



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Efeito do consumo do Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no metabolismo de glicose e a inter-relação com as respostas redox e inflamatória, em um modelo de obesidade induzida com dieta hiperlipídica.

ANANDA DE MESQUITA ARAÚJO

Brasília

2023



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Ananda de Mesquita Araújo

Projeto será apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Nutrição Humana.

Área de concentração: Alimentos, dietética e bioquímica aplicada à Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra Fernandes Arruda

Brasília

2023

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Fernandes Arruda

Presidente - Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato

Membro Interno – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Júlio Beltrame Daleprane

Membro Externo – Departamento de Nutrição Básica Experimental – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa de Souza Mello

Membro Externo – Departamento de Anatomia – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Helena Macedo da Costa

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

Brasília

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar meus mais profundos agradecimentos às pessoas que desempenharam papéis cruciais na conclusão deste trabalho. Primeiramente, gostaria de expressar minha sincera gratidão à minha orientadora, Dra. Sandra. Sua paciência, dedicação, orientação e suporte ao longo de todo o período do meu doutorado e mestrado foram inestimáveis. A oportunidade de aprender com sua vasta experiência e sabedoria moldou significativamente meu percurso acadêmico.

Além disso, quero estender meus agradecimentos aos meus pais e ao meu irmão. Seu amor incondicional, apoio constante, compreensão e motivação foram fundamentais em todas as etapas da minha jornada acadêmica e pessoal. Sem eles, esta conquista não seria possível, e sou profundamente grato por sua presença constante em minha vida. Também gostaria de expressar minha sincera gratidão aos amigos que estiveram ao meu lado, me apoiaram e compartilharam momentos especiais durante esses anos desafiadores. Sua amizade foi um pilar essencial que me manteve motivado e confiante em todas as fases deste processo.

Agradeço também os membros do laboratório de bioquímica da nutrição. Compartilhamos conhecimentos, experiências e uma amizade significativa. Quero dedicar um agradecimento especial à Marília, com quem compartilhei não apenas assuntos dos projetos, mas também questões pessoais. Obrigada por criar um ambiente de trabalho colaborativo e agradável, pela ajuda mútua e pelo incentivo constante ao longo do meu doutorado.

Por fim, gostaria de expressar meu apreço ao departamento de nutrição e à universidade por fornecerem os recursos e oportunidades essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico, incluindo a conclusão bem-sucedida do mestrado e doutorado nesta instituição. Estou profundamente grato pela confiança que depositaram em mim, pelo apoio inabalável e pelo incentivo contínuo ao longo desses anos. Mais uma vez, gostaria de agradecer a todos mencionados acima pelo apoio, orientação e encorajamento que me ofereceram em minha jornada acadêmica e profissional.

“Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas.”

[Rubem Alves]

## RESUMO

**Introdução:** A obesidade é um distúrbio metabólico caracterizado pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e associado ao aumento da prevalência de doenças crônicas, especialmente diabetes tipo 2. Componentes dietéticos encontrados em frutas e hortaliças têm sido associados à promoção da saúde e à prevenção e redução da obesidade e complicações metabólicas associadas. Diversos frutos da região do Cerrado brasileiro são fontes de fitoquímicos e apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória. O Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) é um fruto rico em polifenóis, que apresenta alto potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Estudos sugerem uma relação positiva entre os polifenóis e a manutenção da homeostase da glicose, e consequentemente na prevenção de doenças como a resistência a insulina. Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do Tucum-do-Cerrado na homeostase do metabolismo de glicose e as interrelações com o estado redox-inflamatório em um modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. **Metodologia:** 28 ratos machos Wistar com 21 dias de idade foram divididos em quatro grupos e tratados por 56 dias com uma das seguintes dietas: dieta controle (CT) AIN-93G, dieta controle + Tucum-do-cerrado (CT/TUC), dieta AIN-93G contendo 58% de lipídeos (HF) e dieta AIN-93G contendo 58% de lipídeos + Tucum-do-cerrado (HF/TUC). O ganho de peso semanal, consumo diário de dieta e eficiência alimentar foram monitorados durante o período de tratamento. Os níveis séricos de glicose foram determinados utilizando um glicosímetro, os níveis de insulina e citocinas inflamatórias no soro foram avaliados usando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA). O potencial redutor do soro (FRAP), a atividade das enzimas antioxidantes no fígado e intestino e das enzimas do metabolismo de carboidratos no fígado e músculo foram quantificadas por espectrofotometria, assim como a concentração de glicogênio hepático e muscular. Os níveis de mRNA de *Prkaa1*, *Prkaa2*, *Pck1*, *Slc2a2*, *Slc2a4* e *Slc5a1* foram determinados no fígado, músculo ou intestino utilizando o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). Os valores são apresentados como médias quadradas mínimas e intervalo de confiança de 95% (n = 6). Os efeitos da dieta, Tucum-do-Cerrado e interações dieta x Tucum-do-Cerrado, foram analisados utilizando a análise de variância dois fatores (ANOVA). A homogeneidade das variações entre tratamentos foi assumida, e após análise de variância, quando a interação entre os fatores foi significativa (p < 0,05) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O método box plot foi usado para remover os valores discrepantes. Todas as análises foram realizadas utilizando PROC GENMOD no software SAS/STAT® (SAS OnDemand, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e a significância estatística foi estabelecida em p < 0,05. **Resultados:** a dieta hiperlipídica promoveu o aumento do consumo de energia, eficiência alimentar, ganho de peso, glicogênio muscular e hepático, insulina, índices HOMA IR e HOMA β e atividade específica da CAT no intestino, e reduziu o consumo de dieta, a atividade específica das enzimas GR, GPX, GST e SOD no fígado, os níveis de mRNA de *Pck1* no fígado e *Slc5a1* no intestino, comparada a dieta controle. O consumo de Tucum-do-Cerrado associado a dieta hiperlipídica diminuiu o glicogênio hepático, aumentou a atividade da enzima GR no fígado, os níveis de mRNA de *Slc2a2* no fígado e TNF-a no soro, em relação a dieta hiperlipídica. O consumo de Tucum-do-Cerrado diminuiu o glicogênio muscular, a atividade específica da CAT e GPX no intestino, atividade específica das enzimas PFK-1 e HK no músculo, e aumentou a concentração de carbonil hepático e MDA intestinal, a atividade da GST no fígado, potencial antioxidante do soro, atividade da PFK-1 no fígado, níveis de mRNA de *Slc2a2*, *Tnf* e *Il1b* no intestino e de *Prkaa1* e *Slc2a2* no músculo e concentração de IL-6 sérica, independentemente do tipo de dieta. **Conclusão:** O consumo de Tucum-do-Cerrado é capaz de melhorar a utilização de glicose em um modelo de obesidade induzida por dieta HF, através do aumento da captação e oxidação de glicose no fígado e no músculo. Esses dados sugerem que o consumo de Tucum-do-Cerrado melhora a oxidação muscular de glicose em ratos não obesos e obesos. Esta resposta pode estar relacionada à melhora na capacidade antioxidante total no organismo dos ratos.

**Palavras-chave:** obesidade; glicose; metabolismo; Tucum-do-Cerrado; polifenóis; resposta redox; resposta inflamatória.

## ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is a metabolic disorder characterized by excessive body fat and associated with an increased prevalence of chronic diseases, especially type 2 diabetes. Dietary components found in fruits and vegetables have been associated with health promotion and the prevention and reduction of obesity and associated metabolic complications. Several fruits from the Brazilian Cerrado region are sources of phytochemicals and have antioxidant and anti-inflammatory activity. Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a fruit rich in polyphenols, which has a high antioxidant potential *in vitro* and *in vivo*. Studies suggest a positive relationship between polyphenols and the maintenance of glucose homeostasis, and consequently in the prevention of diseases such as insulin resistance. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of Tucum-do-Cerrado on the homeostasis of glucose metabolism and the interrelationships with the redox-inflammatory state in an animal model of high-fat diet-induced obesity. **Methodology:** 28 male Wistar rats aged 21 days were divided into four groups and treated for 56 days with one of the following diets: control diet (CT) AIN-93G; control diet + Tucum-do-cerrado (CT/TUC); AIN-93G diet containing 58% lipids (HF) and AIN-93G diet containing 58% lipids + Tucum-do-cerrado (HF/TUC). Weekly weight gain, daily diet consumption, and feed efficiency were monitored during the treatment period. Serum glucose levels were determined using a glucometer, serum insulin and inflammatory cytokine levels were assessed using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Serum-reducing potential (FRAP), the activity of antioxidant enzymes in the liver and intestine and carbohydrate metabolism enzymes in the liver and muscle were quantified by spectrophotometry, as well as liver and muscle glycogen concentration. Gene mRNA levels *Prkaa1*, *Prkaa2*, *Pck1*, *Slc2a2*, *Slc2a4* and *Slc5a1* mRNA levels were determined in the liver, muscle or intestine using the real-time polymerase chain reaction (qPCR) system. Values are presented as least square means and 95% confidence interval (n = 6). The effects of the diet, Tucum-do-Cerrado, and diet × Tucum-do-Cerrado interactions were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA). Homogeneity of the variances between treatments was assumed, and after variance analysis, when interaction between the factors were significant (p < 0.05) means were compared using Tukey's test. The box plot method was used to remove outliers. All analyses were conducted using PROC GENMOD in the SAS/STAT® software (SAS OnDemand, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and statistical significance was set at p < 0.05. **Results:** The high-fat diet increased energy intake, feed efficiency, body weight, muscle and hepatic glycogen, insulin, HOMA IR and β, and gut CAT activity, and decreased food intake, hepatic GR, GPX, GST and SOD activities, hepatic *Pck1* and intestinal *Slc5a1* mRNA levels, compared to control diet. The high-fat diet with Tucum-do-Cerrado decreased hepatic glycogen, and increased hepatic GR activity, hepatic *Slc2a2* mRNA levels and serum TNFα compared with high-fat diet. Tucum-do-Cerrado decreased muscle glycogen, intestinal CAT and GPX activities, muscle PFK-1 and HK activities, and increased hepatic protein (CARB) and intestinal lipid (MDA) oxidation, hepatic GST activity, serum antioxidant potential (FRAP), hepatic PFK-1 activity, intestinal *Slc2a2*, *Tnf e Il1b* and muscle *Prkaa1 e Slc2a2* mRNA levels and serum IL-6 levels, regardless of diet type. **Conclusion:** Tucum-do-Cerrado consumption may ameliorate impaired glucose utilization in a HF diet-induced obesity model by increasing liver and muscle glucose uptake and oxidation. These data suggest that Tucum-do-Cerrado consumption improves muscle glucose oxidation in non-obese and obese rats. This response may be related to the improvement in the total antioxidant capacity of rats.

**Keywords:** obesity; tucum-do-cerrado; *Bactris Setosa mart*; redox; antioxidants; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1** – Ilustração do fruto Tucum-do-Cerrado. (A) O cacho do Tucum-do-Cerrado; (B) Comparação das partes do fruto Tucum-do-Cerrado e jabuticaba; (C) Similaridade externa do Tucum-do-Cerrado e Jabuticaba, em detalhe, régua em centímetros. Adaptado: DANTAS et al., 2022. Fotos tirada por Marcela Berckmans em 21/02/2015.

**FIGURA 2** – Linha do tempo das etapas do trabalho desenvolvido em cada instância da estratégia.

### CAPÍTULO 2

**FIGURE 1** – Graphical abstract.

**FIGURE 2** – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado on body weight gain of rats during 8-weeks of treatment.

**FIGURE 3** – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption in antioxidant enzymes activity in the liver (A) and small intestine (B) of rats.

**FIGURE 4** – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption in total serum antioxidant capacity of rats Bars without a common letter differ ( $P < 0.05$ ).

**FIGURE 5** – (A) The mRNA levels of Pck1 (PEPCK), Prkaa1 (AMPK- $\alpha$ 1), Prkaa2 (AMPK- $\alpha$ 2) and Slc2a2 (GLUT2) (B) Phosphofruktokinase 1 (PFK1) and Glucose-6-phosphatase (G6Pase) specific activity in the liver of rats treated for 8-weeks with one of the following diets.

**FIGURE 6** – (A) The mRNA levels of Slc5a1 (SGLT1) and Slc2a2 (GLUT2) in the small intestine. (B)  $\alpha$ -Glucosidase specific activity in the small intestine, of rats treated for 8-weeks with one of the following diets.

**FIGURE 7** – (A) The mRNA levels of Prkaa1 (AMPK- $\alpha$ 1), Prkaa2 (AMPK- $\alpha$ 2) and Slc2a2 (GLUT2) and (B) Hexokinase (HK) and phosphofruktokinase (PFK1) specific activity in the muscle of rats treated with one of the following diets.

**FIGURE 8** – The mRNA levels of tumor necrosis alpha (Tnfa) and interleukin 1b (Il1b) in the liver (A) and small intestine (B) of rats treated with one of the following diets.

**FIGURE 9** – Tumor necrosis alpha (TNF) and interleukin-6 (IL-6) serum protein levels of rats fed with one of the following diets.



## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

### **CAPÍTULO 1**

**Table 1 - Primers sequences used for amplification of genes by real-time PCR assays and the GenBank accession numbers.**

### **CAPÍTULO 2**

**Table 1 - Primers sequences used for amplification of genes by real-time PCR assays and the GenBank accession numbers.**

**Table 2 - Physiological and biochemical characteristics of rats fed with control diet (CT), control diet added of Tucum-do-Cerrado (CT/TUC), high fat diet (HF), or high diet added of Tucum-do-Cerrado (HF/TUC).**

**Table 3 – Effect of an 8-week treatment with high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado in hepatic and intestinal oxidative damage in rats.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Actb</i>	gene constitutivo $\beta$ -actina
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
cDNA	DNA complementar
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CT	dieta controle
CT/HF	dieta hiperlipídica + Tucum-do-Cerrado
CT/TUC	dieta controle + Tucum-do-Cerrado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGCG	epigallocatequina-galato
ELISA	ensaio imunoenzimático
EROs	espécies reativas de oxigênio
FRAP	capacidade total de redução férrica
FW	primers direto
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
Gapdh	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GK	glucoquinase
GLY	enzimas $\alpha$ -glucosidase
GLY	$\alpha$ -glucosidase
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GSH	glutationa reduzida
GST	glutationa-S-transferase
HFD	dieta hiperlipídica
HK	hexoquinase
HOMA beta	homeostasis model assessment of $\beta$ -cell function
HOMA IR	homeostasis model assessment for insulin resistance
IL-11	interleucina 6
IL-1 $\beta$	interleucina 1B
IL-6	interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	resistência à insulina
IRS-1	receptor da insulina-1
JNK1/2	c-Jun N-terminal quinase
MDA	Malondialdeído
N <sub>2</sub>	nitrogênio líquido
NF-kB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pck1	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PCR	Proteína C reativa
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxicinase
PFK1	fosfofrutoquinase-1

Prkaa1	subunidade catalítica alfa 1 da proteína quinase ativada por 5'-AMP
Prkaa2	subunidade catalítica alfa 2 da proteína quinase ativada por 5'-AMP
RW	primers reverso
SFA	ácidos graxos saturados
Slc2a2/Glut2	transportador de glicose membro 2 da família 2
Slc2a4/Glut4	transportador de glicose membro 4 da família 2
Slc5a1	cotransportador de glicose membro 1 da família 5
SOD	superóxido dismutase
TAC	capacidade antioxidante total
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral
U	Unidade
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

1.1.	INTRODUÇÃO	17
1.2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.2.1.	Obesidade – epidemiologia, definição e comorbidades.	19
1.2.2.	Obesidade: fisiopatologia, mecanismos inflamatórios e complicações.	21
1.2.3.	Metabolismo de carboidratos.	24
1.2.4.	Polifenóis x metabolismo da glicose x resposta antioxidante e resposta anti-inflamatória.	27
1.3.	OBJETIVOS	32
1.3.1.	Objetivo geral	32
1.3.2.	Objetivos específicos	32
1.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
1.4.1.	Fruto	32
1.4.2.	Animais e dietas	33
1.4.3.	Consumo de ração e ganho de peso	34
1.4.4.	Marcadores do metabolismo de glicose	34
1.4.4.1	Concentração de glicose e insulina	35
1.4.4.2	Concentração de glicogênio hepático e muscular	35
1.4.5.	Danos oxidativos a lipídios (malondialdeído) e proteínas (carbonil)	35
1.4.5.1	Peroxidação lipídica	35
1.4.5.2	Dosagem das proteínas carboniladas	36
1.4.6	Capacidade antioxidante total no soro	36

1.4.6.1	Atividade específica das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutaciona redutase (GR), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) no fígado e intestino delgado.	37
A.	Catalase (CAT)	37
B.	Glutaciona Peroxidase (GPx)	37
C.	Glutaciona redutase (GR)	37
D.	Glutaciona S-transferase (GST)	37
E.	Superóxido Dismutase (SOD)	38
1.4.7.	Atividade enzimática das enzimas $\alpha$ -glucosidase (GLY), glucoquinase (GK) e hexoquinase (HK), glucose-6-phosphatase (G6Pase)	38
A.	Alfa-glicosidade intestinal	39
B.	Glicoquinase e hexoquinase no fígado e músculo	39
C.	Glicose-6-fosfatase no fígado	40
D.	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no fígado	40
E.	Fosfofrutoquinase-1 (PFK1) no fígado e músculo	40
1.4.8	Determinação dos níveis de transcritos de Ppck1 (PEPCK), Prkaa1 e Prkaa2 (AMPK subunidades $\alpha$ 1 e $\alpha$ 2), Slc2a2 (GLUT2), Slc2a4 (GLUT4), Slc5a1 (SGLT1).	41
1.4.8.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA	41
1.4.9	Marcadores inflamatórios	43
1.4.10	Análise estatística	43
	Referências	44
 <b>CAPÍTULO 2</b>		
	Artigo original	53
	ANEXO	87

## **ESTRUTURA DA TESE**

Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: **Capítulo 1**, composto pela introdução, revisão bibliográfica, objetivos e materiais e métodos. Em seguida, **Capítulo 2**, com introdução versão do artigo, os resultados, discussão e conclusão da pesquisa realizada no mestrado estão apresentados em formato de um artigo original, intitulado *"Ameliorating the impairment of glucose utilization in a high-fat diet-induced obesity model through the consumption of Tucum-do-Cerrado (Bactris Setosa Mart.)"*.

## CAPÍTULO 1

### 1.1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um distúrbio metabólico no qual há acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, com crescimento do tecido adiposo, tanto em tamanho quanto em número de células adiposas (HASANI-RANJBAR, JOUYANDEH & ABDOLLAHI, 2013). A relação entre obesidade e distúrbios metabólicos é amplamente determinada pela distribuição de gordura, onde o tecido adiposo visceral ou abdominal é considerado mais prejudicial ao metabolismo do que a deposição de gordura periférica (SERGI et al, 2019; de HEREDIA, GOMEZ-MARTINEZ e MARCOS, 2012).

A expansão do tecido adiposo é acompanhada por alterações inflamatórias locais que levam à inflamação sistêmica crônica de baixo grau, caracterizada por níveis ligeiramente elevados de quimiocinas, citocinas circulantes e reagentes de fase aguda (VOLP et al, 2008). O excesso de gordura corporal, pode estar associado não só à ingestão e o gasto energético em humanos, mas também à qualidade da dieta, por exemplo, dietas hiperlipídicas (HFD) (COELHO et al, 2011), que podem acarretar alterações metabólicas.

A obesidade é uma epidemia global, presente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (HASANI-RANJBAR, JOUYANDEH & ABDOLLAHI, 2013; AFSHIN et al, 2017). No Brasil, de acordo com a pesquisa Vigitel, houve um aumento significativo nos indicadores de sobrepeso e obesidade entre 2006 e 2021, passando de 11,8% para 22,4% de adultos com obesidade (BRASIL, 2021). A prevalência de doenças crônicas, especialmente diabetes, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares, está associada a obesidade e ao aumento da mortalidade em humanos (WOF, 2020; HASANI-RANJBAR, JOUYANDEH & ABDOLLAHI, 2013).

Reduzir a carga de doenças crônicas exige um controle efetivo da obesidade (PEARCE et al., 2019). Componentes dietéticos encontrados, principalmente, em frutas e hortaliças têm sido associados a promoção da saúde, e conseqüentemente a prevenção e redução da obesidade e complicações metabólicas associada a obesidade (SIROMA et al, 2022). Diversos frutos da região do Cerrado brasileiro constituem excelentes fontes de fitoquímicos com alto potencial antioxidante (MARIN et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013). Entre os frutos do cerrado avaliados na literatura, destaca-se o Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa Mart.*), o qual apresenta alto teor de fitoquímicos (ROSA et al., 2016).

