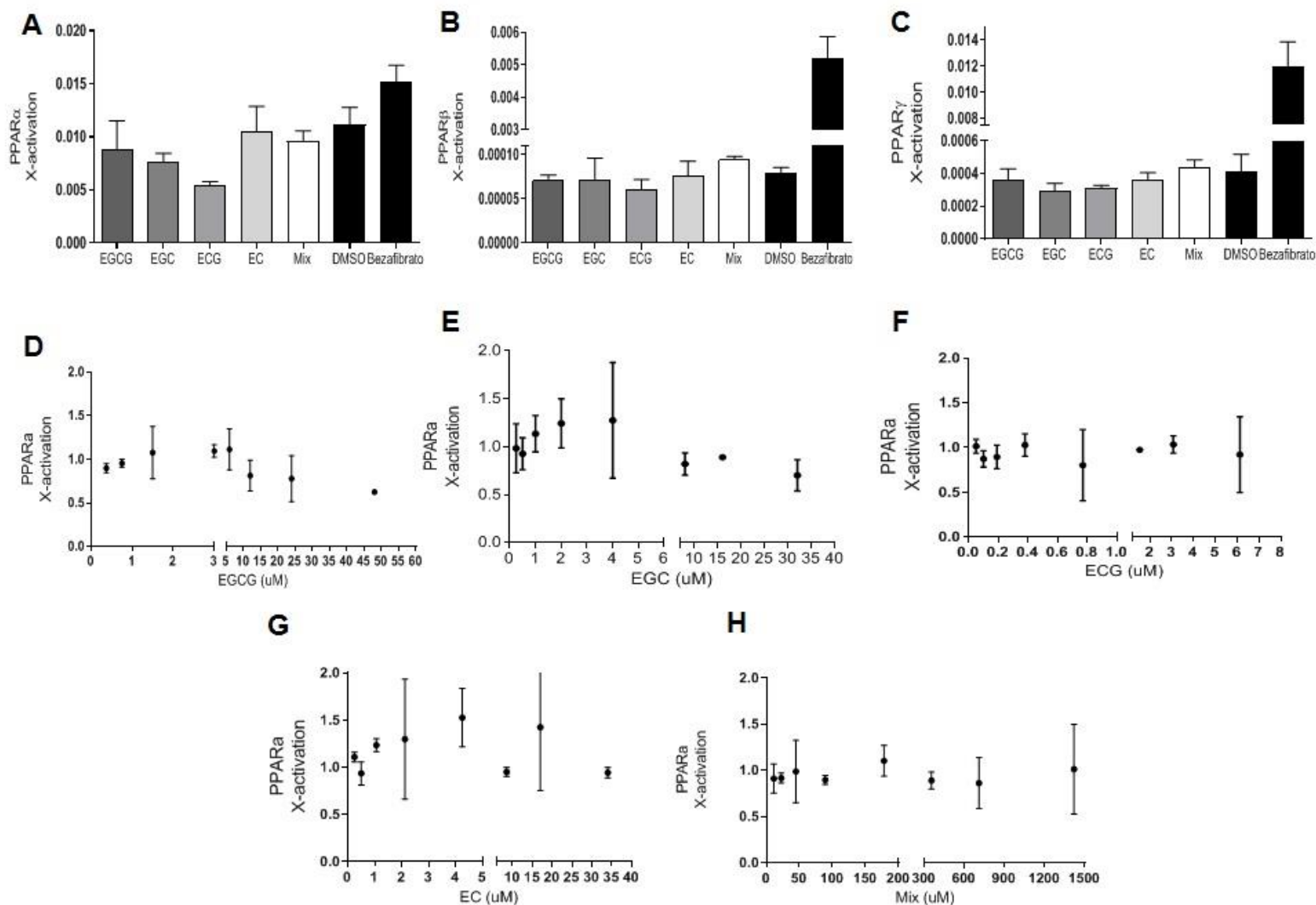
Com o objetivo de avaliarmos se as catequinas atuam via PPAR $\alpha$  por transativação direta, avaliamos a capacidade das quatro catequinas do GT e do Mix de catequinas sobre o PPAR $\alpha$ . Nós observamos que as catequinas do GT, EGCG (100nM), EGC (50nM), ECG (30nM), EC (20nM) e Mix (200nM) não foram capazes de ativar nenhuma das isoformas de PPAR avaliadas PPAR $\alpha$  (**Figura 26A**), PPAR $\gamma$  (**Figura 26B**) e PPAR $\delta$  (**Figura 26C**).

Posteriormente repetimos esta avaliação, desta vez com uma curva dose resposta, com concentrações crescentes de cada catequina. Nós podemos observar que a EGCG não demonstrou ativação do PPAR $\alpha$  nas doses testadas (**Figura 26D**), mesmo efeito observado durante a avaliação da ECG (**Figura 26F**) e do mix de catequinas (**Figura 26H**). Por outro lado, a EGC na concentração de 4 $\mu$ M (**Figura 26E**) e a EC na concentração de 4,25Mm (**Figura 26G**) apresentaram um aumento significativo na ativação de PPAR $\alpha$ .

Diante dos resultados podemos sugerir que as catequinas EGC e EC são capazes de aumentar a ativação do PPAR $\alpha$ , provavelmente pela sua maior lipofilicidade comparado a EGCG e ECG.



**Figura 26:** Avaliação da transativação de PPAR $\alpha$  pelas catequinas do GT



(A) avaliação da ativação de PPAR $\alpha$ , (B) PPAR $\beta$  e (C) PPAR $\gamma$ , (D) avaliação da ativação pela EGCG nas concentrações 0,37 - 0,75 - 1,5 - 3 - 6 - 12 - 24 - 48 $\mu$ M, (E) avaliação da ativação pela EGC nas concentrações 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32  $\mu$ M, (F) avaliação da ativação pela ECG nas concentrações 0,05 - 0,1 - 0,19 - 0,38 - 0,77 - 1,53 - 3,07 - 6,13 $\mu$ M, (G) avaliação da ativação pela EC nas concentrações 0,25 - 0,5 - 1,06 - 2,12 - 4,25 - 8,5 - 17 - 34 $\mu$ Me (H) avaliação da ativação pelo Mix nas concentrações 11,1 - 22,3 - 44,5 - 89 - 178 - 355 - 710 - 1420 $\mu$ M. Realizado análise de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

## 5.0. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar se os efeitos do tratamento crônico com GT sobre as vias metabólicas e de sinalização à insulina hepática de animais induzidos a obesidade com HFD são mediados pela adiponectina.

Nossos dados indicam que o modelo de indução à obesidade (exposição crônica a uma dieta hiperlipídica) (Golay e Bobbioni, 1997; Hariri e Thibault, 2010; Walker *et al.*, 2017; Sima *et al.*, 2018) utilizado neste estudo foi eficaz, principalmente como indicado pelo aumento do peso corporal dos depósitos adiposos e pela indução da esteatose hepática em ambas as condições (Wild-Type e AdipoKO). Adicionalmente, o tratamento crônico com GT demonstrou efeitos distintos dependendo da condição avaliada. Nos animais Wild-Type o tratamento com GT apresentou, de forma dependente de adiponectina, redução do ganho de peso, provavelmente pela indução do gasto energético agudo mesmo. Apesar de não ter sido observado preferência pelos lipídios como forma de substrato energético pelos animais que receberam o tratamento com o GT (Brehm *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015). Estudos têm indicado que o GT age como importante indutor de vias termogênicas (Janssens *et al.*, 2015; Türközü e Tek, 2017) e que estes efeitos estão associados a maiores níveis de adiponectina circulante (Dostal *et al.*, 2016; Izadi *et al.*, 2018; Bolin *et al.*, 2020).

A adiponectina, por sua vez, quando administrada diretamente por via subcutânea e intracerebroventricular está associado a perda de peso, diminuição da ingestão alimentar e indução da termogênese (Qi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016). A redução no ganho de peso está diretamente associada com a estabilização da sinalização de insulina (Blüher, 2016; Saad *et al.*, 2016), e com os níveis séricos deste hormônio, a falta de adiponectina prejudica a ação do GT sobre este parâmetro. O ganho de peso (Machado e Cortez-Pinto, 2016), a resistência à insulina (Utzschneider e Kahn, 2006), o desbalanço entre vias de lipogênese e oxidação (Kitade *et al.*, 2017; Manco, 2017) e o aumento da produção hepática de glicose (Vacca *et al.*, 2015) estão todos envolvidos na indução da esteatose hepática.

A resistência à insulina está associada a uma piora da esteatose hepática principalmente pelo aumento da síntese de lipídios hepática (TG e colesterol)

(Tamura e Shimomura, 2005) e aumento na captação de lipídios frente ao aumento da lipólise no tecido adiposo, podendo representar em até 60% do aporte de lipídios do fígado (Roberts *et al.*, 2009). A sinalização de adiponectina favorece a sensibilidade a insulina através da proteína reguladora conhecida como PH domain and leucine zipper 1 (APPL1) (Hosch *et al.*, 2006; Wang e Scherer, 2016). Neste estudo, mostramos que o tratamento com GT melhora a sensibilidade à insulina, além de aumentar os níveis de adiponectina nos animais obesos.

A sinalização hepática de glucagon é tão importante quanto a de insulina na regulação do acúmulo lipídico hepático. Apesar dos níveis de glucagon não terem sido medidos neste estudo, a redução nos níveis de glicogênio associados a redução da atividade da glicoquinase na condição AdipoKO podem estar relacionados com a diminuição da sinalização hepática de glucagon resultando em diminuição do gasto energético e consequente aumento do peso corporal e da esteatose hepática (Samuel e Shulman, 2018). A falta de adiponectina reduz a ativação da glicogênio sintase quinase (Hojlund *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). No nosso estudo este efeito justificaria a diminuição dos estoques de glicogênio observado nos animais AdipoKO tratados com GT.

A tolerância à glicose e a produção hepática de glicose são importantes fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose (Assini *et al.*, 2015; Meex *et al.*, 2015), visto que, o fator de transcrição Chrebp, importante indutor de vias lipogênicas, é induzido quase que exclusivamente por este substrato energético. A melhora da tolerância à glicose, assim como a redução da produção hepática de glicose pelo tratamento com o GT nas condições Wild-Type e AdipoKO evidenciaram a capacidade do GT de atuar no metabolismo de maneira semelhante à adiponectina, tendo em vista que a adiponectina atua no aumento da expressão de AMPK no músculo (Pournourmohammadi *et al.*, 2017), de IRS-1 no tecido adiposo (Ueno *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2013) e na diminuição de PEPCK e G6Pase no fígado (Waltner-Law *et al.*, 2002; Csala *et al.*, 2007). Este efeito pode indicar que mesmo na ausência de adiponectina o GT apresenta importante efeito metabólico no fígado de animais obesos.

O aumento de esteatose nos animais AdipoKO pode estar relacionado ao aumento da expressão de genes lipogênicos (SREBP1-c, FAS, SCD e DGAT) observado no fígado. Adicionalmente podemos afirmar que estes animais, apresentaram desbalanço entre a síntese/degradação de lipídios hepáticos,

ocorrendo maior depósito, e menor exportação, seja por vias de beta oxidação ou de lipólise. Tanto GT (Yang *et al.*, 2016; Roychoudhury *et al.*, 2017) como a adiponectina (Ishtiaq *et al.*, 2019; Esmaili *et al.*, 2020) tem sido descrito como indutores de vias de *output* de lipídios hepáticos.

Diversos estudos já descreveram a participação da adiponectina e do GT induzindo vias oxidativas por meio da regulação de AdipoR2 (Yamauchi, Toshimasa *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2008), PPAR $\alpha$  (Combs e Marliss, 2014; Yamauchi *et al.*, 2014) e FGF-21 no fígado. Adicionalmente a maior parte dos efeitos fisiológicos descritos do GT na literatura sugerem que as principais responsáveis são as catequinas (Crespy, Vanessa e Williamson, Gary, 2004; Yong Feng, 2006; Zaveri, 2006; Velayutham *et al.*, 2008).

Apesar da clara relação entre os efeitos do GT e os níveis de adiponectina, buscamos saber se as catequinas do GT poderiam atuar como ligantes diretos do receptor da adiponectina. Esta hipótese é embasada no fato de que estes compostos são extensivamente descritos com a capacidade de atuar sobre receptores como os receptores de laminina 67 (Gundimeda *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2016), canais iônicos e até transportadores de efluxo expressos em grande quantidade no intestino delgado, rins e barreira hematoencefálica (Ziberna *et al.*, 2014). Adicionalmente a isto foi evidenciado que o uso de um agonista do AdipoR2, conhecido como Adiporon, melhorou a resistência à insulina assim como aumentou a expressão de genes de oxidação hepática reduzindo assim a esteatose (Zhang *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018). No entanto, no nosso modelo, o efeito das catequinas do GT, se manteve presente mesmo após o bloqueio de AdipoR2, indicando que este não seria o mecanismo pelo qual o GT atua no fígado.

Por outro lado, assim como a adiponectina age no fígado induzindo vias de oxidação via sinalização dependente de PPAR $\alpha$ , a ação das catequinas mostrou-se dependente deste fator de transcrição. Estes dados corroboram com a literatura que demonstra a capacidade das catequinas (Andrade *et al.*, 2014) em diminuir a deposição de lipídios no fígado e em linhagens de hepatócitos (Sugiura *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013) via sinalização de PPAR $\alpha$  (Yan *et al.*, 2013; Gibellini *et al.*, 2015). Adicionalmente indivíduos portadores de NAFLD, apresentam níveis de PPAR $\alpha$  significativamente menores (Francque *et al.*, 2015; Liss e Finck, 2017) indicando que o que observamos *in vitro* pode ser reproduzido no nosso modelo *in vivo*.

A esteatose hepática, que foi o alvo central deste estudo, é um processo induzido pela progressão da síndrome metabólica que possui como principal disparador a resistência à insulina (Luukkonen *et al.*, 2016; Kozyra *et al.*, 2018). É bem descrita a relação entre a obesidade, a resistência à insulina e a inflamação crônica de baixo grau (Ji *et al.*, 2015; Ambade *et al.*, 2019). Adicionalmente tanto a adiponectina (Hariri e Thibault, 2010; Geagea *et al.*, 2018) como o GT (Otton *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018) tem sido apontados por seus efeitos anti-inflamatórios diminuindo a expressão de fatores de transcrição como NFkB e Ap1 assim como os níveis séricos de interleucinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ . A melhora da esteatose juntamente com o perfil metabólico hepático pode estar envolvida com a melhora do perfil inflamatório do tecido. Visto que avaliamos o ganho de peso e a resposta sistêmica e local da insulina, a investigação da participação da via inflamatória sobre o perfil metabólico hepático pode representar a fragilidade deste estudo. Entretanto, dados do nosso grupo publicados recentemente tem demonstrado que o tratamento crônico com GT apresentou redução nos níveis circulantes de citocinas pro-inflamatórias (Torres *et al.*, 2019).