A literatura sugere uma relação positiva entre os polifenóis e o metabolismo da glicose. A ingestão desses compostos pode melhorar a absorção (ZHANG et al., 2017), captação nos tecidos e liberação de glicose pelo organismo (ZHAO et al., 2020; KIM, KEOGH, & CLIFTON, 2016), contribuindo para prevenir doenças como o diabetes tipo 2 (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2016). De acordo com Heibel e colaboradores (2018), o consumo do Tucum-do-Cerrado, fruto rico em polifenóis, pode melhorar a absorção e captação hepática de glicose através da alteração da expressão de transportadores de glicose.

Baseado nos estudos que apontam o Tucum-do-Cerrado como um alimento rico em polifenóis e com alto potencial antioxidante (SIQUEIRA et al., 2013; BOEING et al., 2017, HEIBEL et al., 2018), o presente estudo visa avaliar o efeito do Tucum-do-Cerrado na homeostase do metabolismo de glicose e as interrelações com o estado redox-inflamatório de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.



## **1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.2.1. Obesidade – epidemiologia, definição e comorbidades.**

A obesidade é um distúrbio metabólico no qual o acúmulo excessivo de gordura corporal resulta de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, e está associado ao comprometimento da saúde e aumento da mortalidade dos indivíduos (HASANI-RANJBAR, JOUYANDEH & ABDOLLAHI, 2013.) A obesidade tornou-se uma epidemia com uma ampla prevalência em todo o mundo, não apenas em países desenvolvidos, como também em países em desenvolvimento (HASANI-RANJBAR, JOUYANDEH & ABDOLLAHI, 2013; AFSHIN et al, 2017). No Brasil, de acordo com a pesquisa do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), no período entre 2006 e 2021 houve uma evolução desfavorável e significativa nos indicadores de sobrepeso e obesidade, com aumento de 11,8% em 2006 para 22,4% em 2021 entre adultos (BRASIL, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda três classificações para a obesidade usando o Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado como peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado. Pessoas com IMC maior que 25 são consideradas com sobrepeso (classe I), aquelas com IMC maior que 30 são consideradas com obesidade (classe II) e aquelas com IMC maior que 40 são consideradas com obesidade mórbida e têm risco aumentado de morte (OMS, 2000).

Condições ambientais e socioeconômicas são apresentadas como fatores que levam a obesidade, pois podem influenciar o comportamento do indivíduo, como foi visto na última década com o aumento da oferta e consumo alimentar per capita, principalmente de alimentos ultraprocessados e processados, aumento do sedentarismo e impacto negativo do desenvolvimento tecnológico, reforçando um comportamento compulsivo (HEYMSFIELD & WADDEN, 2017). Tais condições ambientais e socioeconômicas podem não ser a única causa, o que sugere que existem mecanismos genéticos subjacentes operando em nível individual, que determinam a suscetibilidade de resposta do indivíduo a esse ambiente 'obesogênico' (HEYMSFIELD & WADDEN, 2017; GJERMENI et al. 2021; LOOS & YEO, 2022).

A prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, particularmente o diabetes mellitus, certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares, está associada ao aumento do IMC da população, o que gera uma maior demanda de atendimentos e

recursos dos serviços de saúde (WOF, 2020). Ademais, outras comorbidades são também associadas com a obesidade, como doenças articulares, distúrbios de saúde mental, distúrbios do sono e, mais recentemente, a COVID-19, com impacto negativo na qualidade de vida (NEDUNCHEZHIAN et al, 2022; RAJAN & MENON, 2017; MEURLING, SHEA & GARVEY, 2019; KOLOTKIN & ANDERSEN, 2017; CAI et al., 2020).

A obesidade tem sido associada a uma série de complicações metabólicas (SIROMA et al., 2022; de HEREDIA, GOMEZ-MARTINEZ & MARCOS, 2012). Em uma análise retrospectiva conduzida pela Universidade de Oklahoma, Urdaneta e colaboradores (2020) investigaram pacientes com esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado) submetidos à cirurgia de redução de peso. Os participantes foram estratificados em três grupos com base em seus índices de massa corporal (IMC). O grupo com IMC mais elevado, acima de 35 kg/m<sup>2</sup>, apresentou um risco significativamente aumentado de complicações gerais, incluindo infecções profundas no local cirúrgico, que exigiram tratamento invasivo. Além disso, uma análise adicional revelou que os pacientes com IMC mais alto tinham um risco de mortalidade 2,2 vezes maior em comparação com aqueles com IMC inferior a 35 kg/m<sup>2</sup>.

A associação entre obesidade e disfunções metabólicas é amplamente determinada pela distribuição da gordura e o aumento da gordura visceral ou intra-abdominal é considerado mais prejudicial à saúde metabólica do que os depósitos de gordura periféricos (SERGI et al, 2019; de HEREDIA, GOMEZ-MARTINEZ & MARCOS, 2012). O acúmulo de gordura visceral é uma das principais características da síndrome metabólica, conjunto de desregulações metabólicas, e está intimamente relacionado à resistência à insulina, além de ser reconhecido como um fator de risco independente para o diabetes tipo 2 (MATSUZAWA, 2006; FAHED et al., 2021).

Um estudo prospectivo de coorte (2022) com 94.136 participantes, apresentou como hipótese que a resistência à insulina desempenha um papel importante na via entre obesidade e DCV. Os autores observaram uma ligação significativa entre obesidade geral e central com o risco de doenças cardiovasculares, onde houve um aumento significativo do fator de risco de DCV de 45% no grupo de obesidade em relação ao grupo com peso normal de referência ( $p < 0.0001$ ), mediado pelo índice de triglicerídeos-glicose, que foi o marcador utilizado de resistência à insulina (TIAN et al., 2022). Em uma revisão sistemática com meta-análise, Riaz e outros colaboradores (2018) avaliaram as evidências dos

estudos de randomização mendeliana e forneceram uma estimativa de associações entre obesidade e desfechos cardiovasculares. Como resultado de estudos agrupados, observou-se que a obesidade foi significativamente associada a um risco aumentado de diabetes tipo 2 (OR, 1,67; 95% CI, 1,30-2,14;  $p < 0,001$ ) e doença arterial coronariana (OR, 1,20; 95% CI, 1,02-1,41;  $p 0,03$ ).

Outro estudo de coorte (2022), avaliou a associação da obesidade e a dislipidemia de acordo com as medidas corporais entre adultos. Como resultados, os autores apresentaram que indivíduos com obesidade central (OR = 1,79, 95% CI: 1,69–1,91) e geral (OR = 1,91, 95% CI: 1,83–2,00) tiveram maior risco de dislipidemia comparados ao grupo de indivíduos sem obesidade, conforme o modelo ajustado a multivariáveis. Além disso, o grupo obesidade central apresentou uma maior prevalência de colesterol total (9,8%), triglicérides (30%), LDL-c (6%) elevados e HDL-c baixo (25%), com valores significativos quando comparados ao grupo sem obesidade ( $p < 0,001$ ). Dessa forma, o estudo sugere que os indivíduos com obesidade, geral ou central, têm maior prevalência de dislipidemia (ZHU et al., 2022).

Dessa forma, sugere-se manter a obesidade como foco central e base das estratégias de tratamento para doenças relacionadas à obesidade, para melhor gerenciamento de doenças atuais e para prevenção de doenças futuras. Assim, compreender a fisiopatologia da doença da obesidade e suas complicações permitirá aos profissionais de saúde gerenciar melhor as diferentes doenças que afetam tanto o indivíduo quanto a população (ANDOLFI & FISICHELLA, 2018; WHO, 2022).

### **1.2.2. Obesidade: fisiopatologia, mecanismos inflamatórios e complicações.**

A obesidade é caracterizada pelo crescimento do tecido adiposo, que é considerado um órgão capaz de responder a estímulos ambientais com o aumento do tamanho e número de adipócitos, processos descritos como hipertrofia e hiperplasia, respectivamente (CODOÑER-FRANCH et al, 2011; RUTKOWSKI, STERN & SCHERER, 2015). Os adipócitos que atingem um tamanho celular crítico tornam-se sobrecarregados de lipídios e resistentes à insulina, então, o processo de hiperplasia do tecido adiposo tenta reparar as alterações metabólicas, um mecanismo conhecido como "recuperação" (LONGO et al., 2019). A hipertrofia causa disfunção de organelas, em especial das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, distúrbios da

regulação endócrina e de deposição de lipídios, aumento da circulação de ácidos graxos livres e danos lipotóxicos de tecidos que não são especializados em estocar lipídeos, como fígado e músculos (BAYS et al, 2013).

A expansão do tecido adiposo também é acompanhada por alterações inflamatórias locais, resultando em inflamação sistêmica crônica de baixo grau, que é descrita por níveis ligeiramente elevados de quimiocinas, citocinas circulantes (por exemplo, IL-6 e IL-11) e reagentes de fase aguda, principalmente a Proteína C reativa (PCR) (VOLP et al, 2008). Além disso, nessa fase também ocorre uma infiltração de novas células inflamatórias, em especial os macrófagos (XU et al, 2003).

Estudos têm relatado que o percentual de gordura corporal elevado tem forte correlação com marcadores inflamatórios, sendo essa condição associada a maior risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias, ateroscleróticas e cardiovasculares (BRAGANÇA et al., 2020; SCHLECHT et al., 2016; BERG et al., 2015). À medida que há um aumento do tecido adiposo, ocorrem alterações no metabolismo dos ácidos graxos, liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunções mitocondriais e da expressão do transportador de glicose, esta última, resulta diretamente em prejuízo na captação e metabolização de glicose pelo tecido adiposo (HURRLE & HSU, 2017). Jakubiak e colaboradores (2021), em um ensaio clínico, observaram uma menor atividade total de superóxido dismutase (*SOD*), enzima antioxidante, em pacientes metabolicamente com obesidade quando comparados a indivíduos com peso normal metabolicamente saudáveis, tanto em mulheres (diferença 6,37%;  $p = 0,0025$ ) quanto em homens (diferença 11,79%;  $p = 0,0321$ ). Diante disso, os autores sugerem que a *SOD* pode ser um marcador de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade.

Os adipócitos sintetizam e secretam adipocinas e hormônios, cuja taxa e efeito são afetados pela distribuição e quantidade de tecido adiposo presente (HEYMSFIELD & WADDEN, 2017). As adipocinas são proteínas de sinalização, que incluem TNF- $\alpha$ , leptina, IL-6 e adiponectina, por exemplo (ENGIN, 2017). A secreção excessiva de adipocinas pró-inflamatórias por adipócitos e macrófagos no tecido adiposo resulta em um estado inflamatório sistêmico de baixo grau em alguns indivíduos com obesidade (HEYMSFIELD & WADDEN, 2017). Tais mediadores são prejudiciais à sinalização insulínica, o TNF- $\alpha$  por exemplo, afeta a sinalização da insulina via fosforilação da serina do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) e reduz a expressão do transportador

GLUT-4, o que diminui a entrada de glicose nas células (PERALDI & SPIEGELMAN, 1998).

O excesso de gordura corporal, pode estar associado não só à ingestão e o gasto energético em humanos, mas também a qualidade da dieta (COELHO et al, 2011). Dietas hiperlipídicas (HFD) podem acarretar alterações metabólicas como diminuição da atividade lipolítica, diminuição da secreção e/ou sensibilidade da leptina, apoptose neuronal hipotalâmica (MORAES et al, 2009), comprometimento do metabolismo mitocondrial no tecido adiposo humano (POMPLUN et al, 2007), quadro de hipoxia e estresse oxidativo, redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) e da secreção insulínica (JHA & MAZUMDER, 2019), caracterizando a resistência à insulina e, até mesmo, a própria condição da obesidade (WAJCHENBERG, 2000). Um estudo de coorte que acompanhou 23.859 adultos de faixa etária entre 20 e 60 anos, observou uma associação significativa entre uma maior ingestão de gordura e dietas ricas em gordura com o aumento do peso corporal, IMC e risco de sobrepeso e obesidade, em ambos os sexos ( $p < 0,001$ ) (WANG et al., 2020).

As vias de sinalização mediadas pela insulina desempenham um papel crucial na redução da glicose no sangue e na regulação do metabolismo geral da glicose no organismo (GASTALDELLI et al., 2001; VARGAS, JOY & CARRILLO, 2021). A redução do efeito biológico da insulina é chamada de resistência à insulina, na qual a glicose no sangue não pode ser usada efetivamente como fonte de energia devido a uma resposta reduzida a insulina em tecidos sensíveis à insulina, como músculo esquelético e tecido adiposo, e do aumento da liberação de glicose pelo fígado (WILCOX, 2005). Como mecanismo compensatório, as células beta do pâncreas produzem a princípio mais insulina, que posteriormente acaba levando à exaustão das células beta. Como a exaustão das células beta leva à diminuição da secreção de insulina, os níveis de glicose no sangue aumentam, levando ao desenvolvimento de diabetes não-insulino-dependente (CERF, 2013).

Causada em parte pela inflamação, a resistência à insulina (IR) é resultado da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e c-Jun N-terminal quinase (JNK1/2) que produzem citocinas pró-inflamatórias por meio de ácidos graxos saturados (SFA) ou do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Quando há alta concentração celular de glicose e inflamação, a enzima NADPH oxidase gera grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode prejudicar as células e diminuir suas funções. A ativação

das citocinas pró-inflamatórias NF- $\kappa$ B/JNK1/2 inibe a via da fosfatidilinositol 3-quinase PI3K/Akt, responsável pela sinalização e consequente translocação dos pools de GLUT-4 para a membrana plasmática por meio do receptor da insulina (IRS-1; WEI et al., 2008), levando a hiperglicemia e intolerância à glicose (VANHAESEBROECK, STEPHENS & HAWKINS, 2012). A resistência à insulina também pode ser resultado da inibição da reatividade vascular, mediada pelo óxido nítrico (NO), devido as EROs geradas pela NADPH oxidase, o que limita a translocação de GLUT-4 das vesículas de armazenamento do transportador de glicose (WEI et al., 2008).

A obesidade pode ocasionar complicações metabólicas, as quais interferem na ação da insulina e conduzem a condições como hiperglicemia, hiperlipemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina (WAJCHENBERG, 2000). Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos de utilização da glicose nas diferentes rotas metabólicas é fundamental para a compreensão do metabolismo energético e para o desenvolvimento de estratégias nutricionais e terapêuticas voltadas para os distúrbios metabólicos relacionados, como a diabetes e a obesidade (BEELLEN et al., 2010).

### **1.2.3. Metabolismo de carboidratos**

Os carboidratos são uma das principais fontes de energia para o organismo humano. A depender do número de moléculas que os compõem são classificados em monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos, (SIZER & WHITNEY, 2011; GROPPER, SMITH & CARR, 2019). A digestão dos carboidratos começa na boca, com a ação da enzima amilase salivar, e continua no intestino delgado, onde a  $\alpha$ -amilase pancreática hidrolisa os carboidratos nos monossacarídeos glicose, frutose e galactose. A glicose é então absorvida pelas células intestinais através dos transportadores de sódio-glicose tipo 1 (SGLT1) e o de glicose tipo 2 (GLUT2), enquanto é transportada para a corrente sanguínea por meio do transportador de glicose tipo 5 (GLUT5) (SMITH, 2015; SLIMANI et al., 2020). (SMITH, 2015; SLIMANI et al., 2020).

Uma vez absorvidos pelo organismo, os carboidratos são transportados para o fígado por meio da veia porta hepática, onde são processados e distribuídos para os tecidos periféricos. No fígado, a glicose é prontamente captada a partir da circulação sanguínea pelo transportador GLUT2 e rapidamente fosforilada pela enzima hexoquinase

para formar a glicose-6-fosfato, um precursor essencial para a síntese do glicogênio (SUNEHAG, 2017).

O glicogênio é a forma de armazenamento de carboidratos mais abundante no organismo e é essencial para o fornecimento rápido de energia durante períodos de alta demanda energética (STRYER et al., 2017). A glicose-6-fosfato é convertida em glicogênio por meio de uma série de reações enzimáticas que envolvem a ação de diversas enzimas, incluindo a glicogênio sintase. O glicogênio é armazenado em grânulos no citoplasma das células hepáticas, onde pode ser facilmente mobilizado quando necessário (BERG, TYMOCZKO & STRYER, 2012; STRYER et al., 2017).

Durante períodos de baixa oferta de glicose, como em um jejum prolongado, o glicogênio hepático é quebrado em glicose-6-fosfato, que é convertida em glicose através da ação da enzima glicose-6-fosfatase, e liberada na circulação sanguínea para ser utilizada pelos tecidos periféricos como fonte de energia (ROTHMAN et al., 1991). A síntese e degradação do glicogênio é um processo regulado por uma série de hormônios, incluindo a insulina e o glucagon. A insulina é produzida em resposta à elevação da glicemia e estimula a síntese de glicogênio, enquanto o glucagon é produzido em resposta à diminuição da glicemia e estimula a degradação do glicogênio em glicose (SALTIEL & KAHN, 2001; CAO et al., 2019).

Além do fígado, os músculos esqueléticos também são locais de armazenamento de glicogênio (GUEZENNEC et al., 1994). A degradação do glicogênio no músculo é controlada por uma série de enzimas, incluindo a glicogênio fosforilase e a enzima desramificadora do glicogênio, que trabalham em conjunto para clivar as unidades de glicose do glicogênio e produzir glicose-6-fosfato, que é utilizada como fonte de energia na via glicolítica (GARCÍA-CASARRUBIOS, DE LA HERA & GUINOVART, 2020).

A capacidade limitada de armazenamento de glicogênio nos músculos pode levar à diminuição na disponibilidade de glicose para a produção de energia durante períodos de jejum ou de baixa ingestão de carboidratos, o que pode afetar o desempenho físico e cognitivo (BERG, TYMOCZKO & STRYER, 2012; SIZER & WHITNEY, 2011). Quando o glicogênio muscular é esgotado, as células musculares utilizam outras fontes de energia, como os ácidos graxos livres disponibilizados pelo tecido adiposo (GROPPER, SMITH & CARR, 2019). Além disso, o transporte de glicose para dentro das células musculares é mediado pelo transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), que é

sensível à sinalização da insulina e desempenha um papel importante na homeostase da glicose (FRIEDMAN & HAHN, 2018). Níveis reduzidos de GLUT4 foram observados em indivíduos com obesidade, contribuindo para a resistência à insulina e prejudicando a captação de glicose pelas células musculares (YU et al., 2020). A glicose ao ser metabolizada na via glicolítica produz duas moléculas de piruvato e dois ATP. A glicólise ocorre no citosol das células e é uma via anaeróbica, o que significa que não requer oxigênio. O piruvato produzido pela glicólise pode ser utilizado em duas vias metabólicas diferentes: a via aeróbica, que ocorre na presença de oxigênio e resulta na produção de acetil-CoA, e a via anaeróbica, que ocorre na ausência de oxigênio e resulta na produção de ácido lático (BERG, TYMOCZKO & STRYER, 2012).

Na etapa final do metabolismo da glicose, o acetil-CoA gerado a partir do piruvato é oxidado em dióxido de carbono e água na cadeia respiratória mitocondrial, produzindo uma grande quantidade de ATP (ZHANG et al., 2020). A regulação do metabolismo da glicose e a produção adequada de ATP são fundamentais para a homeostase metabólica e a prevenção de doenças metabólicas, como a obesidade e a diabetes tipo 2. O controle da glicemia é mantido por meio da interação complexa entre vários hormônios, como a insulina, o glucagon e o cortisol, e fatores, como a alimentação e o exercício físico (SHOELSON, LEE, & GOLDFINE, 2006; KAHN, 2019).

Em modelos de obesidade em animais é observado a alteração de diversos marcadores do metabolismo e homeostase da glicose (TORELLI et al., 2019; KAMPMANN et al., 2011). Estudo realizado em camundongos com obesidade demonstrou que ocorre uma alteração no paradigma normal de absorção de glicose no intestino delgado. O estudo mostra que o transportador SGLT1, presente na membrana apical das células das vilosidades da mucosa intestinal, transporta menos carga de glicose e torna-se menos responsivo ao polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) à medida que os animais se tornam mais com obesidade. Por outro lado, o transportador GLUT2, presente apenas na membrana basolateral das células das vilosidades em animais normais, é expresso tanto na membrana basolateral quanto na apical à medida que os animais se apresentam obesidade. Inicialmente, o GLUT2 aumenta a absorção de glicose, mas sua função decresce à medida que os animais se apresentam obesidade mórbida (RHODES et al., 2022)

Em resumo, o metabolismo de carboidratos desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose no organismo (FRIEDMAN & HAHN, 2018).