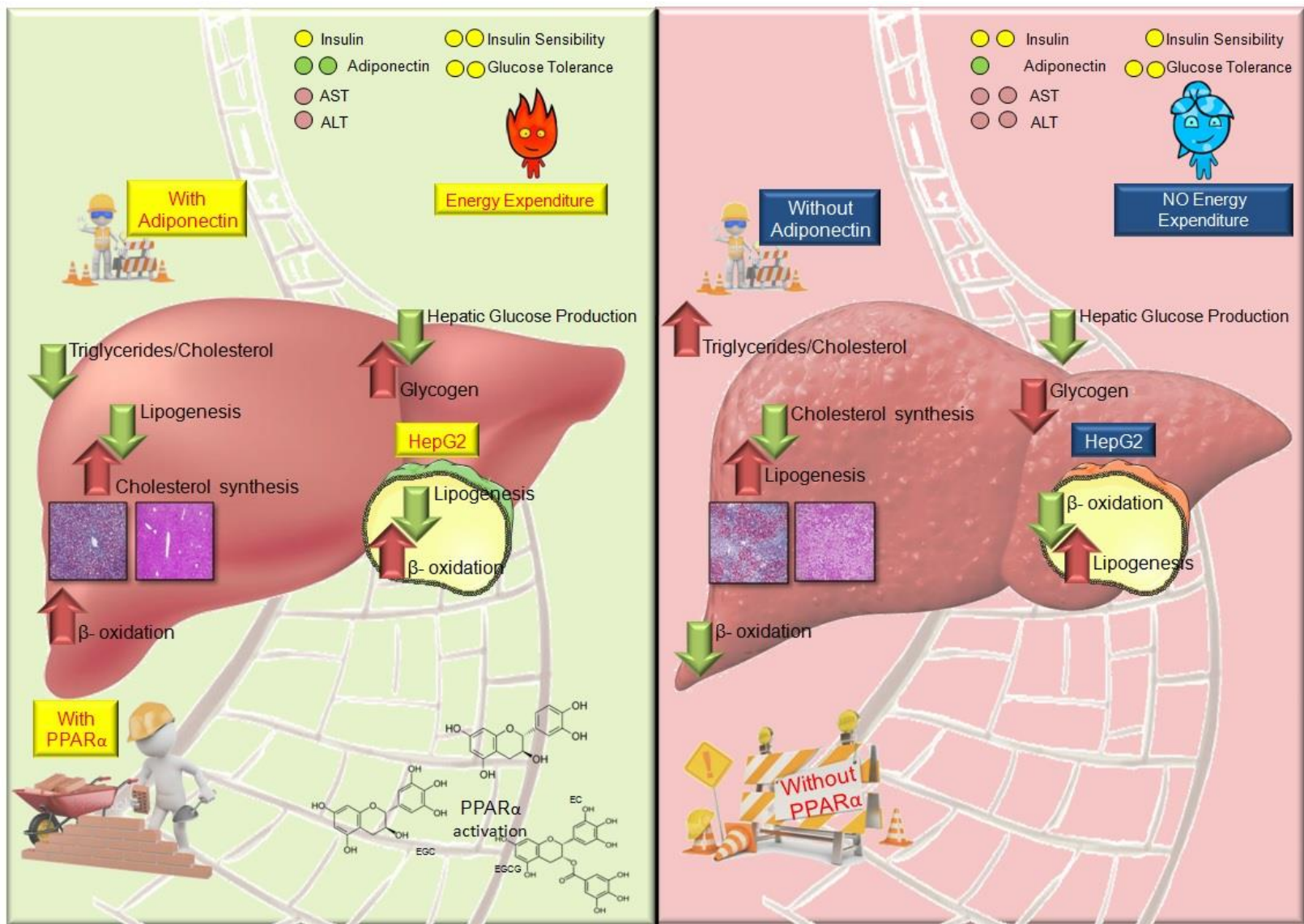
Apesar dos depósitos adiposos estarem no centro das investigações acerca da indução do gasto energético e na regulação da perda de peso (You *et al.*, 2020), o fígado, como discutido até aqui pode ser considerado um importante integrante neste processo (Abumrad, 2017). O órgão hepático, têm sido descrito por atuar diretamente nos níveis de insulina, por ser o principal indutor do *clearance* deste hormônio no organismo (Matsubayashi *et al.*, 2018). A manutenção da sinalização da insulina é responsável pelo aumento da saída de ácidos graxos sob a forma de VLDL e acil-carnitinas que serve como substrato para a termogênese induzida pelo tecido adiposo marrom (Abumrad, 2017) em resposta a ativação do fator de transcrição hepático 4(HNF-4) e as oscilações nos níveis de insulina circulante.

Com base no que foi discutido podemos afirmar que o tratamento com GT apresentou resultados diferentes dependendo da presença ou ausência da adiponectina. Os animais Wild-type induzidos à obesidade que receberam o tratamento com GT (HFD+GT Wild-Type) apresentaram redução no ganho de peso associado à um aumento agudo no gasto energético. Observamos também que o tratamento melhorou a tolerância a glicose, associado a diminuição da produção hepática de glicose associado à melhora da sensibilidade à insulina e diminuição da esteatose hepática. Por outro lado, os animais AdipoKO induzidos à obesidade e que

receberam o tratamento com GT (HFD+GT AdipoKO) não apresentaram perda de peso, assim como houve ausência do aumento agudo do gasto energético. Apesar da tolerância à glicose e a redução na produção hepática de glicose apresentarem melhora, a sensibilidade à insulina, assim como a esteatose hepática não foram recuperadas pelo tratamento com GT (Figura 27).

Os efeitos *in vitro* em células hepáticas (HepG2) evidenciaram que as catequinas agem diminuindo a deposição de lipídios de forma independente do AdipoR2, porém foram dependentes de PPAR $\alpha$ . Adicionalmente observamos que a EGC e a EC foram capazes de ativar diretamente o fator de transcrição PPAR $\alpha$  (Figura 27).

**Figura 27:** Representação gráfica dos resultados obtidos a partir do tratamento crônico com GT em animais selvagens e AdipoKO e células HepG2 tratadas com as catequinas do GT em condições de antagonismo de PPAR $\alpha$ .



## 6.0. CONCLUSÃO

---

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que a melhora, induzida pelo GT, da resistência à insulina e da NAFLD, através da indução do gasto energético e de vias oxidativas hepáticas é dependente de adiponectina, enquanto que a ação das catequinas provavelmente ocorre pela indução do PPAR $\alpha$ , bloqueando vias lipogênicas e induzindo vias de beta oxidação em células HepG2.



## 7.0. REFERENCIAS

ABUMRAD, N. A. The liver as a Hub in Thermogenesis. **Cell metabolism**, v. 26, n. 3, p. 454-455, 2017. ISSN 1550-4131.

ACHARI, A. E.; JAIN, S. K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1321, 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486142/>>.

ADAMIA, N. et al. Effect of metformin therapy on plasma adiponectin and leptin levels in obese and insulin resistant postmenopausal females with type 2 diabetes. **Georgian Med News**, n. 145, p. 52-5, Apr 2007. ISSN 1512-0112 (Print) 1512-0112 (Linking).

AHMAD, F. S. et al. Hypertension, obesity, diabetes, and heart failure—free survival: the cardiovascular disease lifetime risk pooling project. **JACC: Heart Failure**, v. 4, n. 12, p. 911-919, 2016. ISSN 2213-1779.

ALI, R.; CUSI, K. New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Annals of medicine**, v. 41, n. 4, p. 265-278, 2009. ISSN 0785-3890.

AMBADE, A. et al. Pharmacological inhibition of CCR2/5 signaling prevents and reverses alcohol-induced liver damage, steatosis, and inflammation in mice. **Hepatology**, v. 69, n. 3, p. 1105-1121, 2019. ISSN 0270-9139.

AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, n. 0, 2014. ISSN 0026-0495. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049514001115>>.

ANDRADE, J. M. et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 915-9, Jul-Aug 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking).

ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 1, p. 1-16, 2006. ISSN 0959-9673 1365-2613. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2517349/>>.

ARNER, P. et al. Screening of potential adipokines identifies S100A4 as a marker of pernicious adipose tissue and insulin resistance. **International Journal of Obesity**, p. 1, 2018. ISSN 1476-5497.

ASHCROFT, F. M. Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. **Horm Metab Res**, v. 28, n. 9, p. 456-63, Sep 1996. ISSN 0018-5043 (Print) 0018-5043 (Linking).

ASSINI, J. M. et al. Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 2087-2102, 2015. ISSN 0013-7227.

AYINA, C. N. A. et al. Association of serum leptin and adiponectin with anthropomorphic indices of obesity, blood lipids and insulin resistance in a Sub-Saharan African population. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 96, 2016. ISSN 1476-511X.

BALSAN, G. A. et al. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 1, p. 72-80, 2015. ISSN 0104-4230.

BARGUT, T. C. L. et al. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. **Lipids**, v. 49, n. 5, p. 431-444, 2014. ISSN 0024-4201.

BARUTEAU, J. et al. Clinical and biological features at diagnosis in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: a French pediatric study from 187 patients. Complementary data. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 37, n. 1, p. 137-139, 2014. ISSN 0141-8955.

BERG, A. H. et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 947-53, Aug 2001. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).

BHAT, M. et al. Antidiabetic Properties of Azardirecta indica and Bougainvillea spectabilis: In Vivo Studies in Murine Diabetes Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep033>>.

BJØRNDAL, B. et al. Associations between fatty acid oxidation, hepatic mitochondrial function, and plasma acylcarnitine levels in mice. **Nutrition & metabolism**, v. 15, p. 10-10, 2018. ISSN 1743-7075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422939>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5789604/>>.

BLEAU, C. et al. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 31, n. 6, p. 545-561, 2015. ISSN 1520-7560.

BLÜHER, M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? **Clinical science**, v. 130, n. 18, p. 1603-1614, 2016. ISSN 0143-5221.

BOGL, L. H. et al. Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach. **Metabolism**, v. 65, n. 3, p. 111-121, 2016. ISSN 0026-0495. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049515003339>>.

BOLIN, A. P. et al. Polyphenol-rich green tea extract induces thermogenesis in mice by a mechanism dependent on adiponectin signaling. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 78, p. 108322, 2020. ISSN 0955-2863.

BONNET, F. et al. Liver enzymes are associated with hepatic insulin resistance, insulin secretion, and glucagon concentration in healthy men and women. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1660-1667, 2011. ISSN 0012-1797.

BOON, H. et al. Intravenous AICAR administration reduces hepatic glucose output and inhibits whole body lipolysis in type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 51, n. 10, p. 1893-900, Oct 2008. ISSN 0012-186X (Print)  
0012-186X (Linking).

BOSCHMANN, M.; THIELECKE, F. The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. **J Am Coll Nutr**, v. 26, n. 4, p. 389S-395S, Aug 2007. ISSN 0731-5724 (Print)  
0731-5724 (Linking).

BOUDEAU, J.; SAPKOTA, G.; ALESSI, D. R. LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. **FEBS Lett**, v. 546, n. 1, p. 159-65, Jul 03 2003. ISSN 0014-5793 (Print)  
0014-5793 (Linking).

BOURSEREAU, R. et al. New targets to alleviate skeletal muscle inflammation: role of microRNAs regulated by adiponectin. **Scientific reports**, v. 7, p. 43437, 2017. ISSN 2045-2322.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BREHM, A. et al. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 136-140, 2006. ISSN 0012-1797.

BRUNT, E. M. et al. The NAS and The Histopathologic Diagnosis in NAFLD: Distinct Clinicopathologic Meanings. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 53, n. 3, p. 810-820, 2011. ISSN 0270-9139

1527-3350.

Disponível

em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079483/>>.

BUECHLER, C.; WANNINGER, J.; NEUMEIER, M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 23, p. 2801-11, Jun 21 2011. ISSN 2219-2840 (Electronic)  
1007-9327 (Linking).

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016. ISSN 0026-0495.

BYRNE, C. D. et al. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 7, p. 539-64, Apr 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking).

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 1, p. S47-S64, 2015. ISSN 0168-8278.

CAMACHO, R. C. et al. Energy state of the liver during short-term and exhaustive exercise in C57BL/6J mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 3, p. E405-8, Mar 2006. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking).

CHANG, C.-S. et al. Role of adiponectin gene variants, adipokines and hydrometry-based percent body fat in metabolically healthy and abnormal obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 12, n. 1, Supplement 1, p. 49-61, 2018/01/01/2018. ISSN 1871-403X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871403X1630031X>>.

CHANG, L.; CHIANG, S.-H.; SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Molecular Medicine**, v. 10, n. 7-12, p. 65-71, Jul-Dec 2004. ISSN 1076-1551 1528-3658. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1431367/>>.

CHEN, H. et al. Ca<sup>2+</sup>-regulated cyclic electron flow supplies ATP for nitrogen starvation-induced lipid biosynthesis in green alga. **Scientific reports**, v. 5, p. 15117, 2015. ISSN 2045-2322.

CHEN, J. et al. Wogonin mitigates nonalcoholic fatty liver disease via enhancing PPAR $\alpha$ /AdipoR2, in vivo and in vitro. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 621-631, 2017. ISSN 0753-3322.

CHEN, Q.; GUO, Z.; ZHAO, J. Identification of green tea's (*Camellia sinensis* (L.)) quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 5, p. 1321-1325, 2008. ISSN 0731-7085.

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. **Int J Cardiol**, v. 108, n. 3, p. 301-8, Apr 14 2006. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273 (Linking).

CHIEN, M.-Y. et al. Effects of herbal mixture extracts on obesity in rats fed a high-fat diet. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 594-601, 2016. ISSN 1021-9498. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300357>>.

CHOI, S. R. et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon decreased ceramide, and lipotoxicity, and ameliorated diabetic nephropathy. **Metabolism**, v. 85, p. 348-360, 2018. ISSN 0026-0495.

COMBS, T. P.; MARLISS, E. B. Adiponectin signaling in the liver. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 15, n. 2, p. 137-47, Jun 2014. ISSN 1573-2606 (Electronic) 1389-9155 (Linking).

COOKE, A. A. et al. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 207-214, 2016. ISSN 0014-2999.

COOPER, C. E. et al. A hydrogen-donating monohydroxamate scavenges ferryl myoglobin radicals. **Free Radic Res**, v. 20, n. 4, p. 219-27, Apr 1994. ISSN 1071-5762 (Print) 1029-2470 (Linking).

COUTURIER, K. et al. Cinnamon increases liver glycogen in an animal model of insulin resistance. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 60, n. 11, p. 1590-1597, 2011. ISSN 0026-0495.

CRESPY, V.; WILLIAMSON, G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3431S-3440S, 2004. ISSN 0022-3166.

\_\_\_\_\_. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. **J Nutr**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3431S-3440S, Dec 2004. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking).

CRYER, A.; JONES, H. M. The early development of white adipose tissue. Effects of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue cellularity during the first four weeks of life in the rat. **Biochem J**, v. 178, n. 3, p. 711-24, Mar 15 1979. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

CSALA, M. et al. Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. **FEBS letters**, v. 581, n. 8, p. 1693-1698, 2007. ISSN 0014-5793.

DAVISON, P.; COHLE, S. Histologic detection of fat emboli. **Journal of Forensic Science**, v. 32, n. 5, p. 1426-1430, 1987. ISSN 0022-1198.

DE MENDONÇA, M. et al. Adiponectin is required for pioglitazone-induced improvements in hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 493, p. 110480, 2019/08/01/ 2019. ISSN 0303-7207. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720719301820>>.

DELWING-DAL MAGRO, D. et al. Protective effect of green tea extract against proline-induced oxidative damage in the rat kidney. **Biomedicine**

**&Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1422-1427, 2016. ISSN 0753-3322. Disponível em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221630645X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221630645X)>.

DERUSSI, A. et al. Evaluation of glucose and lactate production by canine luteal cells in early cyclic and gestational diestrus. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 569-569, 2015. ISSN 1984-3143.

DIETRICH, P.; HELLERBRAND, C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 637-653, 2014. ISSN 1521-6918.

DING, J. et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARalpha expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Sci Rep**, v. 5, p. 13729, Sep 02 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic)  
2045-2322 (Linking).

DING, L. et al. Curcumin rescues high fat diet-induced obesity and insulin sensitivity in mice through regulating SREBP pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 304, p. 99-109, 2016. ISSN 0041-008X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X1630117X>>.

DING, Y. et al. Association of homeostasis model assessment of insulin resistance, adiponectin, and low-grade inflammation with the course of the metabolic syndrome. **Clinical biochemistry**, v. 48, n. 7-8, p. 503-507, 2015. ISSN 0009-9120.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35081178>>.

DOSTAL, A. M. et al. Green tea extract and catechol-O-methyltransferase genotype modify fasting serum insulin and plasma adiponectin concentrations in a randomized controlled trial of overweight and obese postmenopausal women. **The Journal of nutrition**, v. 146, n. 1, p. 38-45, 2016. ISSN 0022-3166.

DUBOIS, V. et al. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 4, p. 1202-1214, 2017. ISSN 0021-9738.

DULLOO, A. G. et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 6, p. 1040-5, Dec 1999. ISSN 0002-9165 (Print)  
0002-9165 (Linking).

EISSING, L. et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- $\beta$  and metabolic health. **Nature communications**, v. 4, p. 1528, 2013. ISSN 2041-1723.

ESMAILI, S.; HEMMATI, M.; KARAMIAN, M. Physiological role of adiponectin in different tissues: a review. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 67-73, 2020. ISSN 1381-3455.

ESPOSITO, K. et al. Effect of rosiglitazone on endothelial function and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 29, n. 5, p. 1071-1076, 2006. ISSN 0149-5992.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-89, Feb 2010. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking).

FASSHAUER, M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 7, p. 461-470, 2015. ISSN 0165-6147.