A obesidade, por sua vez, está associada a disfunções nesse metabolismo, incluindo resistência à insulina e alterações na expressão de transportadores de glicose (GROPPER, SMITH & CARR, 2019). Estudos têm investigado compostos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, como os polifenóis, como possíveis agentes para o controle da obesidade e suas complicações metabólicas (MANISHA et al., 2020). A próxima seção irá abordar os efeitos dos polifenóis no metabolismo da glicose e na resposta antioxidante e anti-inflamatória.

#### **1.2.4. Polifenóis x metabolismo da glicose x resposta antioxidante e resposta anti-inflamatória.**

Componentes dietéticos encontrados, principalmente, em frutas e hortaliças têm sido associados a melhoria da saúde, prevenção e redução da obesidade bem como a complicações metabólicas associada a obesidade, como a inflamação sistêmica, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus, resistência à insulina e síndrome metabólica (SIROMA et al, 2022). Uma classe de moléculas bioativas derivadas de plantas denominada polifenóis ganhou atenção central devido sua capacidade antioxidante, pois possuem grupos fenólicos doadores de elétrons em suas estruturas (ROSA et al, 2016; SHAN et al, 2019; KAWABATA, YOSHIOKA & TERA0,2019).

Os polifenóis são fitoquímicos que apresentam ao menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (MALACRIDA & MOTTA, 2005). Podem ser derivados de muitas partes da planta, que incluem as flores, polpa, caules, sementes e raízes (KAWABATA, YOSHIOKA & TERA0,2019). Não são diretamente responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas, mas contribuem para a sua cor, sabor e atividades farmacológicas (RECIO, ANDUJAR & RIOS, 2012). São classificados em cinco classes: flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e lignanas (IGNAT, VOLF & POPA, 2011).

De acordo com a pesquisa de Taslimi & Gulçin (2017), estudo *in vitro*, todos os sete compostos fenólicos naturais testados, dentre estes o resveratrol, apresentaram maior capacidade de inibição da enzima digestiva alfa-glicosidase comparados a acarbose (22,80  $\mu$ M), fármaco hipoglicemiante, sendo o ácido cafeico fenetil éster (29,01 nM) e a curcumina (29,31 nM) os compostos que apresentaram menores valores de IC50. Os autores também observaram propriedades inibitórias *in vitro* da enzima alfa-amilase.

Assim, os autores relatam que os compostos fenólicos estudados são inibidores eficazes das enzimas digestivas alfa-glicosidase e da alfa-amilase, o que diminui a velocidade de digestão e absorção de carboidratos, favorecendo a manutenção dos níveis de glicose no sangue dentro da normalidade.

Um estudo em ratos o qual avaliou o efeito de dieta rica em lipídeos em combinação com chá verde, epigallocatequina-galato (EGCG), polifenol 60 ou EGCG + cafeína, demonstrou que a dieta rica em lipídeos aumentou a peroxidação lipídica, sendo que avaliado pela doseagem de malondialdeído (MDA), e reduziu a capacidade antioxidante total (TAC), a concentração de glutathione reduzida (GSH) e as atividades das enzimas antioxidantes glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) ( $p < 0.001$ ). Enquanto, a combinação da dieta hiperlipídica com o chá verde ou seus componentes purificados reduziu a concentração de MDA e aumentou a TAC, a concentração de GSH e a atividade hepática de GST em comparação com a dieta rica em lipídeos isolada e foram semelhantes ao grupo de controle ( $p < 0.001$ ). Além disso, a adição de EGCG ou polifenol 60 à dieta rica em lipídeos aumentou significativamente a atividade de G6PD. O estudo conclui que o chá verde e seus ingredientes impedem o aparecimento do estresse oxidativo e estimulam as enzimas antioxidantes em ratos alimentados com uma dieta rica em lipídeos e que a EGCC é um composto com potencial terapêutico contra a obesidade (EL SEBAEI et al., 2019).

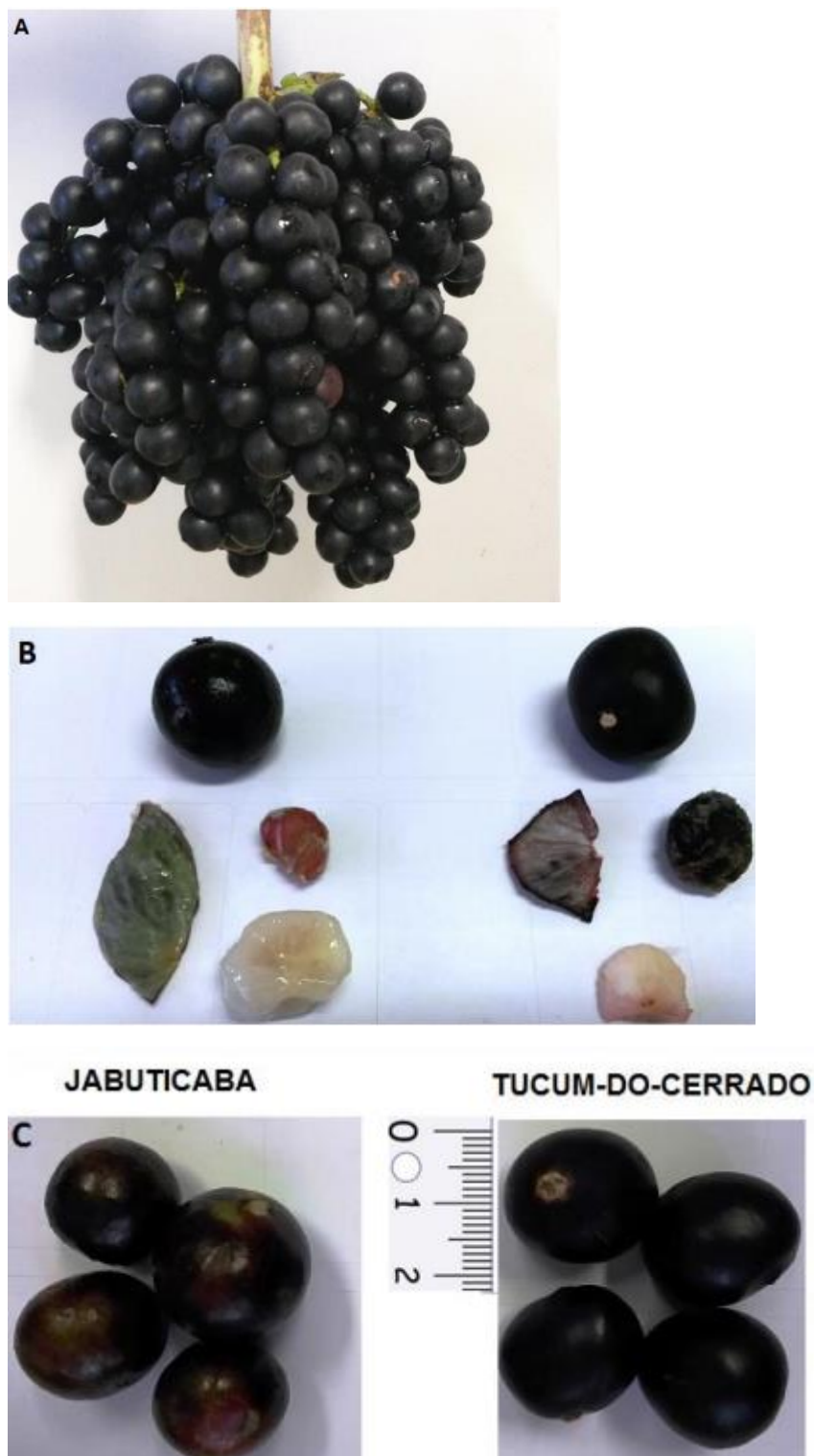
A região do Cerrado brasileiro é descrita na literatura como fonte de frutos ricos em compostos fitoquímicos, (MARIN et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2016) reguladores da sinalização inflamatória e moduladores imunológicos, mostrando a importância dos fitoquímicos em diferentes aspectos da saúde (MALIREDDY ET AL, 2012; ESSAFI-BENKHADI ET AL 2012). No estudo randomizado, duplo cego, controlado, realizado por Santamarina e colaboradores (2018), adultos com obesidade foram divididos em um grupo suplementado com 5g de polpa liofilizada de Juçara Berry (*Euterpe edulis* Mart.) ou grupo placebo suplementado com 5g de maltodextrina por 6 semanas, tendo sido observada uma melhora no perfil de ácidos graxos séricos, com uma redução na soma de ácidos graxos saturados e um aumento no total de ácidos graxos monoinsaturados circulantes no soro do grupo tratado com Juçara Berry em comparação ao grupo placebo, após a suplementação. Portanto, os autores sugerem que a polpa de Juçara Berry é capaz de modificar o perfil de ácidos graxos séricos e, conseqüentemente,

reduzir o risco de doenças metabólicas em adultos com obesidade por promover alterações epigenéticas.

Siqueira e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antioxidante *in vitro* e a composição de algumas classes de fitoquímicos de doze frutos do cerrado (araticum, baru, cagaita, cajuzinho, guariroba, ingá, jatobá, jenipapo, jurubeba, lobeira, mangaba e tucum-do-cerrado) e os comparou com a maçã Red Delicious, fruta referência em teor de compostos antioxidantes e fitoquímicos. Dentre os frutos avaliados destacou-se o Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa Mart.*), o qual apresentou alto teor e diferentes classes de polifenóis, como flavanol (catequina), flavonóis (quercetina e rutina), ácidos fenólicos (gálico, ferúlico e caféico) e antocianinas (cianidina).

O Tucum-do-Cerrado é um fruto que se assemelha visualmente à jabuticaba (Figura 1), pode ser consumido *in natura* ou utilizado para fabricação de algumas preparações como doce, geleia, suco, vinho e sorvete (SILVA et al, 2001; VIEIRA et al, 2010). Considerado um fruto rico em compostos bioativos como flavonóides, antocianinas e vitamina C (SIQUEIRA et al., 2013), tais compostos são encontrados principalmente na casca do fruto (ROSA et al., 2016). Ballard e colaboradores (2020), avaliaram o efeito da administração de 100 mg kg<sup>-1</sup> de extrato de Tucum-do-Pantanal em camundongos C57BL/6J com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, e observaram que a gavagem diária do extrato de Tucum-do-Pantanal preveniu o ganho de peso corporal induzido por consumo de dieta hiperlipídica e protegeu contra a esteatose hepática após 8 semanas de tratamento.

Estudo anterior, que avaliou o efeito do Tucum-do-Cerrado no metabolismo de carboidratos e na resposta redox em ratos suplementado ou não com ferro dietético, observou que o consumo de Tucum-do-Cerrado induziu a expressão dos genes *Prkaa1* e *Prkaa2* no fígado, inibiu a atividade da enzima gliconeogênica glicose-6-fosfatase e aumentou a captação hepática de glicose por meio da regulação transcricional do transportador de glicose GLUT2, já que os níveis de mRNA de *Scl2a2* hepático (GLUT2) foram superiores no grupo com Tucum-do-Cerrado em comparação com o grupo controle (Heibel et al., 2018).



**Figura 1** – Ilustração do fruto Tucum-do-Cerrado. (A) O cacho do Tucum-do-Cerrado; (B) Comparação das partes do fruto Tucum-do-Cerrado e jabuticaba; (C) Similaridade externa do Tucum-do-Cerrado e Jabuticaba, em detalhe, régua em centímetros. Adaptado: DANTAS et al., 2022. Fotos tirada por Marcela Berckmans em 21/02/2015.

A literatura destaca os polifenóis, presentes em alimentos como o Tucum-do-Cerrado, como compostos dietéticos importantes na prevenção e tratamento da obesidade e suas complicações (SIQUEIRA et al., 2013; BOEING et al., 2017), o presente estudo visa avaliar o efeito do Tucum-do-Cerrado na homeostase do metabolismo de glicose e as interações com o estado redox-inflamatório de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Portanto, a hipótese é que o Tucum-do-Cerrado, fruto rico em compostos fitoquímicos, melhore o metabolismo da glicose através da alteração da expressão de proteínas envolvidas na absorção e metabolização de glicose pelos tecidos ou indiretamente por potencializar a resposta redox e a resposta anti-inflamatória.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Geral**

- Avaliar o efeito do Tucum-do-Cerrado no metabolismo de glicose e suas inter-relações com as respostas inflamatória e redox em ratos jovens alimentados com dieta hiperlipídica.

#### **1.3.2 Específicos**

- Avaliar o efeito do consumo da Tucum-do-Cerrado na homeostase do metabolismo da glicose.
- Avaliar o efeito do Tucum-do-Cerrado na resposta inflamatória.
- Avaliar o efeito do consumo do Tucum-do-Cerrado na resposta redox.
- Verificar uma possível relação entre o metabolismo da glicose e as respostas inflamatória e redox.

### **1.4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1.4.1 Fruto**

Os frutos Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) maduros foram adquiridos em Terezópolis de Goiás, Goiás, Brasil, entre janeiro e março (16°28'15.4"S e 49°03'44.1"W, Goiás, Brasil. Após a aquisição, os frutos foram imediatamente lavados com água destilada e armazenados a -80°C. Posteriormente, em ambiente protegido da luz, as sementes foram retiradas e descartadas, com os frutos ainda congelados, enquanto a polpa e a casca foram homogeneizadas em liquidificador, liofilizadas (liofilizador Beta 2-8 LSC PLUS Martin Christ, Nova Analítica LTDA, São Paulo, Brasil) e armazenadas a -80°C até o preparo das rações.

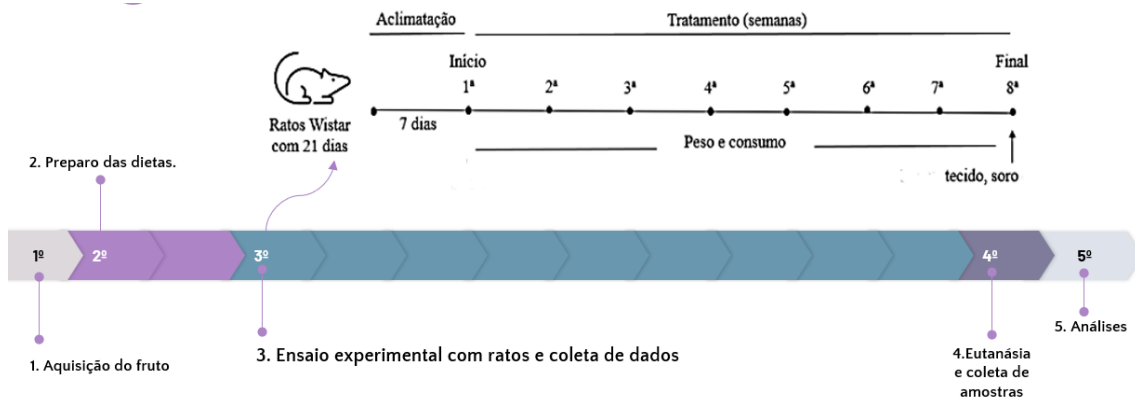
A quantidade de Tucum-do-Cerrado (150 g de polpa e casca peso fresco/kg de ração) adicionada à ração de ratos foi definida de acordo com estudo anterior (DA CUNHA & ARRUDA, 2017), que mostrou que essa quantidade de Tucum-do-Cerrado teve um efeito antienvhecimento. Após o processo de liofilização, os 150 g de polpa e casca de Tucum-do-Cerrado in natura renderam 28 g de pó.

Dessa forma, 28 g de polpa e casca liofilizada de Tucum-do-Cerrado foram adicionadas a cada kg da dieta até a obtenção de uma mistura homogênea, e então a dieta foi peletizada.

#### 1.4.2 Animais e dietas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) (Anexo A), protocolo nº 25/2018 consubstanciado em 08 de maio de 2018. Vinte e quatro ratos *Wistar* machos adquiridos do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, Brasil, recém-nascidos (21 dias) e com peso médio  $67,37 \pm 6,04$ g foram alojados de maneira individual em gaiolas de aço inoxidável, em uma sala com ciclos de claro/escuro de 12/12 h e temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os ratos tiveram livre acesso a água e acesso a dieta apenas durante o ciclo escuro.

Após 7 dias de aclimatação com dieta padrão para roedores AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais (n=6) descritos a seguir. Grupo controle (**CT**): dieta AIN-93G; Grupo controle + Tucum-do-Cerrado (**CT/TUC**): dieta AIN-93G contendo 28 g de polpa e casca de Tucum-do-Cerrado liofilizada /kg de dieta; Grupo hiperlipídica (**HF**): dieta AIN-93G contendo 58% de lipídeos (as fontes de lipídeos compreenderam 51,9% de banha de porco e 6,1% de óleo de soja, seguindo a Obesity Induction Diet descrita pela Research Diet; ULMAN, 2011) e Grupo hiperlipídica + Tucum-do-Cerrado (**HF/TUC**): dieta AIN-93G contendo 58% de lipídeos e 28 g de polpa e casca de Tucum-do-Cerrado liofilizado/kg dieta. Após 2 meses de tratamento os animais foram eutanasiados por anestesia com isoflurano 3% em câmara de anestesia, seguida de exsanguinação por punção cardíaca, e o fígado, intestino delgado e músculo foram retirados, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) a  $4^\circ\text{C}$ , imediatamente congelados com nitrogênio líquido ( $\text{N}_2$ ) e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  (Figura 2).



**Figura 2** – Linha do tempo das etapas do trabalho desenvolvido em cada instância da estratégia.

### 1.4.3 Consumo de ração e ganho de peso

A ingestão de ração foi registrada diariamente pesando a quantidade de ração ofertada e as sobras (balança de precisão Shimadzu, modelo AUY220, Kyoto, Japão). Os ratos eram pesados semanalmente em balança digital (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil). As razões de eficiência alimentar e eficiência energética foram determinadas de acordo com as equações descritas abaixo:

$$\text{Eficiência alimentar} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Ingestão alimentar (g)}}$$

$$\text{Eficiência energética} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Ingestão energética (kcal)}}$$

### 1.4.4 Marcadores do metabolismo de glicose

#### 1.4.4.1 Concentração de glicose e insulina

A concentração sérica de glicose de jejum foi determinada utilizando um glicosímetro (Accu-check, Roche, Indianapolis, EUA). A concentração plasmática de insulina de jejum foi determinada por kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o protocolo do fabricante (Millipore Corporation, Missouri, EUA). Os índices de resistência à insulina (HOMA IR) e



função das células  $\beta$  (HOMA beta) foram calculados usando as equações abaixo mencionadas:

$$HOMA\ IR = \frac{blood\ glucose\ (mmol/L) \times serum\ insulin\ (mU/L)}{22.5}$$

$$HOMA\ beta = \frac{20 \times insulinemia\ (\mu U/L)}{blood\ glucose\ (mmol/L) - 3.5}$$

#### 1.4.4.2 Concentração de glicogênio hepático e muscular

A concentração de glicogênio no fígado e no músculo foi determinada pelo método descrito por Lo e colaboradores (1970). Uma mistura de reação contendo 50 mg de tecido e 500  $\mu$ L de solução de hidróxido de potássio 30% saturada com sulfato de sódio foi incubada a 98°C por 30 minutos em banho-maria. Após resfriar a amostra em gelo, uma solução de etanol 95% (1,2 x vol) foi adicionada à mistura, seguida de uma incubação de 30 minutos em gelo para precipitar o glicogênio. Após centrifugação da amostra (80 x g por 30 minutos a 4°C), o precipitado de glicogênio foi solubilizado em 1 e 2 mL de água destilada para músculo e fígado, respectivamente. O sobrenadante foi então diluído de 2x e 200  $\mu$ L de solução de fenol 5% e 1 mL de solução de ácido sulfúrico 98% foram adicionados à mistura reacional. A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidos de 20 minutos a 30°C em banho-maria, e a absorbância foi determinada a 490 nm (espectrofotômetro TCC-240A, Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma curva padrão foi construída usando soluções padrão purificadas de glicogênio bovino tipo IV na faixa de concentração de 0-100  $\mu$ g/mL. A concentração de glicogênio foi expressa em mg de glicogênio/mg de tecido.

#### 1.4.5 Danos oxidativos a lipídios (malondialdeído) e proteínas (carbonil)

##### 1.4.5.1 Peroxidação lipídica

A concentração de malondialdeído no fígado e no intestino delgado (MDA - um produto da peroxidação lipídica) foi determinada por fluorescência através

da detecção do complexo MDA-ácido tiobarbitúrico, utilizando o comprimento de onda de excitação 532 nm e comprimento de onda de emissão 553 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, 211 Sunnyvale, CA, EUA) (CANDAN; TUZMEN, 2008). Uma curva padrão foi construída a partir da hidrólise do reagente 1,1,3,3- tetraethoxy-propano 97% (TEP; Sigma, St. Louis, MO, EUA) em ácido sulfúrico a1%, em uma faixa de concentração de 0,0 a 5,05 nmol/mL ( $y = 15,813x - 0,156$ ;  $r^2 = 0,9994$ ). A concentração de MDA nos tecidos foi expressa em nmol MDA/mg de proteína total.