FERRE, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. s2, p. 83-92, 2010. ISSN 1463-1326.

FERREIRA, L. T. et al. Green tea polyphenols positively impact hepatic metabolism of adiponectin-knockout lean mice. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103679, 2020. ISSN 1756-4646.

FISHER, F. M. et al. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. **Horm Metab Res**, v. 34, n. 11-12, p. 650-4, Nov-Dec 2002. ISSN 0018-5043 (Print) 0018-5043 (Linking).

FONTENELLE, L. C. et al. The role of selenium in insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 2018. ISSN 1984-8250.

FOTBOLCU, H.; ZORLU, E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 16, p. 4079-4090, 2016. ISSN 1007-9327 2219-2840. Disponible em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837427/>.

FRANCQUE, S. et al. PPARalpha gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, v. 63, n. 1, p. 164-73, Jul 2015. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking).

FRIEDMAN, M. I. Obesity and the hepatic control of feeding behavior. **Drug News Perspect**, v. 20, n. 9, p. 573-8, Nov 2007. ISSN 0214-0934 (Print) 0214-0934 (Linking).

FRUEBIS, J. et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 2005-10, Feb 13 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

FRÜHBECK, G. et al. Regulation of adipocyte lipolysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 63-93, 2014. ISSN 0954-4224. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/article/regulation-of-adipocyte-lipolysis/08D91A549DE1C469D6265EDB5985B95A>>.

GEAGEA, A. G. et al. Adiponectin and Inflammation in health and disease: An update. **Open Medicine Journal**, v. 5, n. 1, 2018.

GEROLIS, L. G. L. et al. Effect of gamma radiation on antioxidant capacity of green tea, yerba mate, and chamomile tea as evaluated by different methods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 130, p. 177-185, 2017. ISSN 0969-806X. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X16302742](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X16302742)>.

GHADGE, A. A.; KHAIRE, A. A.; KUVALEKAR, A. A. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 39, p. 151-158, Feb 2018. ISSN 1879-0305 (Electronic) 1359-6101 (Linking).

GIBELLINI, L. et al. Natural compounds modulating mitochondrial functions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. ISSN 1741-427X.

GOLAY, A.; BOBBIONI, E. The role of dietary fat in obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 21 Suppl 3, p. S2-11, Jun 1997.

GONDOIN, A. et al. Identification of insulin-sensitizing molecules acting by disrupting the interaction between the Insulin Receptor and Grb14. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16901, 2017. ISSN 2045-2322.

GROSS, B. et al. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 36, 2017a. ISSN 1759-5037.

\_\_\_\_\_. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 36-49, 2017/01/01 2017b. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.135>>.

GROUP, A. S. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 17, p. 1563-1574, 2010. ISSN 0028-4793.

GULCELİK, N. E. et al. Serum vaspin levels in type 2 diabetic women in relation to microvascular complications. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 1, p. 65-70, Jan 2009. ISSN 1479-683X (Electronic) 0804-4643 (Linking).

GUNDIMEDA, U. et al. Polyphenols from green tea prevent antineurotogenic action of Nogo-A via 67-kD a laminin receptor and hydrogen peroxide. **Journal of neurochemistry**, v. 132, n. 1, p. 70-84, 2015. ISSN 0022-3042.

HAGENFELDT, L. et al. Uptake of individual free fatty acids by skeletal muscle and liver in man. **J Clin Invest**, v. 51, n. 9, p. 2324-30, Sep 1972. ISSN 0021-9738 (Print)



0021-9738 (Linking).

HARDIE, D. G.; PAN, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. **Biochem Soc Trans**, v. 30, n. Pt 6, p. 1064-70, Nov 2002. ISSN 0300-5127 (Print)  
0300-5127 (Linking).

HARDY, O. T.; CZECH, M. P.; CORVERA, S. What causes the insulin resistance underlying obesity? **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 19, n. 2, p. 81-87, 2012. ISSN 1752-296X  
1752-2978. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038351/>>.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr Res Rev**, v. 23, n. 2, p. 270-99, Dec 2010. ISSN 1475-2700 (Electronic)  
0954-4224 (Linking).

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 8, n. 1, p. 35, 2011. ISSN 1759-5053.

HENNING, S. M. et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6, p. 1558-64, Dec 2004. ISSN 0002-9165 (Print)  
0002-9165 (Linking).

HOEKSTRA, L. T. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. **Ann Surg**, v. 257, n. 1, p. 27-36, Jan 2013. ISSN 1528-1140 (Electronic)  
0003-4932 (Linking).

HOJLUND, K. et al. Reduced plasma adiponectin concentrations may contribute to impaired insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1283-91, Jun 2006. ISSN 0012-186X (Print)  
0012-186X (Linking).

HOSCH, S. E.; OLEFSKY, J. M.; KIM, J. J. APPLIED mechanics: Uncovering how adiponectin modulates insulin action. **Cell metabolism**, v. 4, n. 1, p. 5-6, 2006/07/01/2006. ISSN 1550-4131. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413106002063>>.

HOUTEN, S. M.; WANDERS, R. J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 33, n. 5, p. 469-477, 2010. ISSN 0141-8955.

HSU, P.-S. et al. Leptin Promotes cPLA<sub>2</sub> Gene Expression through Activation of the MAPK/NF- $\kappa$ B/p300 Cascade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 27640-27658, 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26593914>>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661903/>>.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol Chem**, v. 271, n. 18, p. 10697-703, May 3 1996. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258 (Linking).

HUI, J. M. et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 46-54, Jul 2004. ISSN 0270-9139 (Print)  
0270-9139 (Linking).

HURSEL, R. et al. The effects of catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: a meta-analysis. **Obes Rev**, v. 12, n. 7, p. e573-81, Jul 2011. ISSN 1467-789X (Electronic)  
1467-7881 (Linking).

IRIMIA, J. M. et al. Impaired glucose tolerance and predisposition to the fasted state in liver glycogen synthase knock-out mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12851-12861, 2010. ISSN 0021-9258.

ISHTIAQ, S. M. et al. Adiponectin and PPAR: a setup for intricate crosstalk between obesity and non-alcoholic fatty liver disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 20, n. 3, p. 253-261, 2019. ISSN 1389-9155.

ISOMAA, B. et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, n. 4, p. 683-9, Apr 2001. ISSN 0149-5992 (Print)  
0149-5992 (Linking).

IZADI, V.; LARIJANI, B.; AZADBAKHT, L. Is coffee and green tea consumption related to serum levels of adiponectin and leptin? **International journal of preventive medicine**, v. 9, 2018.

JANG, H.-J.; RIDGEWAY, S. D.; KIM, J.-A. Effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on high-fat diet-induced insulin resistance and endothelial dysfunction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 12, p. E1444-E1451, 2013. ISSN 0193-1849.

JANSSENS, P. L.; HURSEL, R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Long-term green tea extract supplementation does not affect fat absorption, resting energy expenditure, and body composition in adults. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 5, p. 864-870, 2015. ISSN 0022-3166.

JERBY, L.; SHLOMI, T.; RUPPIN, E. Computational reconstruction of tissue-specific metabolic models: application to human liver metabolism. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 401, 2010. ISSN 1744-4292.

JERNÅS, M. et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1540-1542, 2006. ISSN 0892-6638.

Jl, G. et al. Resveratrol ameliorates hepatic steatosis and inflammation in methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis through regulating autophagy. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 134, 2015. ISSN 1476-511X.

JOHNSON, A. R. et al. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 2, p. 545-550, 2016. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X16304260>>.

JUNG, U. J.; CHOI, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013623/>>.

KADOWAKI, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1784-92, Jul 2006. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

KATSIKI, N.; MANTZOROS, C.; MIKHAILIDIS, D. P. Adiponectin, lipids and atherosclerosis. **Current opinion in lipidology**, v. 28, n. 4, p. 347-354, 2017. ISSN 0957-9672.

KAWAGUCHI, T. et al. Insulin resistance and chronic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 3, n. 5, p. 99-107, 2011. ISSN 1948-5182. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731901>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3124882/>>.

KIM, J. J. Y. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhance glycogen synthesis and inhibit lipogenesis in hepatocytes. **BioMed research international**, v. 2013, p. 920128-920128, 2013. ISSN 2314-6141 2314-6133. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066304>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3771263/>>.