#### **1.4.5.2 Dosagem das proteínas carboniladas**

A concentração de proteína carbonilada no fígado e no intestino delgado foi avaliada conforme descrito por Richert e colaboradores (2002). A absorbância do complexo 2,4 dinitrofenilhidrazina-carbonila foi monitorada a 376 nm (Espectrofotômetro, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japão). As concentrações teciduais de carbonila foram expressas em nmol de carbonila/mg de proteína total usando o coeficiente de extinção de  $22.000 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A concentração de proteína tecidual total foi determinada segundo método previamente descrito por Hartree (1972).

#### **1.4.6 Capacidade antioxidante total no soro**

O protocolo experimental descrito por Benzie e Strain (1996) determina a capacidade total de redução férrica de fluidos biológicos (ensaio FRAP). O reagente FRAP foi preparado diariamente usando tampão acetato 0,3 mol/L (pH 3,6), 10 mmol/L 2,4,6-triazinatripiridil em ácido clorídrico 40 mmol/L e uma solução aquosa de 20 mmol/L de cloreto férrico em uma proporção de 10:1:1 e incubados a 37 °C por 30 min. A mistura de reação foi composta por 900 µL de reagente FRAP, 30 µL de amostra de soro e 90 µL de água deionizada. Após a homogeneização, a absorbância foi registrada em 593 nm/4 min. Uma curva padrão foi construída com soluções de  $\text{FeSO}_4$  em uma faixa de concentração de 0 a 2.000 µmol/L. A capacidade antioxidante sérica foi expressa em µmol  $\text{FeSO}_4$ /L de soro.

#### **1.4.6.1 Atividade específica das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutaciona redutase (GR), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) no fígado e intestino delgado.**

##### **A - Catalase (CAT)**

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada monitorando o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (espectrofotômetro, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japão) e o coeficiente de extinção de 0,0394 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AEBI H, 1984). Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

##### **B - Glutaciona Peroxidase (GPx)**

A atividade da glutaciona peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foi avaliada usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato em um ensaio acoplado à oxidação catalisada por glutaciona redutase (GR) de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) a 340 nm (espectrofotômetro, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japão), usando um coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (JOANISSE E STOREY, 1996). Uma unidade de glutaciona peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato por minuto.

##### **C – Glutaciona redutase (GR)**

O método utilizado foi descrito por Joannis e Storey (1996). Este método monitora o consumo de NADPH a 340 nm por 20 segundos. A atividade da enzima foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 340 nm. Uma unidade de glutaciona redutase corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de NADPH/min.

##### **D – Glutaciona S-transferase (GST)**

A atividade específica da enzima GST foi determinada através da reação de conjugação de 1 mmol/L de GSH com 1 mmol/L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e consequente formação do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutationa, que é detectado em 340 nm (Habig e Jakoby, 1981). A atividade enzimática foi quantificada usando o coeficiente de extinção de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutationa. Uma unidade de glutathione-s-transferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol do produto/min.

#### **E – Superóxido Dismutase (SOD)**

A determinação da atividade da SOD foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Mccord e Fridovich (1969), Sun e colaboradores (1988) e adaptado por Mccord (2001). A estimativa da atividade enzimática partiu da premissa de que uma unidade (U) de SOD corresponderia à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do citocromo c (IC50). O IC50 foi determinado pela leitura de cinco pontos crescentes dos homogeneizados. Uma função logarítmica foi gerada a partir das quantidades de homogeneizados utilizados e seus respectivos valores percentuais de inibição da redução do citocromo C. Esta função possibilitou encontrar o valor correspondente a uma unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U enzima/mg de proteína.

#### **1.4.7 Atividade específica das enzimas do metabolismo de carboidratos: $\alpha$ -glucosidase (GLY), hexoquinase (HK) e glucose-6-phosphatase (G6Pase)**

A determinação da atividade da  $\alpha$ -glucosidase, homogeneizados de intestino delgado foram preparados na proporção de 1:10 (p/v) em soro fisiológico 0,9% utilizando homogeneizador elétrico a 4°C, seguido de centrifugação a  $10.000 \times g/20 \text{ min}$  a 4°C. Na análise da atividade de glucoquinase (GK), hexoquinase (HK) e fosfofrutoquinase-1 (PFK1) os homogeneizados foram preparados a partir de amostras congeladas de fígado e músculo homogeneizadas em solução tampão contendo KF 30 mM, EDTA 4 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM e sacarose 250 mM (pH 7,5) a 4°C, utilizando a proporção de 1:5 (m/v).

Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 x g a 4°C por 10 min (COELHO et al., 2007).

Os homogeneizados para determinação de glicose-6-fosfatase (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) foram preparados a 4 °C em uma solução tampão contendo 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2,5 mM ditioneitol, 1 mM EDTA e 5 mM MgCl<sub>2</sub> usando um homogeneizador elétrico, na proporção de 1:10 (p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 11.000 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 105.000 x g a 4°C por 60 min. O pellet (fração microssomal) foi solubilizado em uma solução de sacarose/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,25 M/1 mM) na proporção de 2:1 (peso de tecido homogeneizado/sacarose/volume de EDTA) e usado para determinar a atividade de G6Pase, enquanto a fração citosol (sobrenadante) foi usado para medir a atividade da enzima PEPCK.

#### **A - Alfa-glicosidade intestinal**

A atividade enzimática da  $\alpha$ -glucosidase (GLY, EC 3.2.1.8) foi avaliada de acordo com o método descrito por Gopal e colaboradores (2017), com pequenas modificações. O ensaio baseia-se na formação de p-nitrofenol a partir do 4-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, que foi detectado a 340 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em nmol p-nitrofenol/min/mg de proteína.

#### **B - Glicoquinase e hexoquinase no fígado e músculo**

As atividades de glicoquinase (GK) e hexoquinase (HK) foram determinadas de acordo com o método proposto por Mosa e colaboradores (2015). A reação consiste em monitorar a formação de NADPH, catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase na presença de glicose e homogeneizados teciduais, a 340 nm por 3 min (espectrofotômetro TCC-240A, Shimadzu, Kyoto, Japão). A atividade da glicoquinase foi determinada pela diferença entre a formação de NADPH na presença de glicose 100 mM e 5 mM no meio reacional. A atividade da hexoquinase muscular foi

determinada usando a quantidade de NADPH formada na presença de glicose 5 mM. A atividade enzimática foi expressa em nmol de NADPH/min/mg de proteína, utilizando um coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ .

#### **C - Glicose-6-fosfatase no fígado**

A atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase) no fígado foi avaliada monitorando a produção do complexo molibdato-fósforo, que absorve energia no comprimento de onda de 840 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA), conforme descrito por Baginski e colaboradores (1974). O teor de proteína total de cada homogeneizado foi determinado pelo método de Hartree (HARTREE, 1972). Os resultados foram expressos em nmol de fosfato inorgânico/min/mg de proteína.

#### **D - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no fígado**

A atividade da enzima hepática fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foi determinada conforme descrito por Hayanga e colaboradores (2016). A fração citosólica dos homogeneizados foi utilizada para determinar a atividade enzimática através do ensaio acoplado com malato desidrogenase. A taxa de oxidação do NADH foi monitorada a 340 nm por 3 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). A taxa de oxidação do NADH foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ , e a atividade enzimática foi expressa em nmol de NADH/min/mg de proteína.

#### **E - Fosfofrutoquinase-1 (PFK1) no fígado e músculo**

A atividade da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK1) foi determinada conforme descrito por Coelho e colaboradores (2007), usando o ensaio enzimático acoplado entre triose fosfato isomerase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, que detecta a oxidação NADH a 340 nm durante 20 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices,

Sunnyvale, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como oxidação de NADH/min/mg de proteína.

#### **1.4.8 Determinação dos níveis de transcritos de Ppck1 (PEPCK), Prkaa1 e Prkaa2 (AMPK subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ ), Slc2a2 (GLUT2), Slc2a4 (GLUT4), Slc5a1 (SGLT1).**

##### **1.4.8.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA**

A extração do RNA tecidual total foi feita com o reagente TRIzol™ (Invitrogen Inc., Burlington, ON, Canadá) conforme descrito por da Cunha e colaboradores (2014), com algumas modificações. Os tecidos foram homogeneizados usando um disruptor de células/tecidos (L-beader 6, Cotia, São Paulo, Brasil). As amostras de fígado foram homogeneizadas em tubos pré-preenchidos com esferas de zircônia de 1 mm usando 2 ciclos de 3.670 rpm/30 s (entre os ciclos as amostras foram deixadas no gelo por 30 s), enquanto para o músculo, foram utilizados tubos pré-preenchidos com esferas de aço inoxidável de 2,8 mm e 3 ciclos de 3.670 rpm/45 s (entre os ciclos as amostras foram deixadas no gelo por 45 s). O intestino foi homogeneizado em tubos pré-preenchidos com esferas de zircônia de 3 mm usando 4 ciclos de 3.470 rpm/40 s (entre os ciclos as amostras foram deixadas no gelo por 40 s).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram determinados os níveis de transcritos do transportador de glicose membro 2 da família 2 (Slc2a2/Glut2) e cotransportador de glicose membro 1 da família 5 (Slc5a1) no intestino, transportador de glicose membro 2 da família 2 (Slc2a2/Glut2), transportador de glicose membro 4 da família 2 (Slc2a4/Glut4), ; subunidade catalítica alfa 1 da proteína quinase ativada por 5'-AMP (Prkaa1), subunidade catalítica alfa 2 da proteína quinase ativada por 5'-AMP (Prkaa2) no músculo e fígado; e fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (Pck1) hepática, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura). A reação de qRT-PCR era composta por 5,0

μL do reagente Fast SYBR Green Master Mix 2×, 2,0 μL de cDNA e 0,2 μmol/L de cada primer, em um volume final de 10 μL. As sequências dos primers direto (FW) e reverso (RW) usados para reações de PCR em tempo real são descritas na Tabela 1. A amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando-se um sistema de reação de 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 20 s; hibridação: 95° C por 3 s e 60° C por 30 s; estágio da curva de dissociação: 95° C por 15 s, 60° C por 60 s, 95° C por 15 s e 60° C por 15 s).

A especificidade de cada amplicon foi avaliada por meio da análise de sua curva de dissociação. Todas as amostras foram testadas em triplicata e normalizadas para o gene constitutivo β-actina (*Actb*) ou gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). A quantificação da expressão gênica relativa entre os diferentes grupos foi avaliada utilizando o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A expressão dos genes foi calculada utilizando os valores do  $C_T$  e os resultados expressos como o número de vezes em relação ao gene constitutivo β-actina (*Actb*).

**Table 1** - Primers sequences used for amplification of genes by real-time PCR assays and the GenBank accession numbers.

GENE	Primers sequences (5'- 3')	GenBank accession number
<i>Actb</i> (β-Actin)	GTCGTACCACTGGCATTGTG	NM_031144
<i>I11b</i> (IL-1β)	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	NW_047658
<i>Gapdh</i> (GAPDH)	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC TGCCCCCATGTTTGTGATG GCTGACAATCTTGAGGGAGTTGT	NW_0476961
<i>Prkaa1</i> (AMPK-α1)	GAAGTCAAAGCCGACCCAAT AGGGTTCTTCCTTCGCACAC	NM_019142
<i>Prkaa2</i> (AMPK-α2)	ATGATGAGGTGGTGGAGCAG GTGAATGGTTCTCGGCTGTG	NM_023991
<i>Pck1</i> (PEPCK)	GCC TGT GGG AAA ACC AAC CAC CCA CAC ATT CAA CTT TCC A	NM_198780
<i>Sc12a2</i>	AAAGCCCCAGATACCTTTACCT	NM_012879



(GLUT2)	TGCCCCTTAGTCTTTTCAAGC	
<i>Slc2a4</i> (GLUT4)	TTGCAGTGCCTGAGTCTTCTT CCAGTCACTCGCTGCTGA	NM_012751.1
<i>Slc5a1</i> (SGLT1)	GAAGGGTGCATCGGAGAAG CAATCAGCACGAGGATGAAC	NM_013033.2
<i>Tnf</i> (TNF)	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC GTCGTAGCAAACCAAGCAGA	X66539

---

#### 1.4.9 Marcadores inflamatórios

Kits comerciais de imunoenensaio enzimático (ELISA) foram utilizados para avaliar os níveis séricos de interleucina 6 (IL-6) (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Bender MedSystems, Viena, Áustria) e TNF- $\alpha$  (Bender MedSystems, Viena, Áustria), conforme protocolo do fabricante. A absorbância das amostras foi medida a 450 nm em um leitor de microplacas. Para determinar a concentração de cada citocina, uma curva de calibração de seis pontos foi construída usando padrões específicos.

#### 1.4.10 Análise estatística

Os valores são apresentados como média dos mínimos quadrados  $\pm$  erro padrão (n = 6). Os efeitos da dieta, do Tucum-do-Cerrado e da interação dieta x Tucum-do-Cerrado foram analisados por meio de um planejamento fatorial 2 x 2. Assumiu-se homogeneidade das variâncias entre os tratamentos e, após a análise de variância, as interações significativas entre os fatores foram desdobradas e comparadas pelo teste de Tukey. O método box plot foi usado para remover os outliers. Todas as análises foram realizadas usando PROC GENMOD no software SAS/STAT® (SAS OnDemand, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e a significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## REFERÊNCIAS

1. Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; v. 105, n. C, p. 121–126.
2. Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., et al. (2017). Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *The New England Journal of Medicine*, 377, 13-27.
3. Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Aug;28(8):919-924.
4. Baginski, E. S., Foà, P. P., & Zak, B. Glucose-6-phosphatase. *Methods of enzymatic analysis*. 1974.
5. Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, Abate N, Aronne LJ, Brown WV, Gonzalez-Campoy JM, Jones SR, Kumar R, La Forge R, Samuel VT. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 2013;7(4):304-83.
6. Beelen, M., Burke, L. M., Gibala, M. J., & van Loon, L. J. (2010). Nutritional strategies to promote postexercise recovery. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20(6), 515-532
7. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 1999; v. 299, n. 1995, p. 15–27.
8. Berg, CM; Strandhagen E, Mehlig K, Subramoney S, Lissner L, Björck L. Normal weight adiposity in a Swedish population: how well is cardiovascular risk associated with excess body fat captured by BMI? *Obes Sci Pract* 2015; 1:50-8.
9. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry*. 7th edition. New York: W.H. Freeman.
10. Boeing JS, Ribeiro D, Chisté RC, Visentainer JV, Costa VM, Freitas M, et al. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa Mart.* fruit against oxidative/nitrosative stress. *Food Chem* 2017;220:427–37.
11. Bragança MLBM, de Oliveira BR, Fonseca JM, Batalha MA, Boguea EG, Coelho CCN da S, et al. Assessment of blood biomarkers in adolescents classified by body mass index and body fat percentage. *Cadernos de Saúde Pública* 2020;36.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. *Vigitel Brasil 2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2021 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis.* – Brasília: Ministério da Saúde.
13. Cai Q, Chen F, Wang T, Luo F, Liu X, Wu Q, He Q, Wang Z, Liu Y, Liu L, Chen J, Xu L. Obesity and COVID-19 Severity in a Designated Hospital in Shenzhen, China. *Diabetes Care.* 2020 Jul;43(7):1392-1398. doi: 10.2337/dc20-0576. Epub 2020 May 14. PMID: 32409502.
14. Candan, N.; Tuzmen, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead , aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *NeuroToxicology.* v. 29, p. 708–713, 2008.
15. Cao Y, Zhang Y, Chen S, Zhao S, Chen C, Hu Y, Zhang X. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of bone fracture in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes, obesity & metabolism.* 2019 Jan;21(1):260-70. PMID: 30264426.
16. Campbell, L.; Yu, R.; Li, F.; Zhou, Q.; Chen, D.; Qi, C.; Yin, Y.; Sun, J. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy Dovepress Modulation of fat metabolism and gut microbiota by resveratrol on high-fat diet-induced obese mice. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 2019, 12, 97–107.
17. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:37.
18. Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res.* 2011;158(6):369-84.
19. Coelho DF, Pereira-Lancha LO, Chaves DS, Diwan D, Ferraz R, Campos-Ferraz PL, Poortmans JR and Lancha Junior AH. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Braz J Med Biol Res,* October 2011, Volume 44(10) 966-972.
20. Coelho, W. S.; Costa, K. C.; Sola-Penna, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme

- altering its intracellular localization. *Molecular genetics and metabolism*. 2007; v. 92, n. 4, p. 364–370.
21. Da Cunha, M.S.; Siqueira, E.M.; Trindade, L.S. and Arruda, S.F. "Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis". *J Nutr Biochem*, vol. 25, no. 10, pp. 1035-1044, 2014.
  22. Dantas MBVC, Júnior ORP, Campos LTP, Campos ÉG. Compounds of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) fruit with antioxidant activity. *Nat Prod Res*. 2022 Jun 7:1-5. doi: 10.1080/14786419.2022.2085698. Epub ahead of print. PMID: 35671367.
  23. de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2012 May;71(2):332-8.
  24. El Sebaei, M.; Mohamed El-Bahr, S.; Al-Nazawi, M. and Abdel-Raheem, S. Effects of Green Tea on Adipose Gene Expression, Hepatic Antioxidants and Lipid Profile in Obese Male Rats. *International Journal of Pharmacology*, 2019. 15: 542-548.
  25. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:221-245.
  26. Essafi-Benkhadir, K.; Refai, A.; Riahi, I.; Fattouch, S.; Karoui, H.; Essafi, M. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Peel Polyphenols Modulate LPS-Induced Inflammation in Human THP-1-Derived Macrophages through NF-KB, P38MAPK and Akt Inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012, 418, 180–185.
  27. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi HI. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 12;23(2):786. doi: 10.3390/ijms23020786. PMID: 35054972; PMCID: PMC8775991.
  28. Gao M, Zhao Z, Lv P, Li Y, Gao J, Zhang M, et al. Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biol* 2015;6:206–17.
  29. Gastaldelli A, Toschi E, Pettiti M, Frascerra S, Quinones-Galvan A, Sironi AM, Natali A, Ferrannini E. Efeito da hiperinsulinemia fisiológica na gliconeogênese em indivíduos não diabéticos e em pacientes diabéticos tipo 2. *Diabetes*. 2001; 50 :1807-1812.
  30. Gjermeni E, Kirstein AS, Kolbig F, Kirchhof M, Bundalian L, Katzmann JL, Laufs U, Blüher M, Garten A, Le Duc D. Obesity-An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances. *Biomolecules*. 2021 Sep 29;11(10):1426.

31. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:860479. PMID: 24790705; PMCID: PMC3984781.
32. Gopal, S. S. et al. Lactucaxanthin - a potential anti-diabetic carotenoid from lettuce (*Lactuca sativa*) inhibits alpha-amylase and alpha-glucosidase activity in vitro and in diabetic rats. *Food & function*. 2017; v. 8, n. 3, p. 1124–1131.
33. Gropper, S. S., Smith, J. L., & Carr, T. P. (2019). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Cengage Learning. doi.org/10.1016/B978-0-12-374118-2.00025-4
34. Guezennec, C. Y., Satabin, P., Duforez, F., & Merino, D. (1994). Oxidation of glucose, fructose, and galactose in a swimming muscle. *Journal of Applied Physiology*, 77(1), 101-104.
35. Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). *Methods in Enzymology*. 1981; v. 77, n. C, p. 218–231.
36. Halpern B, Mancini MC, Melo ME, Lamounier RN, Moreira RO, Carra MK, Kyle TK, et al. Proposal of an obesity classification based on weight history: an official document by the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) and the Brazilian Society for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome (ABESO). *Arch. Endocrinol. Metab*. 2022;66(2):139-51.
37. Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*, v. 48, n. 2, p. 422–427, ago. 1972.
38. Hasani-Ranjbar, S., Jouyandeh, Z., & Abdollahi, M. (2013). A systematic review of anti-obesity medicinal plants—An update. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 28.
39. Hayanga, J. A. et al. Grapefruit juice improves glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic gluconeogenesis. *European journal of nutrition*. 2016; v. 55, n. 2, p. 631–638.
40. Heibel, A.B.; da Cunha, M. de S.B.; Ferraz, C.T.S. and Arruda, S.F. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa Mart.*) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition. *Food Research International*, 113 (2018), pp. 433-442, 10.1016/j.foodres.2018.07.032
41. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New Engl J Med*. 2017; 376(3): 254- 266.

42. Hurrell S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 2017;40(5):257-262.
43. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821- 1835, Jun 15 2011.
44. Jha D and Mazumder PM. High fat diet administration leads to the mitochondrial dysfunction and selectively alters the expression of class 1 GLUT protein in mice. *Mol Biol Rep.* 2019 Apr;46(2):1727-1736.
45. Jensen, J. Regulation of glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle: molecular mechanisms (2009). *Essays in Biochemistry*, 45, 165-181. doi: 10.1042/bse0450165
46. Joannisse, D. R.; Storey, K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* 1996; v. 271, n. 3 40-3.
47. Kahn, B.B. (2019). Understanding the complexity of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 7723-7725. doi: 10.1073/pnas.1903480116.
48. Kahn Shoelson, S.E., Lee, J., & Goldfine, A.B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793-1801. doi: 10.1172/JCI29069.
49. Kampmann U, Christensen B, Nielsen TS, et al. GLUT4 and UBC9 protein expression is reduced in muscle from type 2 diabetic patients with severe insulin resistance. *PLoS One.* 2011;6:e27854.
50. Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J. Papel da microbiota intestinal na biodisponibilidade e funções fisiológicas de polifenóis dietéticos. *Moléculas.* 2019;24(2):370. Publicado em 21 de janeiro de 2019.
51. Kim, Y., Keogh, J. B., Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*, 8(1).
52. Kolotkin RL, Andersen JR. A systematic review of reviews: exploring the relationship between obesity, weight loss and health-related quality of life. *Clinical Obesity.* 2017; 7(5):273–89.
53. Lo, S.; Russell, J. C.; Taylor, A. W. Determination of Glycogen in Small Tissue Samples. *Journal of applied physiology*, v. 28, n. 2, p. 234–236, fev. 1970.

54. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019 May 13;20(9):2358. PMID: 31085992; PMCID: PMC6539070.
55. Malacrida, C. R.; Motta, S. Total phenolics and anthocyanins in grape juice. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, v. 25, n. 4, 2005.
56. Malireddy, S.; Kotha, S.R.; Secor, J.D.; Gurney, T.O.; Abbott, J.L.; Maulik, G.; Maddipati, K.R.; Parinandi, N.L. Phytochemical Antioxidants Modulate Mammalian Cellular Epigenome: Implications in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2012, 17, 327–339.
57. Manisha, S., Thilini, T., Ravi, S., Benu, A., 2020. Managing obesity through natural polyphenols: a review. *Future Foods* 1-2, 100002.
58. Marin, A. M.; Siqueira, E. M.; Arruda, S. F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. *Int J Food Sci Nutr*, v. 60 Suppl 7, p. 180-90, 2009.
59. Matsuzawa Y. Insight Therapy: adipocitocinas na síndrome metabólica e doenças cardiovasculares relacionadas. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3:35–42
60. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55. PMID: 5389100.
61. Mccord, J. M. Analysis of superoxide dismutase activity. *Curr Protoc Toxicol*, v. Chapter 7, p. Unit7 3, 2001.
62. Meurling IJ, Shea DO, Garvey JF. Obesity and sleep: a growing concern. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 2019; 25(6):602–8. PMID: 31589189
63. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 2009; 4: e5045. 11.
64. Mosa, R. A. et al. In vivo antihyperglycemic activity of a lanosteryl triterpene from *Protorhus longifolia*. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2015; v. 20, n. 7, p. 13374–13383.
65. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasad I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol.* 2022 Jul 4;13:907750. PMID: 35860250; PMCID: PMC9289681.
66. Pearce C, Rychetnik L, Wutzke S, Wilson A. Obesity prevention and the role of hospital and community-based health services: a scoping review. *BMC Health Serv*

- Res. 2019 Jul 5;19(1):453. doi: 10.1186/s12913-019-4262-3. PMID: 31277640; PMCID: PMC6612151.
67. Peraldi P, Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem.* 1998 May;182(1-2):169-75. PMID: 9609126.
  68. Pomplun D, Voigt A, Schulz TJ, Thierbach R, Pfeiffer AF, Ristow M. Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6377-6381. 12.
  69. Rajan T, Menon V. Psychiatric disorders and obesity: A review of association studies. *Journal of Postgraduate Medicine.* 2017; 63(3):182–90.
  70. Recio, M.; Andujar, I.; Rios, J. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19, 2088–2103. [CrossRef] [PubMed]
  71. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
  72. Rhodes RSS, Singh SK, Rajendran VM, Walk ST, Coon SD. Regulation of Glucose Insulinotropic Peptide and Intestinal Glucose Transporters in the Diet-Induced Obese Mouse. *J Diabetes Res.* 2022 Feb 17;2022:5636499. doi: 10.1155/2022/5636499. PMID: 35224107; PMCID: PMC8872650.
  73. Riaz H, Khan MS, Siddiqi TJ, Usman MS, Shah N, Goyal A, Khan SS, Mookadam F, Krasuski RA, Ahmed H. Association Between Obesity and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis of Mendelian Randomization Studies. *JAMA Netw Open.* 2018 Nov 2;1(7):e183788. PMID: 30646365; PMCID: PMC6324374.
  74. Richert, S. et al. Assessment of Skin Carbonyl Content as a Noninvasive Measure of Biological Age 1. v. 397, n. 2, p. 430–432, 2002.
  75. Rosa, F.R, Arruda, A. F., Siqueira, E. M., & Arruda, S. F. (2016). Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's native fruit. *Nutrients*, 8, 110-127.
  76. Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with <sup>13</sup>C NMR. *Science.* 1991 Mar 22;251(5000):573-6. PMID: 1992343.
  77. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* 2015 Mar 2;208(5):501-12. PMID: 25733711; PMCID: PMC4347644.



78. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec;414(6865):799-806. PMID: 11742412.
79. Santamarina, A. B., Jamar, G., Mennitti, L. V., C'esar, H. de C., de Rosso, V. V., Vasconcelos, J. R., & Pisani, L. P. (2018). Supplementation of Juçara berry (*Euterpe edulis mart.*) modulates epigenetic markers in monocytes from obese adults: A double-blind randomized trial. *Nutrients*, 10(12), 1–15.
80. Schlecht I, Fischer B, Behrens G, Leitzmann MF. Relations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue, body mass index, and waist circumference to serum concentrations of parameters of chronic inflammation. *Obes Facts* 2016; 9:144-57.
81. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, Luscombe-Marsh N. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. *Front Physiol*. 2019 May 3;10:532. PMID: 31130874; PMCID: PMC6510277.
82. Shan S, Huang X, Shah MH, Abbasi AM. Evaluation of polyphenolics content and antioxidant activity in edible wild fruits. *Biomed Res Int*. (2019) 2019:1381989.
83. Silva D. B.; Silva, J. A.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. M. *Frutas do cerrado*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p
84. Siqueira EM, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PLoS One*. 2013 Aug 21;8(8):e72826. PMID: 23991156; PMCID: PMC3749143.
85. Siroma TK, Machate DJ, Zorretto-Pinheiro VA, Figueiredo PS, Marcelino G, Hiane PA, Bogo D, Pott A, Cury ERJ, Guimarães RCA, Vilela MLB, Ferreira RDS, do Nascimento VA. Polyphenols and  $\omega$ -3 PUFAs: Beneficial Outcomes to Obesity and Its Related Metabolic Diseases. *Front Nutr*. 2022 Jan 17;8:781622. PMID: 35111795; PMCID: PMC8802753.
86. Sizer, F. S., & Whitney, E. (2011). *Nutrition: Concepts and Controversies* (12th ed.). Belmont, CA: Wadsworth Cengage Learning.
87. Slimani, N., Deharveng, G., Southgate, D. A., Biessy, C., Chajès, V., van Bakel, M. M., Boutron-Ruault, M. C., McTaggart, A., Grioni, S., Verkaik-Kloosterman, J., Huybrechts, I., Amiano, P., Jenab, M., Vignat, J., Bouckaert, K., Casagrande, C., Ferrari, P., Feskens, E., Ocke, M. C., Riboli, E. (2020). Contribution of highly industrially processed foods to the nutrient intakes and patterns of middle-aged

- populations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(2), 235-248
88. Smith, J. D. (2015). Carbohydrate digestion and absorption. *Journal of Nutrition*, 145(5), 867-871.
  89. Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Gatto Jr, G. J. (2017). *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. (p.598-600)
  90. Sun, Y.; Oberley, L. W.; Li, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.
  91. Sunehag, A. L. (2017). Glucose metabolism in the liver. In *Metabolism in the Liver* (pp. 1-10). Springer, Cham.
  92. Taslimi, P., & Gulçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on  $\alpha$ -glycosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>
  93. Tian X, Chen S, Wang P, Xu Q, Zhang Y, Luo Y, Wu S, Wang A. Insulin resistance mediates obesity-related risk of cardiovascular disease: a prospective cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Dec 23;21(1):289. doi: 10.1186/s12933-022-01729-9. PMID: 36564775; PMCID: PMC9789633.
  94. Torelli Hijo AH, Coutinho CP, Alba-Loureiro TC, Moreira Leite JS, Bargi-Souza P, Goulart-Silva F. High fat diet modulates the protein content of nutrient transporters in the small intestine of mice: possible involvement of PKA and PKC activity. *Heliyon*. 2019 Oct 11;5(10):e02611. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02611. PMID: 31667423; PMCID: PMC6812199.
  95. Tresserra-Rimbau, A., Guasch-Ferré, M., Salas-Salvadó, J., Toledo, E., Corella, D., Castañer, O., Lamuela-Raventós, R. M. (2016). Intake of total polyphenols and some classes of polyphenols is inversely associated with diabetes in elderly people at high cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, **146**, 767– 777.
  96. Ulman, E. A. The “Original” High-Fat Diets for Diet Induced Obesity. p. 1–3, 2011.
  97. Urdaneta Perez MG, Garwe T, Stewart K, et al. Obesity is an Independent Risk Factor for Mortality in Otherwise Healthy Patients After Hepatectomy. *J Surg Res* 2020;255:50-7.
  98. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):195–203.

99. Vargas E, Joy NV, Carrillo Sepulveda MA. Biochemistry, Insulin Metabolic Effects. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30252239.
100. Vieira, R F; Agostini-Costa, T S; Silva, D B; Sano, S M; Ferreira, F R. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 1º edição, 322 p
101. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52 (3): 537-539.
102. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21: 697-738.
103. Wang L, Wang H, Zhang B, Popkin BM, Du S. Elevated Fat Intake Increases Body Weight and the Risk of Overweight and Obesity among Chinese Adults: 1991-2015 Trends. *Nutrients*. 2020 Oct 26;12(11):3272. PMID: 33114561; PMCID: PMC7694029.
104. Wasowick, W.; NEVE, J.; PERETZ, A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid–reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*. 1993; 39:2522– 6.
105. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR (2008) Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(3):R673–R680.
106. Wen X, Zhang B, Wu B, Xiao H, Li Z, Li R, Xu X, Li T. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Aug 28;7(1):298. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Oct 21;7(1):369. PMID: 36031641; PMCID: PMC9420733.
107. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. World Health Organization.
108. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26(2):19–39.
109. World Obesity Federation. Obesity: missing the 2025 global targets, Trends, Costs and Country Reports. 2020. 2nd edn. Available at: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-day-missing-the-targets-report>. Accessed July 9, 2021.

110. Xu H, Barnes G, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou C, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* (2003) 112:1821–30. [10.1172/JCI200319451](https://doi.org/10.1172/JCI200319451)
111. Zhang, A. J., Rimando, A. M., Mizuno, C. S., & Mathews, S. T. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 47.
112. Zhang, X., Xie, C., Lin, X., & Zhou, Y. (2020). Glucose metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and targets. *Journal of Cancer*, 11(9), 2091-2100. <https://doi.org/10.7150/jca.40119>
113. Zhu, J.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Xiang, Y.; Tong, X.; Yu, Y.; Qiu, Y.; Cui, S.; Zhao, Q.; Wang, N.; Jiang, Y.; Zhao, G. Obesity and Dyslipidemia in Chinese Adults: A Cross-Sectional Study in Shanghai, China. *Nutrients* **2022**, *14*, 2321. <https://doi.org/10.3390/nu14112321>

## CAPÍTULO 2

Artigo Original

**Ameliorating the impairment of glucose utilization in a high-fat diet-induced obesity model through the consumption of Tucum-do-Cerrado (*Bactris Setosa Mart.*)**

**Ameliorating the impairment of glucose utilization in a high-fat diet-induced obesity model through the consumption of Tucum-do-Cerrado (*Bactris Setosa Mart.*)**

Ananda de Mesquita Araújo<sup>1\*</sup> and Sandra Fernandes Arruda<sup>2</sup>

1 Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

2 Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

**\*Corresponding author:** Ananda de Mesquita Araújo. Faculty of Health Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil. Phone: +55 (61) 31071635. e-mail: [nutriananda.araujo@gmail.com](mailto:nutriananda.araujo@gmail.com)

## **Abstract**

**Introduction:** We evaluated the effect of Tucum-do-Cerrado on glucose metabolism homeostasis and its relationship with redox-inflammatory responses in a high-fat (HF) diet-induced obesity model. **Results:** The HF diet increased energy intake, feed efficiency, body weight, muscle and hepatic glycogen, insulin, homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA IR) and beta ( $\beta$ )-cell function, and gut catalase (CAT) activity, and decreased food intake, hepatic glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST), and superoxide dismutase (SOD) activities, hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1), and intestinal solute carrier family 5 member 1 (Slc5a1) mRNA levels compared with the control diet. However, the HF diet with Tucum-do-Cerrado decreased hepatic glycogen, and increased hepatic GR activity, hepatic Slc2a2 mRNA levels and serum Tnfa compared with the HF diet. Tucum-do-Cerrado decreased muscle glycogen, intestinal CAT and GPX activities, muscle PFK-1 and HK activities, and increased hepatic protein (CARB) and intestinal lipid (MDA) oxidation, hepatic GST activity, serum antioxidant potential, hepatic phosphofructokinase-1 (PFK-1) activity, intestinal solute carrier family 2 member 2 (Slc2a2), tumor necrosis factor (Tnf), interleukin-1 beta (Il1b), muscle protein kinase AMP-activated alpha 1 (Prkaa1), solute carrier family 2 member 2 (Slc2a2) mRNA levels, and serum interleukin-6 (IL-6) levels, regardless of diet type. **Conclusion:** Tucum-do-Cerrado consumption may ameliorate impaired glucose utilization in a HF diet-induced obesity model by increasing liver and muscle glucose uptake and oxidation. These data suggest that Tucum-do-Cerrado consumption improves muscle glucose oxidation in non-obese and obese rats. This response may be related to the improvement in the total antioxidant capacity of rats.

**Keywords:** obesity; glucose; metabolism; Tucum-do-Cerrado; redox; inflammation.

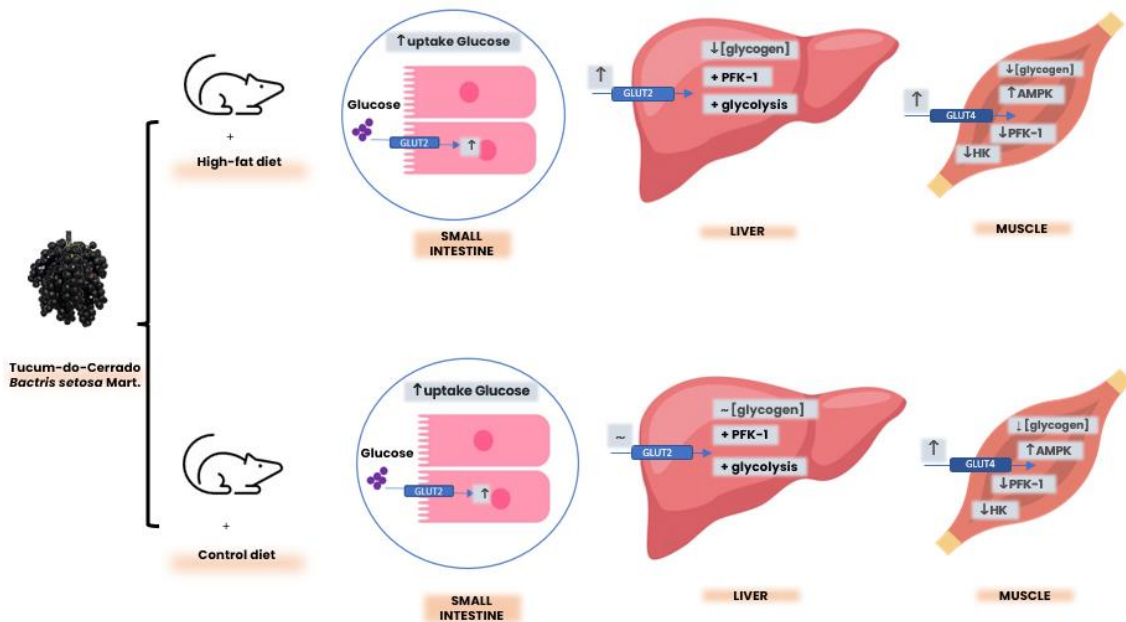


Fig. 1 – Graphical abstract.

## 1. Introduction

The prevalence of obesity and overweight population has doubled since 1980 [1]. According to the World Health Organization, 39% of adults aged 18 years and over were overweight in 2016, and 13% were obese [2]. Obesity is a metabolic disorder characterized by the excessive accumulation of adipose tissue associated with low-grade chronic inflammation and oxidative stress, which may impair health [3–5]. Chronic low-grade systemic inflammation and oxidative stress have been linked to the development of chronic diseases such as metabolic syndrome, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and some types of cancer [6,7].

Therefore, effective strategies to prevent and treat obesity are necessary to reduce the burden of chronic diseases. Dietary components, such as polyphenols, found mainly in fruits and vegetables, have been associated with health promotion and, consequently, the prevention and reduction of obesity and metabolic complications associated with obesity [8]. Mezhibovsky et al. (2021) [9] showed that mice treated with a western diet (high in fats and sugars) supplemented with 1% grape polyphenols had higher lean mass, energy expenditure, and lower body weight. Grape polyphenols also enhanced ileal mRNA levels of glucose transporter-2 (*Slc2a2*, indicating higher glucose uptake) and the expression of ketohexokinase. The authors suggested that grape polyphenols attenuated diet-induced obesity and increased intestinal carbohydrate oxidation. Cinnamaldehyde (10mg/kg i.p.), a bioactive component of cinnamon, increased adipose tissue lipolysis, decreased fasting induced hyperphagia and inflammation in high fat diet-fed mice, suggesting its anti-obesity role [10], although these effects were not observed when a dose of



5mg/kg i.p. was used. Ballard et al. (2020) [11] showed that extracts of Tucum-do-Pantanal and Taruma-do-cerrado (100mg/kg), Brazilian fruits rich in polyphenols, prevented diet-induced body weight gain with a tendency to increase hepatic AMPK phosphorylation. However only the Tucum-do-Pantanal extract improved glucose metabolism by an improvement in the insulin tolerance test and a reduction in the insulin fasting level. Resveratrol, a polyphenol found in grapes and wine, inhibited  $\alpha$ -glucosidase activity and decreased postprandial hyperglycemia in HF diet-fed mice (30 mg/kg body weight), indicating that a delay in the digestion and absorption of carbohydrates may suppress postprandial hyperglycemia [12].

Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a palm shrub fruit found in the Brazilian savanna and is characterized by a high content of polyphenols from different classes [13]. Flavanols, anthocyanins, and flavones are the major classes of phenolic compounds found in Tucum-do-Cerrado. Higher polyphenol content and antioxidant activity is found in Tucum-do-Cerrado peel than in the pulp [14]. Several *in vivo* studies conducted by our group have demonstrated the beneficial effects of Tucum-do-Cerrado on health. Heibel et al. (2018) [15] demonstrated that Tucum-do-Cerrado consumption induced hepatic Prkaa1 $\alpha$  and Prkaa2  $\alpha$ , and consequently inhibited gluconeogenic rate limiting enzyme, glucose-6-phosphatase, and upregulated GLUT-2 glucose uptake. In an animal model of iron-induced oxidative stress, the consumption of Tucum-do-Cerrado protected tissues against oxidative damage by reducing iron availability in the liver and consequently inhibited Hamp expression (hepcidin) [16]. In another study, the authors observed that Tucum-do-Cerrado had an anti-aging effect, enhancing NAD<sup>+</sup>-dependent histone/protein deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) expression, which activated the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) pathway that attenuates oxidative damage to proteins and the inflammatory response induced by excess iron [17].

Considering the high polyphenol content and antioxidant and anti-inflammatory properties of Tucum-do-Cerrado, this study evaluated its' effect on the homeostasis of glucose metabolism and its interrelationships with redox-inflammatory responses in HF diet-induced obesity (Figure 1).