KIM, Y. et al. The adiponectin receptor agonist AdipoRon ameliorates diabetic nephropathy in a model of type 2 diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 4, p. 1108-1127, 2018. ISSN 1046-6673.

KITADE, H. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 387, 2017. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420094>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5409726/>>.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871-1882, 2014/12/01/ 2014. ISSN 1359-6446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135964461400333X>>.

KOZYRA, M. et al. Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. ISSN 2045-2322.

KRAUS, N. A. et al. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. **Adipocyte**, v. 5, n. 4, p. 351-358, Oct-Dec 2016. ISSN 2162-3945 2162-397X. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5160397/>>.

KUWABARA, M. et al. "Metabolically Healthy" obesity and hyperuricemia increase risk for hypertension and diabetes: 5-year Japanese Cohort Study. **Obesity**, v. 25, n. 11, p. 1997-2008, 2017. ISSN 1930-7381.

LAMBERT, J. E. et al. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 726-735, 2014. ISSN 0016-5085.

LEE, J. et al. Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. **Cell reports**, v. 16, n. 1, p. 201-212, 2016. ISSN 2211-1247. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27320917> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4927362/>>.

LEFEBVRE, P. J. Glucagon and Adipose Tissue Lipolysis. In: LEFEBVRE, P. J. (Ed.). **Glucagon I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983. p.419-440. ISBN 978-3-642-68866-9.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPAR $\gamma$ . **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993-999, 2005. ISSN 0092-8674.

LEIHERER, A. et al. Quercetin Impacts Expression of Metabolism- and Obesity-Associated Genes in SGBS Adipocytes. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 282, 2016. ISSN 2072-6643. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4882695/>>.

LEUNG, C. et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n.7, p. 412, 2016. ISSN 1759-5053.

LI, J. et al. Green tea extract treatment reduces NF $\kappa$ B activation in mice with diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by lowering TNFR1 and TLR4 expression and ligand availability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 41, p. 34-41, 2017. ISSN 0955-2863. Disponible em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316304715>>.

LI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3441-3446, 2010. ISSN 0027-8424.

LIANG, W. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115922-

e115922, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25535951>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275274/>>.

LIHN, A. S. et al. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. **Mol Cell Endocrinol**, v. 219, n. 1-2, p. 9-15, Apr 30 2004. ISSN 0303-7207 (Print)  
0303-7207 (Linking).

LIHN, A. S.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. **Obes Rev**, v. 6, n. 1, p. 13-21, Feb 2005. ISSN 1467-7881 (Print)  
1467-7881 (Linking).

LIQUORI, G. E. et al. An innovative methodology for the automated morphometric and quantitative estimation of liver steatosis. **Histology and histopathology**, 2009. ISSN 0213-3911.

LISS, K. H.; FINCK, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimie**, v. 136, p. 65-74, 2017. ISSN 0300-9084.

LIU, M.; LIU, F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. **Biochem J**, v. 425, n. 1, p. 41-52, Dec 14 2009. ISSN 1470-8728 (Electronic)  
0264-6021 (Linking).

LIU, X. et al. Adiponectin administration prevents weight gain and glycemic profile changes in diet-induced obese immune deficient Rag1 $\Delta$  mice lacking mature lymphocytes. **Metabolism - Clinical and Experimental**, v. 65, n. 12, p. 1720-1730, 2016. ISSN 0026-0495. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.09.003>>. Acesso em: 2018/04/13.

LIU, Y. et al. Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high-fat diet feeding in mice. **Diabetes**, v. 64, n. 1, p. 36-48, 2015. ISSN 0012-1797.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)  
1046-2023 (Linking).

LONDON, R. M.; GEORGE, J. Pathogenesis of NASH: animal models. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 1, p. 55-74, 2007. ISSN 1089-3261.

LUUKKONEN, P. K. et al. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1167-1175, 2016. ISSN 0168-8278.

MA, K. et al. Increased  $\beta$ -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 34658-34661, 2002. ISSN 0021-9258.

MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: a dangerous quartet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 481, 2016.

MAEDA, K. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 221, n. 2, p. 286-9, Apr 16 1996. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

MAHER, J. J. Modeling fatty liver disease in animals: Is there an optimal approach, and is the effort worthwhile? **Hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1398-1400, 2016. ISSN 0270-9139.

MAKI, K. C. et al. Postprandial metabolism with 1,3-diacylglycerol oil versus equivalent intakes of long-chain and medium-chain triacylglycerol oils. **Nutrition**, v. 25, n. 6, p. 627-33, Jun 2009. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking).

MANCO, M. Insulin Resistance and NAFLD: A Dangerous Liaison beyond the Genetics. **Children**, v. 4, n. 8, p. 74, 2017. ISSN 2227-9067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5575596/>>.

MARINOVIC, M. P.; MORANDI, A. C.; OTTON, R. Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFkappaB p65 signal pathway. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1766-78, Oct 2015. ISSN 1879-3177 (Electronic) 0887-2333 (Linking).

MATSUBARA, M.; MARUOKA, S.; KATAYOSE, S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. **Eur J Endocrinol**, v. 147, n. 2, p. 173-80, Aug 2002. ISSN 0804-4643 (Print) 0804-4643 (Linking).

MATSUBAYASHI, Y. et al. Role of fatty liver in the association between obesity and reduced hepatic insulin clearance. **Diabetes & metabolism**, v. 44, n. 2, p. 135-142, 2018. ISSN 1262-3636.

MCPHERSON, S. et al. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 5, p. 1148-1155, 2015. ISSN 0168-8278.

MEEH, R. C. et al. Fetuin B is a secreted hepatocyte factor linking steatosis to impaired glucose metabolism. **Cell metabolism**, v. 22, n. 6, p. 1078-1089, 2015. ISSN 1550-4131.

MEISTER, B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. **Vitam Horm**, v. 59, p. 265-304, 2000. ISSN 0083-6729 (Print) 0083-6729 (Linking).

MIQUILENA-COLINA, M. E. et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Gut**, p. gut. 2010.222844, 2011. ISSN 0017-5749.

MISRA, A. et al. Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. **Obes Res**, v. 5, n. 2, p. 93-9, Mar 1997. ISSN 1071-7323 (Print) 1071-7323 (Linking).

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 289645, 2010. ISSN 0962-9351 1466-1861. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913796/>>.

MORIOKA, T. et al. Leptin is associated with vascular endothelial function in overweight patients with type 2 diabetes. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, p. 10-10, 2014. ISSN 1475-2840. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24410779> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893526/>>.

MORRISON, R. F.; FARMER, S. R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. **J Nutr**, v. 130, n. 12, p. 3116S-3121S, Dec 2000. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking).

MOSER, S. et al. The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols. **Food Research International**, v. 66, p. 297-305, 2014. ISSN 0963-9969. Disponível em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914006188](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914006188)>.

MOTAWI, T. K. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Obesity and Colorectal Cancer: the Role of Epigenetics. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10714-10714, 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28878369> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587696/>>.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113-R127, 2014. ISSN 0022-0795.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 6 Suppl, p. 1698S-702S; discussion 1703S-4S, Jun 2000. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking).

MUOIO, D. M. et al. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. **Biochem J**, v. 338 ( Pt 3), p. 783-91, Mar 15 1999. ISSN 0264-6021 (Print)  
0264-6021 (Linking).

NAGASAWA, T. et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPAR $\delta$  agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine-and choline-deficient diet. **European journal of pharmacology**, v. 536, n. 1-2, p. 182-191, 2006. ISSN 0014-2999.

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21240-57, Oct 24 2013. ISSN 1422-0067 (Electronic)  
1422-0067 (Linking).

NAKANO, S. et al. Bezafibrate prevents hepatic stellate cell activation and fibrogenesis in a murine steatohepatitis model, and suppresses fibrogenic response induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 in a cultured stellate cell line. **Hepatology Research**, v. 38, n. 10, p. 1026-1039, 2008. ISSN 1386-6346.

NAKANO, Y. et al. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. **J Biochem**, v. 120, n. 4, p. 803-12, Oct 1996. ISSN 0021-924X (Print)  
0021-924X (Linking).

NAM, M. et al. Effect of green tea on hepatic lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 51, p. 1-7, 2018. ISSN 0955-2863.