## **2. Methods**

### **2.1 Fruits**

The Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) fruits were purchased in Terezópolis de Goiás, Goiás, Brazil, in March, at full maturity. The fruits were washed with distilled water and stored at -80°C. After, in an environment protected from light, the seeds were removed and discarded from the frozen fruits, while the pulp and peel were homogenized using a mixer, freeze-dried (Beta 2-8 LSC plus, Martin Christ, Nova Analítica Ltda, São Paulo, Brazil) and stored at -

80°C until rats' feed was prepared. The amount of Tucum-do-Cerrado fruit (150 g of pulp and peel fresh weight/kg of feed) added to rats' feed was defined according to our previous study [17], which showed that this amount of Tucum-do-Cerrado had an anti-aging effect. After the freeze-drying process, the 150 g of fresh Tucum-do-Cerrado pulp and peel yielded 28 g of powder. Therefore, 28 g of freeze-dried pulp and peel of Tucum-do-Cerrado/kg of diet were mixed with the other diet ingredients until a homogenous mixture was obtained, and then the diet was pelleted.

## 2.2 Treatment

The project was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasília, under protocol number 25/2018, on May 8, 2018. The experiment with animals was conducted following the guidelines Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE). 24 newborn male Wistar rats (21 days), mean weight  $67.4 \pm 6.0$ g, were individually housed in stainless steel cages in a room with light/dark cycles of 12/12 h and temperature of  $22 \pm 1$ °C. The rats had free access to water and access to diet during the dark cycle.

After seven days of acclimatization with the standard rodent diet AIN-93G [18], the animals were randomly assigned to one of four experimental groups (n = 6): control group (CT-), which was fed with an AIN-93G diet; control + Tucum-do-Cerrado group (CT+) which was fed with an AIN-93G diet containing 28 g of freeze-dried Tucum-do-Cerrado pulp and peel/kg diet; high-fat group (HF-) which was fed with the AIN-93G diet containing 58% fat –(fat sources were 51.9% of lard and 6.1% of soybean oil, according to the Obesity Induction Diet described by the Research Diet [19] or high-fat + Tucum-do-Cerrado group (HF+) which was fed with an AIN-93G containing 58% fat and 28 g of freeze-dried Tucum-do-Cerrado pulp and peel/kg diet. After eight weeks of treatment, the rats were anesthetized using isoflurane, and the blood was collected by cardiac puncture. The liver, muscle and small intestine were excised, rinsed with saline, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The daily food intake of the rats and their weekly weight measurements were recorded. The feed efficiency ratio was calculated according to the equation (Eq.1). The authors of the study were involved in overseeing the experiment and were aware of the group allocation to ensure proper implementation.

**Eq. 1** – Feed efficiency ratio

$$\text{Feed efficiency} = \frac{\text{Body weight gain (g)}}{\text{Food intake (g)}} \quad (1)$$

### 2.3 Glycemia and insulin

Fasting serum glucose concentration was determined using a glycosometer (Accu-check, Roche, Indianapolis, USA). Fasting plasma insulin concentration was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA) according to the manufacturer's assay protocol (Millipore Corporation, Missouri, USA). The indices insulin resistance (HOMA IR) and  $\beta$ -cell function (HOMA beta) were calculated using the below-mentioned equations 2 e 3.

Eq. 2 – Indice insulin resistance (HOMA IR)

$$HOMA\ IR = \frac{blood\ glucose\ (mmol/L) \times serum\ insulin\ (mU/L)}{22.5} \quad (2)$$

Eq. 3 – Indice  $\beta$ -cell function (HOMA beta)

$$HOMA\ beta = \frac{20 \times insulinemia\ (\mu U/L)}{blood\ glucose\ (mmol/L) - 3.5} \quad (3)$$

### 2.4 Hepatic and muscle glycogen concentration

Glycogen concentration in the liver and muscle was determined using the method described by Lo et al. (1970) [20]. A reaction mixture containing 50 mg of tissue and 500  $\mu$ L of 30% potassium hydroxide solution saturated with sodium sulfate was incubated at 98°C for 30 min in a water bath. After cooling the sample on ice, a 95% ethanol solution (1.2 x vol) was added to the mixture, followed by a 30-min incubation on ice for glycogen precipitation. After sample centrifugation (840 x g for 30 min at 4°C), the glycogen precipitate was resuspended in 1 and 2 mL of distilled water for muscle and liver, respectively, and 200 mL of 5% phenol solution and 1 mL of 98% sulfuric acid solution were added to the reaction mixture. The reaction was incubated for 10 min at room temperature, followed by 20 min at 30°C in a water bath, and the absorbance was recorded at 490 nm (TCC-240A spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). A standard curve was constructed using purified type IV bovine glycogen standard solutions in the concentration range of 0-100  $\mu$ g/mL. The glycogen concentration was expressed as mg glycogen/mg tissue.

### 2.5 Oxidative damage to lipids (malondialdehyde) and proteins (carbonyl)

Hepatic and small intestine malondialdehyde concentration (MDA - a product of lipid peroxidation) was determined by fluorescence detection of the MDA-thiobarbituric acid complex, using excitation wavelength at 532 nm and emission wavelength at 553 nm (SpectraMax M3

Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, 211 Sunnyvale, CA, USA) [21]. A standard curve was obtained from the product of the acid hydrolysis of 1,1,3,3 tetraethoxypropane acid (TEP; Sigma, St. Louis, MO, USA) over a concentration range of 0.0 to 5.05 nmol/mL. Malondialdehyde (MDA) concentration in tissues was expressed as nmol MDA/mg total protein.

The concentration of carbonyl protein in the liver and small intestine was evaluated as described by Richert et al. (2002) [22]. The absorbance of the dinitrophenylhydrazine-carbonyl complex was monitored at 376 nm (Spectrophotometer, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japan). Tissue carbonyl concentrations were expressed as nmol carbonyl/mg total protein using the extinction coefficient of 22,000  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## **2.6 Total serum antioxidant capacity**

Serum antioxidant capacity was determined using the Total Ferric-Reducing Ability of Plasma assay (The FRAP Assay) according to the protocol described by Benzie and Strain (1996) [22]. The FRAP reagent was prepared daily using 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6-triazinetripyridyl in 40 mmol/L hydrochloric acid, and an aqueous solution of 20 mmol/L ferric chlorides in a proportion of 10:1:1, and incubated at 37°C for 30 min. The reaction mixture was composed of 900  $\mu\text{L}$  of FRAP reagent, 30  $\mu\text{L}$  of a serum sample, and 90  $\mu\text{L}$  of deionized water. After homogenization, the absorbance was recorded at 593 nm/4 min. A standard curve was constructed with  $\text{FeSO}_4$  solutions over a concentration range of 0 to 2,000  $\mu\text{mol/L}$ . The serum antioxidant capacity was expressed as  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$  of serum.

## **2.7 Specific activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) in liver and small intestine.**

### **2.7.1 Catalase (CAT)**

Catalase activity (CAT, EC 1.11.1.6) was determined by monitoring the consumption of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 240 nm (spectrophotometer, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japan) and the extinction coefficient of 0.0394  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for  $\text{H}_2\text{O}_2$  [23]. One unit of catalase is defined as the amount of enzyme required to decompose 1 mmol of  $\text{H}_2\text{O}_2$  per minute.

### **2.7.2 Glutathione Peroxidase (GPx)**

Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) activity was evaluated using  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate in an assay coupled with glutathione reductase-catalyzed oxidation of nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm (spectrophotometer, Shimadzu - TCC 240A, Kyoto, Japan), using an NADPH extinction coefficient of  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [24]. One unit of glutathione peroxidase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate per minute.

### **2.7.3 Glutathione reductase (GR)**

Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) specific activity was determined by monitoring the consumption of NADPH at 340 nm for 20 s, as described by Joannis and Storey [24]. The enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of NADPH of  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 340 nm. One unit of glutathione reductase corresponds to the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol NADPH / min.

### **2.7.4 Glutathione S-transferase (GST)**

The specific activity of Glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) was determined by the detection of the S-2,4-dinitrophenyl-glutathione complex at 340 nm [25]. Enzyme activity was quantified using the  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  extinction coefficient of the S-2,4-dinitrophenyl-glutathione complex. One unit of glutathione-s-transferase was defined as the amount of enzyme required to produce 1 nmol of product/min.

### **2.7.5 Superoxide Dismutase (SOD)**

The determination of SOD activity was performed according to the protocol described by Mccord (2001) [26]. The assay consists of measuring the ability to inhibit the reduction of cytochrome C catalyzed by superoxide ion. The kinetics of the cytochrome c reduction reaction was monitored by reading the absorbance at 550 nm. One unit (U) of SOD corresponded to the amount of enzyme necessary to inhibit by 50% the reduction of cytochrome c. The results were expressed as U enzyme/mg of protein.

## **2.8 Enzymatic activity of $\alpha$ -glucosidase (GLY), glucokinase (GK), hexokinase (HK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase)**

To measure  $\alpha$ -glucosidase activity, frozen intestinal samples were homogenized 1:10 (w/v) in 0.9% saline solution in an electric homogenizer at 4°C, followed by centrifugation at  $10,000 \times g/20 \text{ min}$  at 4°C. The homogenates for the analysis of glucokinase (GK), hexokinase (HK), and phospho-fructokinase-1 (PFK1) activity were prepared from the frozen liver and muscle samples homogenized in a 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol and 250

mM sucrose buffer solution (pH 7.5) at 4°C, in a proportion of 1:5 (w/v). Subsequently, the homogenates were centrifuged at 1,000 x g at 4°C for 10 min [27].

Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) homogenates were prepared at 4°C in a buffer solution containing 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl<sub>2</sub> using an electric homogenizer, in a proportion of 1:10 (w/v). The homogenates were centrifuged at 11,000 x g at 4°C for 30 min. The supernatant was transferred to another tube and centrifuged at 105,000 x g at 4°C for 60 min. The pellet was resuspended in a sucrose/EDTA (0.25 M/1 mM) solution in a proportion of 2:1 (weight of homogenized tissue/sucrose/EDTA volume) and used to determine the G6Pase activity, while the cytosolic fraction (supernatant) was used to measure the activity of the PEPCK enzyme.

### **2.8.1 Intestinal $\alpha$ -glucosidase**

The enzymatic activity of  $\alpha$ -glucosidase (GLY, EC 3.2.1.8) was evaluated according to the method described by Gopal et al. (2017) [28], with minor modifications. The assay is based on the formation of p-nitrophenol from the 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, which was detected at 340 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Micro plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The results were expressed as nmol p-nitrophenol/min/mg protein.

### **2.8.2 Hepatic Glucokinase and muscular hexokinase activity**

The activities of glucokinase (GK, EC 2.7.1.2) and hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) were determined according to the method proposed by Mosa et al. (2015) [29]. The reaction consists in monitoring the formation of NADPH, catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase in the presence of glucose and tissue homogenates, at 340 nm for 3 min (TCC-240A spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Glucokinase activity was determined by the difference between the formation of NADPH in the presence of 100 mM and 5 mM glucose in the reaction medium. Muscle hexokinase activity was determined using the amount of NADPH formed in the presence of 5 mM glucose. The enzymatic activity was expressed as nmol of NADPH/min/mg of protein, using a molar extinction coefficient of 6.22 mM<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup>.

### **2.8.3 Glucose-6-phosphatase activity in the liver**

The activity of glucose-6-phosphatase (G6Pase) in the liver was evaluated by monitoring the production of molybdate-phosphorus complex, which absorbs energy at a wavelength of 840 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), as described by Baginski and collaborators (1974) [30]. The results were expressed as nmol of inorganic phosphate/min/mg protein.

#### **2.8.4 Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in the liver**

Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) enzyme activity was determined as described by Hayanga et al. (2016) [31]. The cytosolic fraction of the homogenates was used to determine the enzymatic activity by the malate dehydrogenase-coupled assay. The rate of NADH oxidation was monitored at 340 nm for 3 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The rate of NADH oxidation was calculated using a molar extinction coefficient of  $6.22 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ , and the enzymatic activity was expressed as nmol of NADH/min/mg of protein.

#### **2.8.5 Phosphofructokinase-1 (PFK1) in the liver and muscle**

The activity of the phosphofructokinase-1 (PFK1) enzyme was determined as described by Coelho et al. (2007) [27], using the triose phosphate isomerase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase enzymatic-coupled assay, which detects the oxidation NADH at 340 nm during 20 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The results were expressed as the oxidation of NADH/min/mg of protein.

### **2.9 Determination of transcript levels of Ppck1 (PEPCK), Prkaa1 and Prkaa2 (AMPK subunits $\alpha 1$ and $\alpha 2$ ), Slc2a2 (GLUT2), Slc2a4 (GLUT4), Slc5a1 (SGLT1)**

#### **2.9.1 Total RNA extraction and cDNA synthesis**

The extraction of total tissue RNA was done using TRIzol™ reagent (Invitrogen Inc., Burlington, ON, Canada) as described by da Cunha et al. (2014) [32], with some modifications. The tissues were homogenized using a cell/tissue disruptor (L-beader 6, Cotia, São Paulo, Brazil). The liver was homogenized in tubes prefilled with 1 mm zirconium beads using 2 cycles of 3,670 rpm/30 s (between cycles the samples were left on ice for 30 s), while for muscle, tubes prefilled with 2.8 mm stainless steel beads were used, and 3 cycles of 3,670 rpm/45 s (between cycles the samples were left on ice for 45 s). The intestine was homogenized in tubes prefilled with 3 mm zirconium beads using 4 cycles of 3,470 rpm/40 s (between cycles the samples were left on ice for 40 s).

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The transcript levels of intestinal solute carrier family 2 member 2 (Slc2a2/Glut2) and solute carrier family 5 member 1 (Slc5a1); hepatic solute carrier family 2 member 2 (Slc2a2/Glut2), phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1), protein kinase AMP-activated

catalytic subunit alpha 1 (Prkaa1) and protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 (Prkaa2); and muscle solute carrier family 2 member 4 (Slc2a4/Glut4), protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (Prkaa1) and protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 (Prkaa2) were determined using real-time polymerase chain reaction (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Singapore). A qRT-PCR reaction was assembled using 5.0  $\mu$ L Fast SYBR Green Master Mix 2 $\times$  reagent, 2.0  $\mu$ L of cDNA, and 0.2  $\mu$ mol/L of each primer, in a final volume of 10  $\mu$ L. The sequences of the forward (FW) and reverse (RW) primers used for real-time PCR reactions are described in Table 1. The specificity of each amplicon was evaluated by melting curve. The comparative CT method was used to quantify the abundance of target gene mRNA, and the results were presented as  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [33]. All samples were assayed in triplicate and were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -actin (Actb) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh).

**Table 1** - Primers sequences used for amplification of genes by real-time PCR assays and the GenBank accession numbers.

<b>GENE</b>	<b>Primers sequences (5' - 3')</b>	<b>GenBank accession number</b>
<b>Act<math>\beta</math></b> <b>(<math>\beta</math>-Actin)</b>	GTCGTACCACTGGCATTGTG	NM_031144
<b>Il1b</b> <b>(IL-1<math>\beta</math>)</b>	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	NW_047658
<b>Gapdh</b> <b>(GAPDH)</b>	GGGTTCATGGTGAAGTCAAC TGCCCCATGTTTGTGATG GCTGACAATCTTGAGGGAGTTGT	NW_0476961
<b>Prkaa1</b> <b>(AMPK-<math>\alpha</math>1)</b>	GAAGTCAAAGCCGACCCAAT AGGGTTCTTCCTTCGCACAC	NM_019142
<b>Prkaa2</b> <b>(AMPK-<math>\alpha</math>2)</b>	ATGATGAGGTGGTGGAGCAG GTGAATGGTTCTCGGCTGTG	NM_023991
<b>Pck1</b> <b>(PEPCK)</b>	GCC TGT GGG AAA ACC AAC CAC CCA CAC ATT CAA CTT TCC A	NM_198780
<b>Slc2a2</b> <b>(GLUT2)</b>	AAAGCCCCAGATACCTTTACCT TGCCCCTTAGTCTTTTCAAGC	NM_012879
<b>Slc2a4</b> <b>(GLUT4)</b>	TTGCAGTGCCTGAGTCTTCTT CCAGTCACTCGCTGCTGA	NM_012751.1
<b>Slc5a1</b>	GAAGGGTGCATCGGAGAAG	NM_013033.2



(SGLT1)

CAATCAGCACGAGGATGAAC

**Tnf**  
(TNF)

AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC

X66539

GTCGTAGCAAACCAAGCAGA

---

## 2.10 Cytokine Serum Levels

Commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits were used to assess serum levels of IL-6 (; - Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (Bender, MedSystems, Vienna, Austria) IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ .

## 2.11 Statistical analysis

Values are presented as least square means and 95% confidence interval (n = 6). The effects of the diet, Tucum-do-Cerrado, and diet  $\times$  Tucum-do-Cerrado interactions were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA). Homogeneity of the variances between treatments was assumed, and after variance analysis, when interaction between the factors were significant (p < 0.05) means were compared using Tukey's test. The box plot method was used to remove outliers. All analyses were conducted using PROC GENMOD in the SAS/STAT<sup>®</sup> software (SAS OnDemand, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and statistical significance was set at p < 0.05.

## 3. Results

### 3.1 Physiological and biochemical variables

Table 2 shows the physiological and biochemical characteristics of the rats after eight weeks (56 days) of treatment. The HF diet promoted a higher body weight gain from the third week of treatment compared to the control group (p = 0.0322; Fig. 2). The rats treated with the HF diet showed a reduction in total food intake (1.18-fold; p < 0.0001), increased energy intake (1.13-fold), and feed efficiency (1.05-fold) compared to the control group rats (p < 0.0001, 0.035, and 0.007, respectively). The consumption of Tucum-do-Cerrado did not alter any of these variables when combined with a control or HF diet. No effect of diet or Tucum-do-Cerrado was obtained regarding fasting plasma glucose concentration. Regarding the muscle glycogen concentration, there was a marginal interaction between diet and Tucum-do-Cerrado (p = 0.063), where HF diet consumption increased muscle glycogen concentration in relation to the control diet (1.5-fold; p = 0.019), whereas Tucum-do-Cerrado promoted a reduction in muscle glycogen

content both when combined with the control (CT(-) × CT(+):2.1-fold; p = 0.007) and HF diet (HF(-) × HF(+):2.9-fold; p <0.001). Compared with the control diet, HF diet consumption did not significantly increase glycogen concentration in the liver. However, the consumption of Tucum-do-Cerrado combined with HF diet decreased hepatic glycogen concentration compared with the HF diet (HF(-) × HF(+)) 3.0-fold; p = 0.0016), as shown in Table 2. Consumption of the HF diet increased fasting plasma insulin concentration (p <0.001), insulin resistance index (HOMA-IR) (p <0.001), and beta cell functional capacity index (HOMA-B) (p = 0.041) compared with the control diet (table 2). Tucum-do-Cerrado consumption did not affect insulin levels or its indices.

**Table 2** - Physiological and biochemical characteristics of rats fed with control diet (CT-), control diet added of Tucum-do-Cerrado (CT+), high fat diet (HF-), or high diet added of Tucum-do-Cerrado (HF+).