NAUKKARINEN, J. et al. Characterising metabolically healthy obesity in weight-discordant monozygotic twins. **Diabetologia**, v. 57, n. 1, p. 167-76, Jan 2014. ISSN 1432-0428 (Electronic)  
0012-186X (Linking).

NCUBE, N.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008. ISSN 1684-5315.

NEGISHI, H. et al. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J Nutr**, v. 134, n. 1, p. 38-42, Jan 2004. ISSN 0022-3166 (Print)  
0022-3166 (Linking).

NEUMEIER, M. et al. Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 334, n. 3, p. 924-9, Sep 02 2005. ISSN 0006-291X (Print)  
0006-291X (Linking).



\_\_\_\_\_. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 350, n. 3, p. 731-5, Nov 24 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. et al. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- $\gamma$  ligand rosiglitazone. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 1008-1017, 2003. ISSN 0270-9139.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016. ISSN 0163-3864.

NIGRO, E. et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 658913, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic).

OGUNDELE, O. E. et al. Association of adiponectin gene (ADIPOQ) polymorphisms with measures of obesity in Nigerian young adults. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 19, n. 2, p. 123-127, 2018/04/01/ 2018. ISSN 1110-8630. Disponible em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110863017300770>.

OHASHI, K. et al. Adiponectin as a target in obesity-related inflammatory state. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 15, n. 2, p. 145-150, 2015. ISSN 1871-5303.

OKUNO, A. et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 6, p. 1354-1361, 1998. ISSN 0021-9738.

ORCHARD, T. J. et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1374-9, May 2003. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking).

OTTON, R. et al. Polyphenol-rich green tea extract improves adipose tissue metabolism by down-regulating miR-335 expression and mitigating insulin resistance and inflammation. **The Journal of nutritional biochemistry**, 2018/04/07/ 2018. ISSN 0955-2863. Disponible em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286317308902>.

OZTURK, Y.; SOYLU, O. B. Fatty liver in childhood. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2014. ISSN 1948-5182. Disponible em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953806/>.

PADIYA, R. et al. Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, p. 53, Jul 27 2011. ISSN 1743-7075 (Electronic)

1743-7075 (Linking).

PARK, H. M. et al. A System for In Vivo Imaging of Hepatic Free Fatty Acid Uptake. **Gastroenterology**, v. 152, n. 1, p. 78-81 e2, Jan 2017. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking).

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 3, p. 720-733, 2015. ISSN 0168-8278.

PETERS, J. M. et al. Bezafibrate is a dual ligand for PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$ : studies using null mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1632, n. 1-3, p. 80-89, 2003. ISSN 1388-1981.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L. A. Up-regulation of PPAR- $\gamma$  mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1424-1430, 2011. ISSN 0021-972X.

PHILLIPS, S. A. et al. Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 4, p. E842-50, Oct 2008. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking).

POLYZOS, S. A. et al. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes Obes Metab**, v. 12, n. 5, p. 365-83, May 2010. ISSN 1463-1326 (Electronic) 1462-8902 (Linking).

POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) activates AMPK through the inhibition of glutamate dehydrogenase in muscle and pancreatic  $\beta$ -cells: A potential beneficial effect in the pre-diabetic state? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 88, p. 220-225, 2017. ISSN 1357-2725.

PROTZER, U.; MAINI, M. K.; KNOLLE, P. A. Living in the liver: hepatic infections. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 3, p. 201-13, Mar 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking).

QI, Y. et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. **Nat Med**, v. 10, n. 5, p. 524-9, May 2004. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).

RAINS, T. M.; AGARWAL, S.; MAKI, K. C. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2011. ISSN 0955-2863. Disponible em: <  
[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286310001609](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286310001609)>.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001. ISSN 0041-0101.

RATZIU, V. et al. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 445-453, 2010. ISSN 0270-9139.

REILLY, M. P. et al. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. **Circulation**, v. 111, n. 7, p. 932-9, Feb 22 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).

REN, J. L. et al. Green tea extract attenuates LPS-induced retinal inflammation in rats. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. ISSN 2045-2322.

RIBEIRO FILHO, H. V. et al. Screening for PPAR non-agonist ligands followed by characterization of a hit, AM-879, with additional no-adipogenic and cdk5-mediated phosphorylation inhibition properties. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 11, 2018. ISSN 1664-2392.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998. ISSN 1476-4687.

ROBERTS, R. et al. Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 882, 2009. ISSN 0012-186X.

ROCHA, A. et al. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 7, p. 2231-44, Oct 2016. ISSN 1436-6215 (Electronic) 1436-6207 (Linking).

ROCHLANI, Y. et al. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 11, n. 8, p. 215-225, 2017/08/01 2017. ISSN 1753-9447. Disponível em: < <https://doi.org/10.1177/1753944717711379> >. Acesso em: 2018/04/25.

ROTHBERG, A. E.; HALTER, J. B. Obesity and Diabetes in an Aging Population: Time to Rethink Definitions and Management? **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1-15, 2015. ISSN 0749-0690. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074906901400086X>>.

ROYCHOUDHURY, S. et al. Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 34, n. 5, p. 487-498, 2017. ISSN 1472-6483.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, 2014. ISSN 0470650710.

S SAHAJPAL, N.; K JAIN, S. Molecular remodeling of the insulin receptor pathway by thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: A brief review. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, n. 9, p. 836-847, 2016. ISSN 0929-8665.

SAAD, M.; SANTOS, A.; PRADA, P. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. **Physiology**, 2016.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. **Cell Metab**, v. 27, n. 1, p. 22-41, Jan 9 2018. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking).

SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. **Drugs of natural origin: A treatise of pharmacognosy**. Stockholm, SE: Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences, 2009, 2017. ISBN 9197651052.

SAVINI, I. et al. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676851/>>.

SCHADINGER, S. E. et al. PPAR $\gamma$ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1195-E1205, 2005. ISSN 0193-1849.

SCHERER, P. E.; LODISH, H. F. **DNA encoding a novel serum protein produced exclusively in adipocytes**: Google Patents 1999.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26746-9, Nov 10 1995. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

SENGUPTA, S. et al. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. **Nature**, v. 468, n. 7327, p. 1100-1104, 2010. ISSN 1476-4687.

SHAN, W. et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) attenuates carbon tetrachloride hepatotoxicity by downregulating proinflammatory gene expression. **Toxicological sciences**, v. 105, n. 2, p. 418-428, 2008. ISSN 1096-6080.

SHAO, W.; ESPENSHADE, P. J. Expanding roles for SREBP in metabolism. **Cell metabolism**, v. 16, n. 4, p. 414-419, 2012. ISSN 1550-4131 1932-7420. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466394/>>.

SHIOMI, Y. et al. A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) $\alpha$  Agonist and PPAR $\gamma$  Antagonist, Z-551, Ameliorates High-fat Diet-induced

Obesity and Metabolic Disorders in Mice. **J Biol Chem**, v. 290, n. 23, p. 14567-81, Jun 05 2015. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking).

SILVA, O. A. et al. GQ-130, a novel analogue of thiazolidinedione, improves obesity-induced metabolic alterations in rats: Evidence for the involvement of PPAR $\beta/\delta$  pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 47, n. 5, p. 798-808, 2020. ISSN 0305-1870.

SIMA, C. et al. Author Correction: ERV1 Overexpression in Myeloid Cells Protects against High Fat Diet Induced Obesity and Glucose Intolerance. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4143, 2018. ISSN 2045-2322.

SINGH, R.; AKHTAR, N.; HAQQI, T. M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. [corrected]. **Life Sci**, v. 86, n. 25-26, p. 907-18, Jun 19 2010. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking).

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 232-8, Apr 2002. ISSN 0944-7113 (Print) 0944-7113 (Linking).

SNIJDER, M. B. et al. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 5, p. 1192-7, May 2003. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking).

SOUSA-FILHO, C. P. B. et al. Green tea improves the metabolism of peripheral tissues in  $\beta$ 3-adrenergic receptor-knockout mice. **Pharmacological Research**, v. 159, p. 104956, 2020/09/01/ 2020. ISSN 1043-6618. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661820312640>>.

\_\_\_\_\_. Green tea improves the metabolism of peripheral tissues in  $\beta$ 3-adrenergic receptor-knockout mice. **Pharmacol Res**, v. 159, p. 104956, May 30 2020. ISSN 1096-1186 (Electronic) 1043-6618 (Linking).