Diet	Tucum-do-Cerrado		Mean (95% CI)	Two-way ANOVA P values		
	(-)	(+)		Diet	TUC	Diet x TUC
<b>Physiological Variables</b>						
<b>Total food Intake (g / 56 d)</b>				< 0.0001	0.981	0.109
CT	1,021.7 (957.3-1,086.1)	1,074.8 (1,010.5- 1,139.2)	1,048.2 (1,002.7-1,093.8) <sup>a</sup>			
HF	912.1 (847.7-976.4)	857.4 (793.0-921.8)	884.73 (839.2-930.2) <sup>b</sup>			
Mean	966.9 (921.4-1,012.4)	966.1 (920.6-1,011.6)				
<b>Energy Intake (kcal / d)</b>						
CT	72.0 (67.0-77.1)	75.8 (70.7-80.8)	73.9 (70.3-77.5) <sup>b</sup>	<0.0001	0.783	0.092
HF	86.3 (81.2-91.3)	81.1 (76.0-86.1)	83.7 (80.1-87.2) <sup>a</sup>			
Mean	79.4 (75.6-82.7)	78.4 (74.9-82.0)				
<b>Feed Efficiency (g / kcal)</b>						
CT	3.7 (3.6-3.9)	3.8 (3.6-3.9)	3.7 (3.6-3.8) <sup>b</sup>	0.035	0.627	0.381
HF	4.0 (3.8-4.1)	3.9 (3.7-4.0)	3.9 (3.8-4.0) <sup>a</sup>			
Mean	3.8 (3.7-3.9)	3.8 (3.7-3.9)				
<b>Biochemical variables</b>						
<b>Glucose (mg / dL)</b>						
CT	173.0 (160.2-185.8)	154.1 (141.3-167.0)	163.6 (154.5-172.6)	0.163	0.300	0.075
HF	170.3 (157.4-183.1)	175.4 (162.6-188.3)	172.9 (163.8-181.9)			

**Mean** 171.6 (162.6-180.7) 164.8 (155.7-173.9)

**Muscle glycogen (mg / g)**

<b>CT</b>	1.78 (1.37-2.19) <sup>A, b</sup>	0.84 (0.43-1.25) <sup>B</sup>	1.31 (1.02-1.60)	0.038	< 0.0001	0.063
<b>HF</b>	2.63 (2.22-3.03) <sup>A, a</sup>	0.89 (0.48-1.30) <sup>B</sup>	1.76 (1.47-2.05)			
<b>Mean</b>	2.20 (1.92-2.49)	0.87 (0.58-1.15)				

**Hepatic glycogen (mg / g)**

<b>CT</b>	7.80 (4.20-11.40)	7.70 (4.10-11.30)	7.75 (5.20-10.30)	0.430	0.016	0.019
<b>HF</b>	13.73 (10.13-17.33) <sup>A</sup>	4.64 (1.30-7.98) <sup>B</sup>	9.18 (6.73-11.6)			
<b>Mean</b>	10.80 (8.2-13.3)	6.17 (3.71-8.62)				

**Insulin (ng / mL)**

<b>CT</b>	1.89 (0.91-2.88)	1.46 (0.58-2.34)	1.68 (1.02-2.34) <sup>b</sup>	<0.001	0.964	0.369
<b>HF</b>	3.44 (2.56-4.32)	3.83 (3.03-4.64)	3.63 (3.04-4.23) <sup>a</sup>			
<b>Mean</b>	2.67 (2.00-3.33)	2.65 (2.05-3.24)				

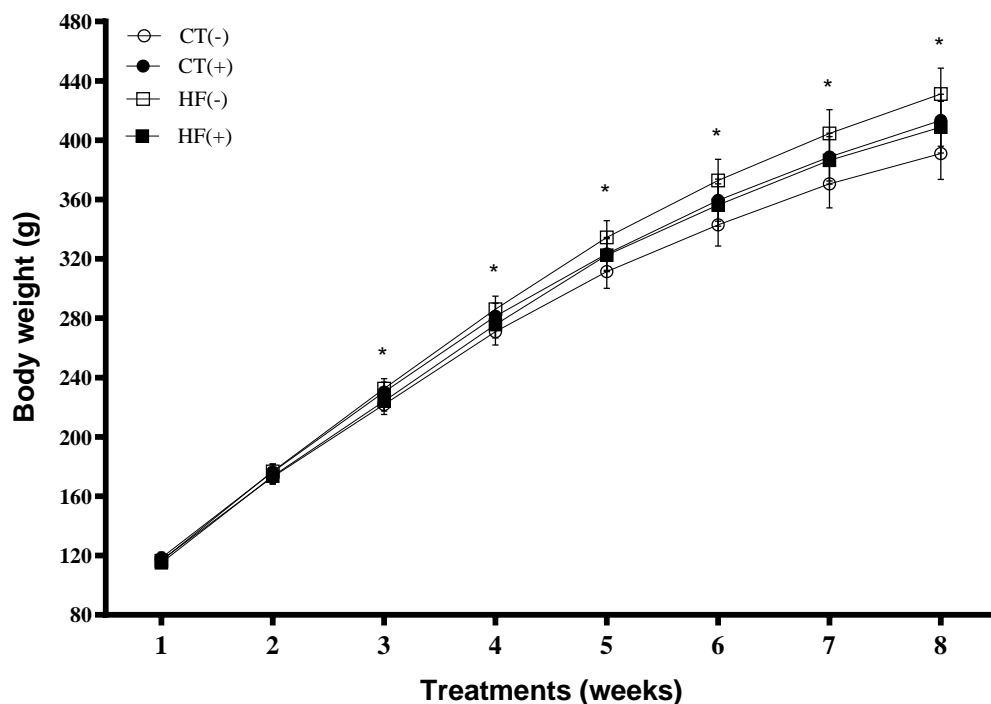
**HOMA IR**

<b>CT</b>	20.52 (9.93-31.11)	13.57 (4.09-23.04)	17.04 (9.94-24.15) <sup>b</sup>	<0.001	0.865	0.219
<b>HF</b>	36.27 (26.80-45.75)	41.57 (32.92-50.22)	38.92 (32.51-45.33) <sup>a</sup>			
<b>Mean</b>	28.40 (21.29-35.50)	27.57 (21.15-33.98)				

**HOMA β**

<b>CT</b>	226.8 (127.1-326.6)	155.9 (56.1-255.6)	191.3 (120.8-261.9) <sup>b</sup>	0.041	0.609	0.366
<b>HF</b>	288.4 (188.7-388.1)	308.3 (217.2-399.3)	298.3 (230.8-365.9) <sup>a</sup>			
<b>Mean</b>	257.6 (187.1-328.1)	232.1 (164.5-299.6)				

Values are means and 95% confidence interval (CI), n = 6/group. Means on the same line without a common capital letter <sup>A, B</sup> differ ( $P < 0.05$ ) and means on the same column without a common lowercase letter <sup>a, b</sup> differ ( $P < 0.05$ ). Diet: control vs. high-fat diet; TUC: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado; Diet x TUC: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado. CT(-): rats fed control diet AIN-93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado. HOMA IR: homeostatic model assessment – insulin resistance. HOMA β: homeostatic model assessment – β cell function. TUC: Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.).



**Fig. 2 – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado on body weight gain of rats during 8-weeks of treatment.** CT(-): rats fed control diet AIN-93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI), n=6/group. \*p<0.05 Statistical differences for control vs. high-fat diet.

### 3.1 Oxidative damage to lipids and proteins

Rats treated with Tucum-do-Cerrado exhibited higher levels of carbonyl in the liver ( $p = 0.021$ ) and MDA in the intestine ( $p = 0.018$ ) than those not treated with Tucum-do-Cerrado (Table 3). There were no significant differences in hepatic MDA or intestinal carbonyl levels between the groups.

**Table 3 – Effect of an 8-week treatment with high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado in hepatic and intestinal oxidative damage in rats.**

Diet	Tucum-do-Cerrado		Mean (95% CI)	Two-way ANOVA P values		
	(-)	(+)		Diet	Tucum	Diet x Tucum
<b>Hepatic oxidative damages (nmol / mg ptn)</b>						
<b>MDA</b>						
CT	0.443 (0.343-0.544)	0.362 (0.261-0.462)	0.403 (0.332-0.474)	0.510	0.667	0.252
HF	0.418 (0.317-0.518)	0.455 (0.355-0.556)	0.437 (0.366-0.508)			

**Mean** 0.431 (0.360-0.502) 0.409 (0.338-0.480)

### Carbonyl

**CT** 0.388 (0.303-0.474) 0.514 (0.429-0.600) 0.451 (0.391-0.512) 0.351 0.021 0.645

**HF** 0.367 (0.282-0.453) 0.453 (0.368-0.539) 0.410 (0.350-0.471)

**Mean** 0.378 (0.318-0.438)<sup>B</sup> 0.484 (0.424-0.544)<sup>A</sup>

### Intestinal oxidative damages (nmol / mg ptn)

#### MDA

**CT** 0.416 (0.282-0.549) 0.694 (0.561-0.828) 0.555 (0.460-0.650) 0.470 0.018 0.124

**HF** 0.473 (0.340-0.607) 0.537 (0.404-0.671) 0.505 (0.411-0.600)

**Mean** 0.445 (0.350-0.539)<sup>B</sup> 0.616 (0.521-0.710)<sup>A</sup>

#### Carbonyl

**CT** 0.406 (0.304-0.509) 0.441 (0.339-0.544) 0.424 (0.351-0.497) 0.766 0.145 0.414

**HF** 0.379 (0.276-0.482) 0.500 (0.397-0.603) 0.440 (0.367-0.512)

**Mean** 0.393 (0.320-0.465) 0.471 (0.398-0.543)

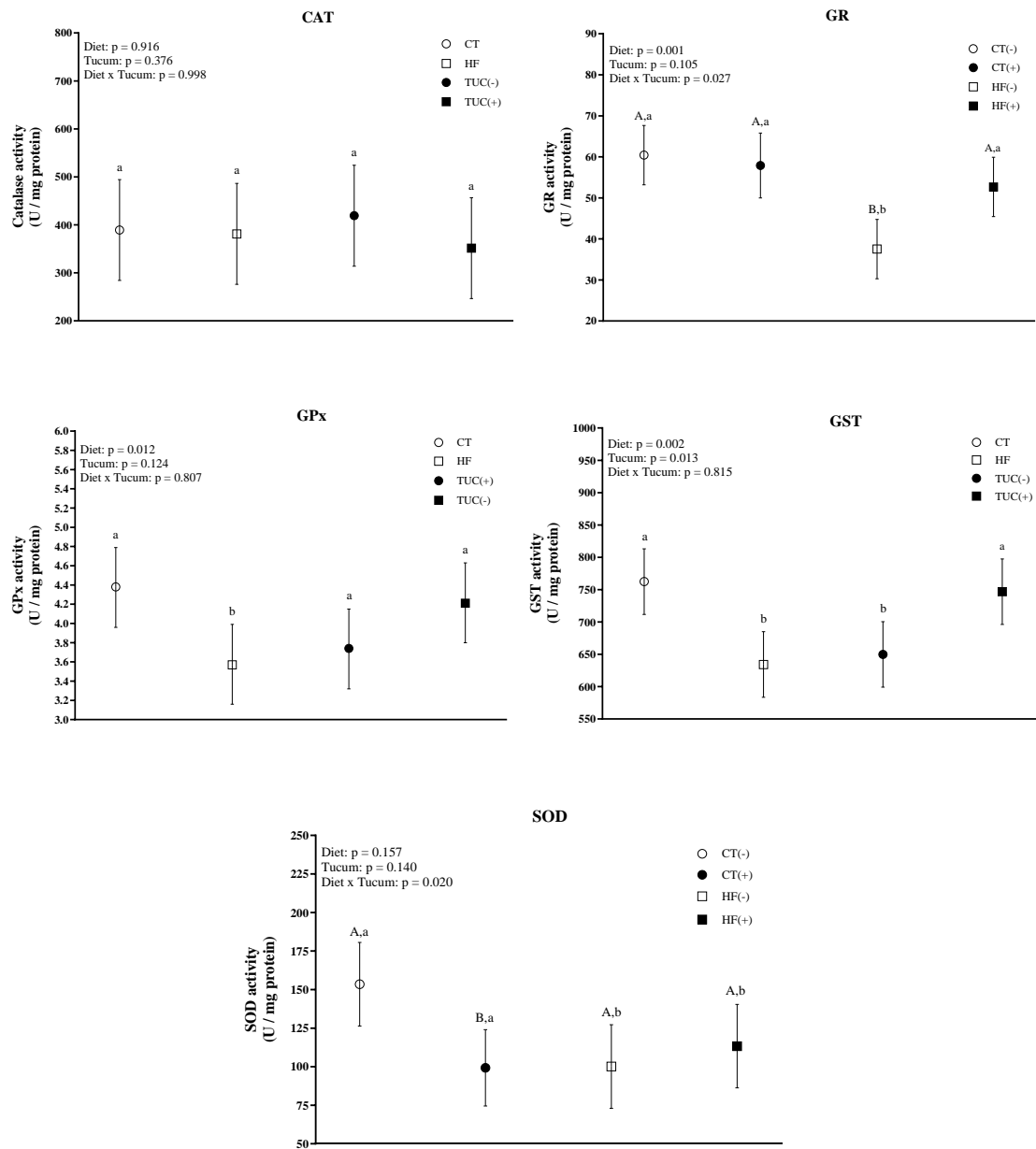
Values are means and 95% confidence interval (CI), n = 6/group. Means on the same line without a common capital letter <sup>A,B</sup> differ ( $P < 0.05$ ) and means on the same column without a common lowercase letter <sup>a,b</sup> differ ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA P values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; TUC: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado; Diet x TUC: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado. CT(-): rats fed control diet AIN-93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado.

### 3.2 Specific activity of antioxidant enzymes

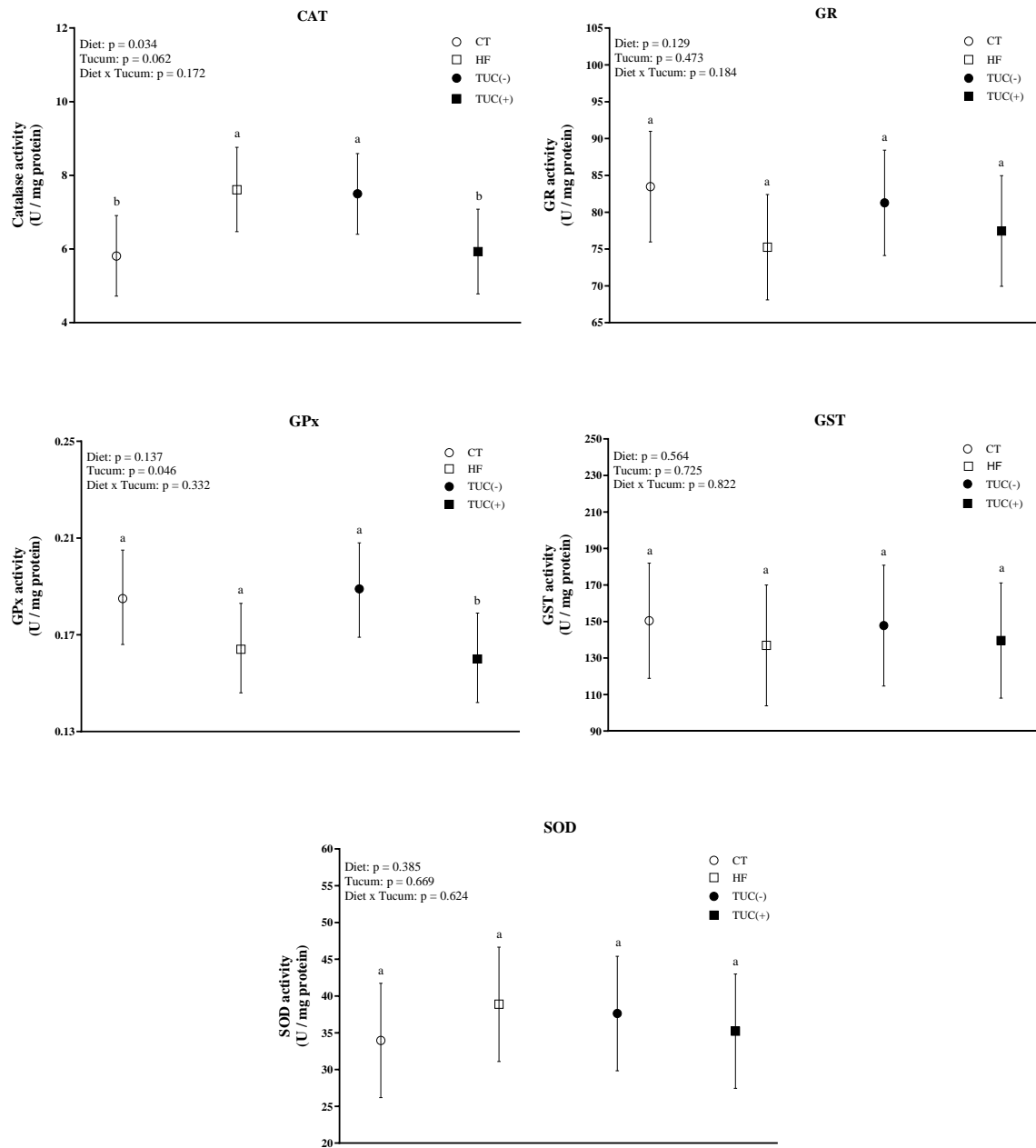
In the liver, we observed an effect of the interaction between diet × Tucum-do-Cerrado on GR activity; the HF diet promoted a decrease in GR activity compared with the control diet ( $p < 0.0001$ ), whereas the consumption of Tucum-do-Cerrado combined with a HF diet increased GR activity compared with HF diet ( $p = 0.019$ ; Fig. 3A). Hepatic GPX and GST activity were lower in rats treated with HF diet rather than the control diet ( $p = 0.012$  and  $0.0016$ , respectively), while rats fed Tucum-do-Cerrado showed an increase in GST activity compared with the untreated group ( $p = 0.013$ ). SOD activity in the liver was lower in rats treated with HF diet than in rats in the control group ( $p = 0.032$ ), and the consumption of Tucum-do-Cerrado combined with the control diet decreased SOD activity compared with the control diet ( $p = 0.020$ ).

In contrast to observations in the liver, the HF diet consumption increased CAT activity in the small intestine compared with the control diet ( $p = 0.034$ ; Fig. 3B), whereas the consumption of Tucum-do-Cerrado marginally decreased CAT activity ( $p = 0.062$ ). A similar profile was observed for GPX; the consumption of Tucum-do-Cerrado decreased GPX activity in the small intestine ( $p = 0.046$ ). The activities of the antioxidant enzymes GR, GST, and SOD in the small intestine did not differ between diet type and Tucum-do-Cerrado consumption (Fig. 3B). Regarding the total serum antioxidant capacity, the consumption of Tucum-do-Cerrado increased FRAP values in the serum, regardless of diet type ( $p = 0.055$ ; Fig. 4).

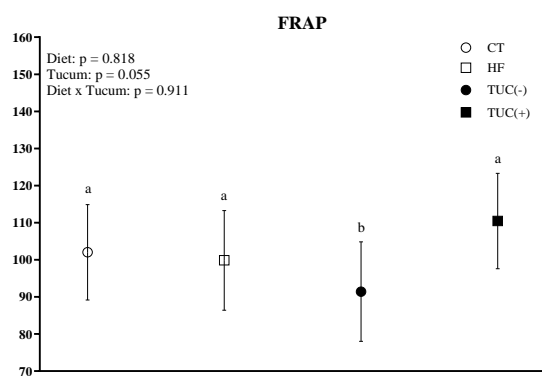
### (A) Liver



### (B) Small intestine



**Fig. 3 – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption in antioxidant enzymes activity in the liver (A) and small intestine (B) of rats.** Values are means and 95% confidence interval (CI),  $n=6/\text{group}$ . For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). For diet x Tucum-do-Cerrado interaction: Different lowercase letters<sup>a,b</sup> indicate differences for control vs. high-fat within Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-); and different capital letters<sup>A,B</sup> indicate differences for addition (+) vs. not addition (-) of Tucum-do-Cerrado within control or high-fat diets ( $P < 0.05$ ). CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. CT(-): rats fed control diet AIN-93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado. CAT= catalase; GR= glutathione reductase; GPX= Glutathione peroxidase; SOD= superoxide dismutase; GST= glutathione-s-transferase. Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.