ST-PIERRE, J. et al. Contribution of abdominal obesity and hypertriglyceridemia to impaired fasting glucose and coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 90, n. 1, p. 15-8, Jul 01 2002. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking).

STAELS, B. et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 58, n. 6, p. 1941-1952, 2013. ISSN 0270-9139.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell metabolism**, v. 23, n. 5, p. 770-784, 2016. ISSN 1550-4131 1932-7420. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4864949/>>.

STIENSTRA, R. et al. PPARs, obesity, and inflammation. **PPAR research**, v. 2007, 2007. ISSN 1687-4757.

SUGIURA, C. et al. Catechins and Caffeine Inhibit Fat Accumulation in Mice through the Improvement of Hepatic Lipid Metabolism. **Journal of obesity**, v. 2012, p. 520510-520510, 2012. ISSN 2090-0716 2090-0708. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900152> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3415226/>>.

SUTCLIFFE, A.; POOLE, T. Scent marking and associated behaviour in captive common marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*) with a description of the histology of scent glands. **Journal of Zoology**, v. 185, n. 1, p. 41-56, 1978. ISSN 0952-8369.

TAMURA, S.; SHIMOMURA, I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1139-1142, 2005. ISSN 0021-9738.

TANAKA, T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  induces fatty acid  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15924-15929, 2003. ISSN 0027-8424.

THALER, J. P.; SCHWARTZ, M. W. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4109-15, Sep 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking).

TOMATA, Y. et al. Green Tea Consumption and the Risk of Incident Dementia in Elderly Japanese: The Ohsaki Cohort 2006 Study. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 24, n. 10, p. 881-889, 2016. ISSN 1064-7481. Disponible em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064748116301774](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064748116301774)>.

TOMITA, K. et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 458-473, 2008. ISSN 0270-9139.

TORRES, L. F.; COGLIATI, B.; OTTON, R. Green Tea Prevents NAFLD by Modulation of miR-34a and miR-194 Expression in a High-Fat Diet Mouse Model. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 4168380, 2019. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0900 (Print) 1942-0994 (Linking).

TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. **Endocr Rev**, v. 27, n. 7, p. 762-78, Dec 2006. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking).

\_\_\_\_\_. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 7, p. 762-778, 2006. ISSN 0163-769X.

TSUCHIDA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and their combination. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3358-3370, 2005. ISSN 0012-1797.

TÜRKÖZÜ, D.; TEK, N. A. A minireview of effects of green tea on energy expenditure. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 2, p. 254-258, 2017. ISSN 1040-8398.

UENO, T. et al. Epigallocatechin-3-gallate improves nonalcoholic steatohepatitis model mice expressing nuclear sterol regulatory element binding protein-1c in adipose tissue. **International journal of molecular medicine**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2009. ISSN 1107-3756.

UMPLEBY, A. M. et al. NAFLD exacerbates the effect of dietary sugar on liver fat and development of an atherogenic lipoprotein phenotype. 2016.

UTZSCHNEIDER, K. M.; KAHN, S. E. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 12, p. 4753-4761, 2006. ISSN 0021-972X.

VACCA, M. et al. Fatty acid and glucose sensors in hepatic lipid metabolism: implications in NAFLD. **Semin Liver Dis**, v. 35, n. 3, p. 250-61, 2015.

VAZQUEZ-VELA, M. E.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Arch Med Res**, v. 39, n. 8, p. 715-28, Nov 2008. ISSN 1873-5487 (Electronic) 0188-4409 (Linking).

VEGA, G. L. et al. Free fatty acid metabolism during fenofibrate treatment of the metabolic syndrome. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 3, p. 236-244, 2003. ISSN 0009-9236.

VELAYUTHAM, P.; BABU, A.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 18, p. 1840, 2008.

VIOLLET, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 6, p. 253-70, Mar 2012. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking).

WALKER, J. M. et al. Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response,  $\beta$ -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 100, p. 87-98, 2017. ISSN 0969-9961.

WALTNER-LAW, M. E. et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 34933-34940, 2002. ISSN 0021-9258.

WANG, X. et al. Adiponectin improves NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 33, 2016. ISSN 1476-511X.

WANG, Y.-X. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 159-170, 2003. ISSN 0092-8674.

WANG, Y. et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 $\beta$ /beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. **Cancer Res**, v. 66, n. 23, p. 11462-70, Dec 1 2006. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472 (Linking).

WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adiponectin, the past two decades. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 93-100, 2016. ISSN 1759-4685.

WATRELOT, A. A. et al. Immobilization of flavan-3-ols onto sensor chips to study their interactions with proteins and pectins by SPR. **Applied Surface Science**, v. 371, p. 512-518, 2016. ISSN 0169-4332. Disponível em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016943321630438X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016943321630438X)>.

WATT, M. J. et al. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. **J Mol Endocrinol**, v. 33, n. 2, p. 533-44, Oct 2004. ISSN 0952-5041 (Print)  
0952-5041 (Linking).

WHO. Obesity and overweight. **World Health Organization (WHO)**, 2017.

WIERZBICKI, M. et al. Differential effects of in vivo PPAR alpha and gamma activation on fatty acid transport proteins expression and lipid content in rat liver. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 99-106, Mar 2009. ISSN 1899-1505 (Electronic)  
0867-5910 (Linking).

YAMADA, S. et al. Epigallocatechin-3-O-gallate up-regulates microRNA-let-7b expression by activating 67-kDa laminin receptor signaling in melanoma cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 19225, 2016. ISSN 2045-2322.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 28, n. 1, p. 15-23, 2014. ISSN 1521-690X.

\_\_\_\_\_. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762-9, Jun 12 2003. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking).



\_\_\_\_\_. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nature medicine**, v. 13, n. 3, p. 332-339, 2007. ISSN 1546-170X.

\_\_\_\_\_. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nat Med**, v. 13, n. 3, p. 332-9, Mar 2007. ISSN 1078-8956 (Print)  
1078-8956 (Linking).

YAN, J.; ZHAO, Y.; ZHAO, B. Green tea catechins prevent obesity through modulation of peroxisome proliferator-activated receptors. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 9, p. 804-810, 2013/09/01 2013. ISSN 1869-1889. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4512-2> >.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1190, 2019.

YANG, C. S. et al. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 1, p. 160-174, 2016. ISSN 1613-4125.

YANG, J. et al. Berberine Improves Insulin Sensitivity by Inhibiting Fat Store and Adjusting Adipokines Profile in Human Preadipocytes and Metabolic Syndrome Patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/363845>>.

YANG, L. et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in liver fibrosis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, n. 5, p. G902-G911, 2006. ISSN 0193-1857.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3549-52, Jun 5 2002. ISSN 0021-8561 (Print)  
0021-8561 (Linking).

YONG FENG, W. Metabolism of green tea catechins: an overview. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 7, p. 755-809, 2006. ISSN 1389-2002.

YOU, H. et al. A subpopulation of Bdnf-e1–expressing glutamatergic neurons in the lateral hypothalamus critical for thermogenesis control. **Molecular Metabolism**, v. 31, p. 109-123, 2020. ISSN 2212-8778.

ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2073-2080, 2006. ISSN 0024-3205.

ZHANG, H. et al. Structure of the glucagon receptor in complex with a glucagon analogue. **Nature**, v. 553, p. 106, 2018. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature25153>>.

ZHANG, Y. et al. AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 3, p. E275-E282, 2015. ISSN 0193-1849.

ZHAO, L.-G. et al. Green tea consumption and cause-specific mortality: Results from two prospective cohort studies in China. **Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 36-41, 2017. ISSN 0917-5040. Disponible em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0917504016300478](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0917504016300478)>.

ZIBERNA, L. et al. Chapter 37 - Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. In: WATSON, R. R.;PREEDY, V. R., *et al* (Ed.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. San Diego: Academic Press, 2014. p.489-511. ISBN 978-0-12-398456-2.

ZIEGENFUSS, T. N. et al. Effects of a water-soluble cinnamon extract on body composition and features of the metabolic syndrome in pre-diabetic men and women. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 3, p. 45-53, Dec 28 2006. ISSN 1550-2783 (Electronic) 1550-2783 (Linking).

ZIETZ, B. et al. Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes. **FEBS Lett**, v. 545, n. 2-3, p. 103-4, Jun 19 2003. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking).

ZORENA, K. et al. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3570, 2020.