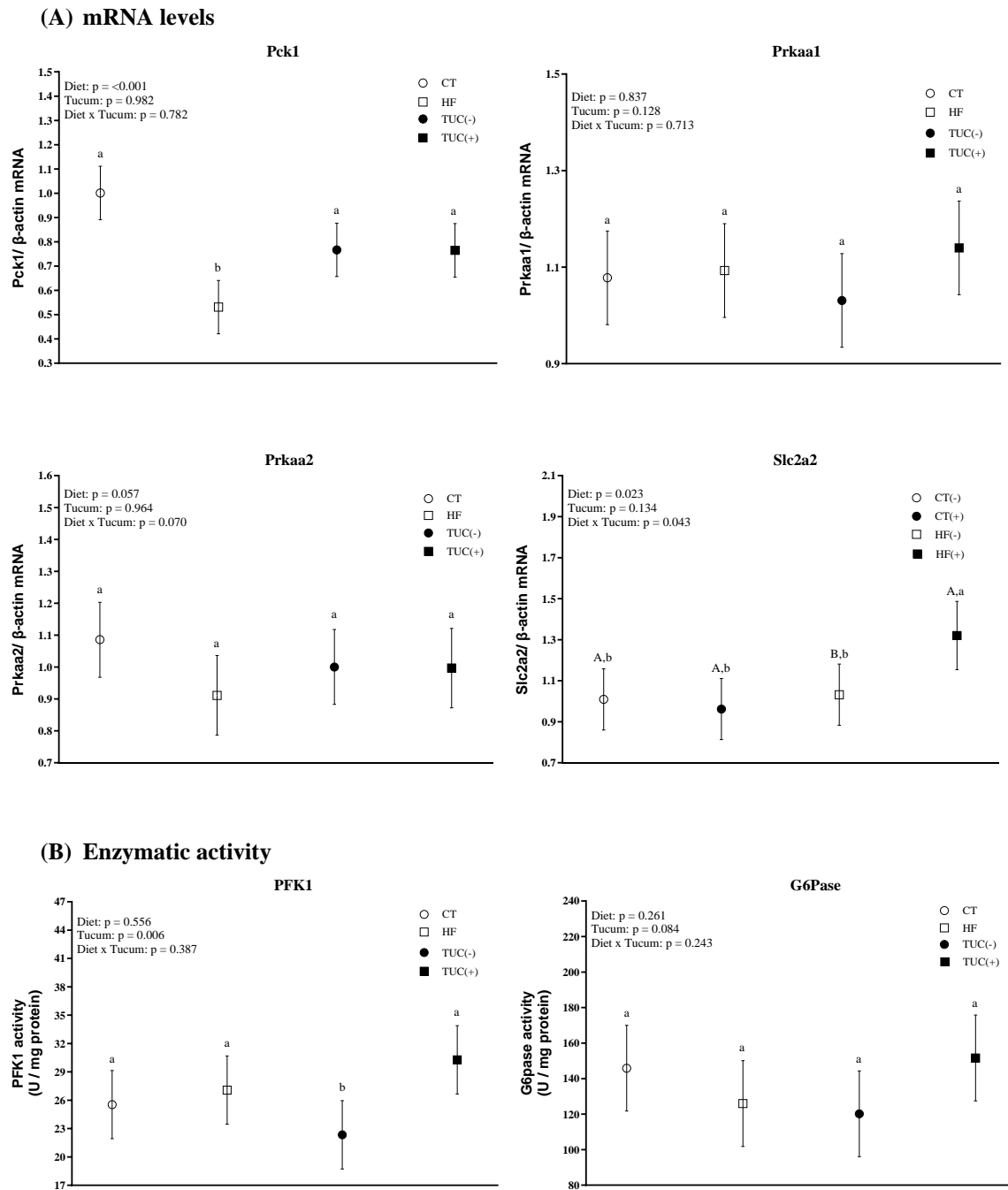
**Fig. 4 – Effect of high-fat diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption in total serum antioxidant capacity of rats.** Values are means and 95% confidence interval (CI), n=5/group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). For diet x Tucum-do-Cerrado interaction: Different lowercase letters<sup>a,b</sup> indicate differences for control vs. high-fat within Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-) ( $P < 0.05$ ). CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. FRAP = Ferric reducing antioxidant power. Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.

### 3.3 Carbohydrate metabolism markers in the liver

The consumption of a HF diet promoted a decrease in Pck1 mRNA levels in the liver, compared with the control diet ( $p < 0.001$ ). An effect of diet  $\times$  Tucum-do-Cerrado interaction on hepatic Slc2a2 mRNA levels was observed ( $p = 0.043$ ). Similarly, the consumption of Tucum-do-Cerrado with a HF diet promoted an increase in Slc2a2 mRNA levels in the liver compared to the HF diet ( $p = 0.055$ ). However, the consumption of Tucum-do-Cerrado did not alter the hepatic mRNA levels of Prkaa1 or Prkaa2 (Fig. 5A).

With regards to the activity of glycolytic enzymes in the liver, the consumption of Tucum-do-Cerrado increased PFK1 activity ( $p = 0.0062$ ) regardless of diet type. No effects of diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption on hepatic G6Pase were observed (Fig. 5B).





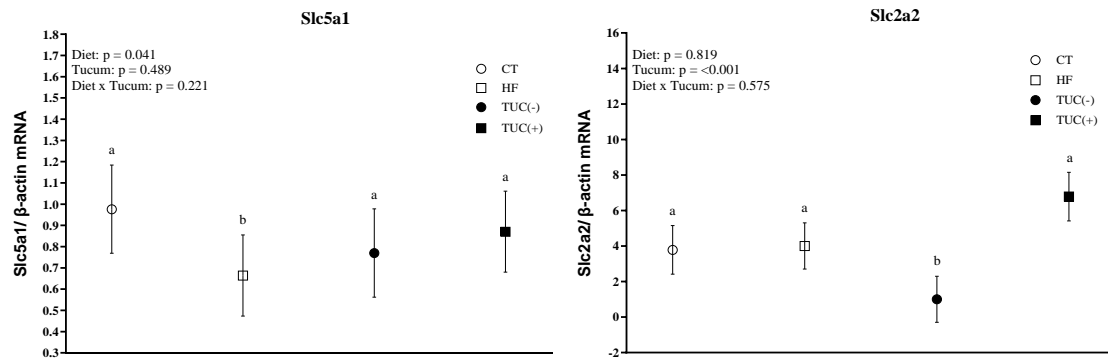
**Fig. 5 –The mRNA levels of Pck1 (PEPCK), Prkaa1 (AMPK- $\alpha$ 1), Prkaa2 (AMPK- $\alpha$ 2) and Slc2a2 (GLUT2) (A) and Phosphofructokinase 1 (PFK1) and Glucose-6-phosphatase (G6Pase) specific activity (B) in the liver of rats treated for 8-weeks with one of the following diets: CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. CT(-): rats fed control diet AIN-93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI),  $n=5$ /group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). For diet x Tucum-do-Cerrado interaction: Different lowercase letters<sup>a,b</sup> indicate differences for control vs. high-fat within Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-); and different capital letters<sup>A,B</sup> indicate differences for addition (+) vs. not addition (-) of Tucum-do-Cerrado within control or high-fat diets ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.**

### 3.4 Carbohydrate metabolism markers in the small intestine

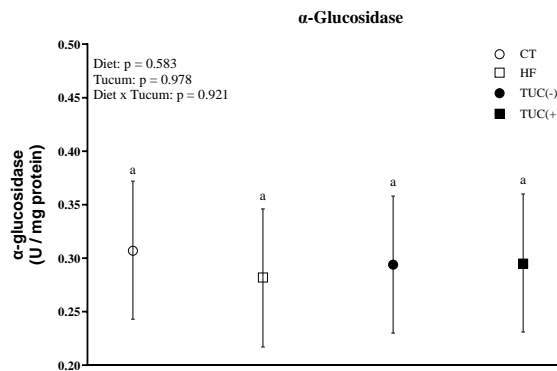
Consumption of a HF diet promoted a decrease in Slc5a1 mRNA levels in the small intestine compared with the control diet ( $p = 0.041$ ; Fig. 6A), while no effect of Tucum-do-Cerrado on Slc5a1 mRNA levels was observed. Tucum-do-Cerrado consumption increased the intestinal levels of Slc2a2 mRNA, regardless of the type of diet ( $p < 0.001$ ).

In relation to the activity of glycolytic enzymes in the small intestine, no effect of diet and/or Tucum-do-Cerrado consumption was observed in intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity (Fig. 6B).

#### (A) mRNA levels



#### (B) Enzymatic activity



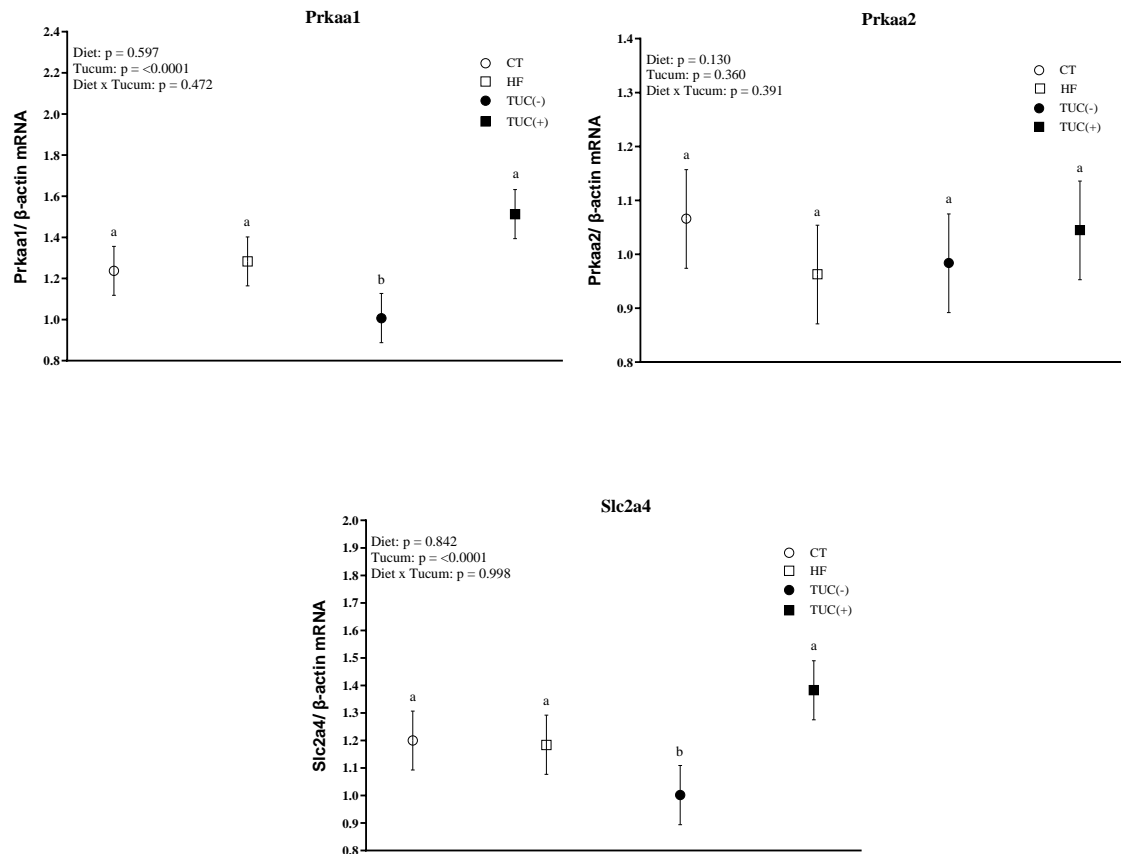
**Fig. 6** –The mRNA levels of Slc5a1 (SGLT1) and Slc2a2 (GLUT2) in the small intestine (A) and  $\alpha$ -Glucosidase specific activity in the small intestine (B), of rats treated for 8-weeks with one of the following diets: CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI),  $n=5$ /group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without

addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.

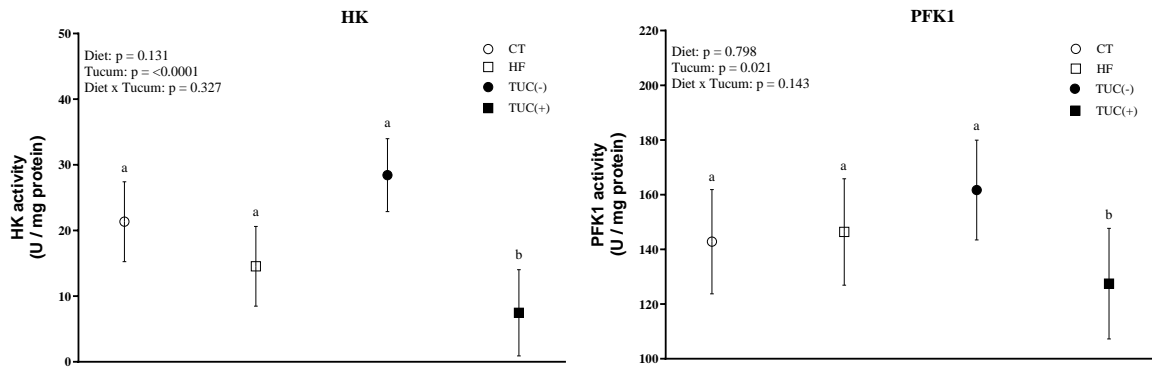
### 3.5 Carbohydrate metabolism markers in the muscle

Consumption of Tucum-do-Cerrado by rats increased the mRNA levels of Prkaa1 ( $p < 0.0001$ ) and Slc2a4 ( $p < 0.0001$ ) in the muscle, independent of diet type. However, there was no significant effect on Prkaa2 mRNA levels in the muscle of the rats (Fig. 7A). Considering the activity of the rate-limiting enzymes of the glycolytic pathway, treatment of rats with Tucum-do-Cerrado decreased HK and PFK1 activity in the muscle, independent of the diet type ( $p < 0.001$  and  $0.0215$ , respectively; Fig. 7B).

#### (A) mRNA levels



## (B) Enzymatic activity



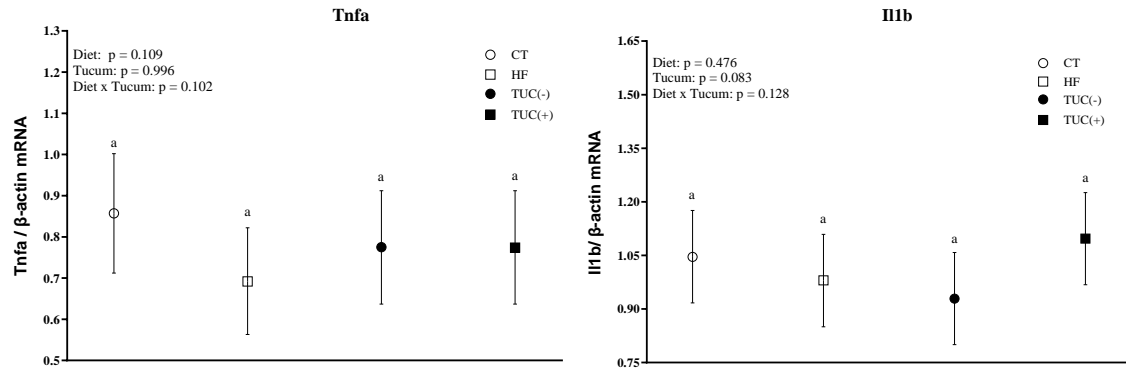
**Fig. 7 - The mRNA levels of Prkaa1 (AMPK- $\alpha$ 1), Prkaa2 (AMPK- $\alpha$ 2) and Slc2a2 (GLUT2) (A) and hexokinase (HK) and phosphofructokinase (PFK1) specific activity (B) in the muscle of rats treated with one of the following diets: CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI),  $n=5$ /group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.**

### 3.6 Inflammatory markers

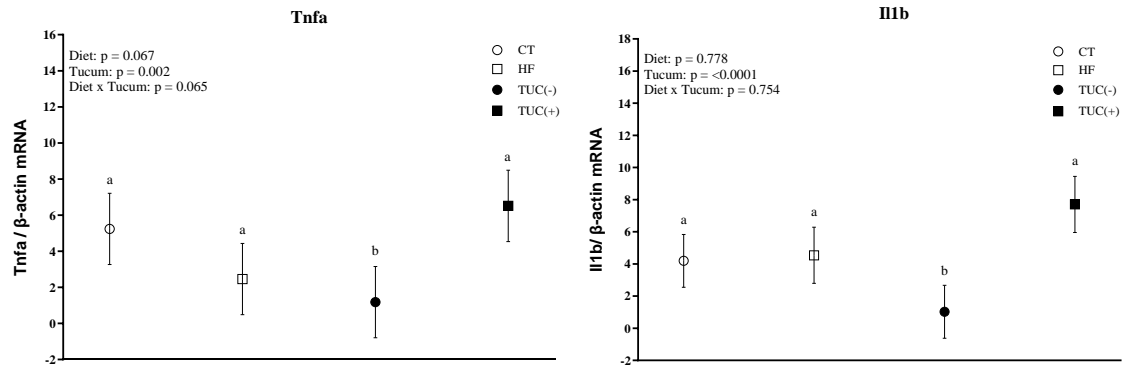
Tnfa and Il1b mRNA levels were upregulated in the small intestine of groups treated with Tucum-do-Cerrado ( $p = 0.0018$  and  $<0.001$ , respectively; Fig. 8), regardless of the diet type. In the liver, no significant effects of diet and/or Tucum-do-Cerrado on Tnfa and Il1b mRNA levels were observed.

As shown in figure 9, there was an interaction between diet and Tucum-do-Cerrado in terms of serum pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  concentration. The HF diet promoted a reduction in the serum TNF- $\alpha$  level compared to control diet ( $p = 0.013$ ), while the addition of Tucum-do-Cerrado to the HF diet increased TNF- $\alpha$  serum levels in comparison to the HF diet ( $p < 0.0001$ ). Consumption of Tucum-do-Cerrado increased IL-6 serum levels independent of diet type ( $p < 0.0001$ ).

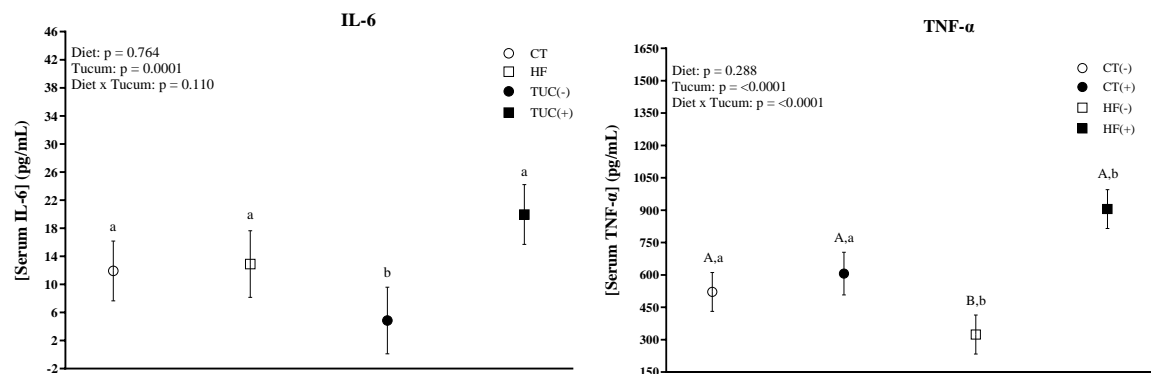
### (A) Liver



**(B) Small intestine**



**Fig. 8 – The mRNA levels of tumor necrosis alpha (Tnfa) and interleukin 1b (Il1b) in the liver (A) and small intestine (B) of rats treated with one of the following diets: CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI),  $n=5$ /group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado.**



**Fig. 9 - Tumor necrosis alpha and interleukin-6 (IL-6) serum protein levels of rats fed with one of the following diets: CT: rats fed control diet AIN-93G; HF: rats fed a high-fat diet; TUC(-): rats not treated with Tucum-do-Cerrado; TUC(+): rats treated with Tucum-do-Cerrado. CT(-): rats fed control diet AIN-**

93G; CT(+): rats fed a control diet AIN-93G added of Tucum-do-Cerrado; HF(-): rats fed a high-fat diet; HF(+): rats fed a high-fat diet added of Tucum-do-Cerrado. Values are means and 95% confidence interval (CI), n=5/group. For diet or Tucum-do-Cerrado effect: within the diet type and within the Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-), data without a common letter differ ( $P < 0.05$ ). For diet x Tucum-do-Cerrado interaction: Different lowercase letters<sup>a,b</sup> indicate differences for control vs. high-fat within Tucum-do-Cerrado addition (+) or not (-); and different capital letters<sup>A,B</sup> indicate differences for addition (+) vs. not addition (-) of Tucum-do-Cerrado within control or high-fat diets Two-way ANOVA  $P$  values for the following comparisons: Diet: control vs. high-fat diet; Tucum: with vs. without addition of Tucum-do-Cerrado independent of diet type; Diet x Tucum: interaction between diet type vs addition of Tucum-do-Cerrado. ( $P < 0.05$ ).

#### 4 Discussion

This study shows the effect of Tucum-do-Cerrado, a Brazilian savanna fruit with high polyphenol [14] content, on glucose homeostasis and its interrelationships with redox and inflammatory responses in an HF diet-induced obesity model. As expected, the HF diet promoted greater body weight gain as well as an increase in serum insulin concentration and glucose homeostatic indexes, even though blood glucose concentration was like that of the control diet, suggesting a metabolic impairment of glucose homeostasis. The higher glycogen concentration in the muscle and liver of rats treated with HF diet reinforces the above hypothesis, as the condition identified as “metabolic inflexibility” is characterized by an impairment of glucose oxidation due to high free fatty acids’ availability and triglyceride accumulation due to the HF diet consumption [34,35].

In contrast to our results, Ballard et al. (2020) [11] observed that the extracts of Tucum-do-Pantanal (*Bactris setosa* Mart.) and Taruma-do-Cerrado (*Vitex cymosa* Bertero ex Spreng), both Brazilian fruit sources of phytochemicals, decreased the body weight of diet-induced obese C57BL/6J mice after five weeks and in the last week of treatment, respectively. However, Mezhibovsky et al. (2021) [9] observed lower body weight gain in mice treated with diet-induced obesity supplemented with grape polyphenols, only from 15-week of treatment. Khare et al. (2016) [10] showed that Cinnamaldehyde 10mg/kg i.p. (a bioactive component of cinnamon) co-administered with a HF diet prevented body weight gain, whereas at a dose of 5mg/kg i.p., it did not, suggesting that the compound concentration may justify different results. In our study, rats fed a HF diet had reduced food intake by 11% compared to control rats, which attenuated body weight gain and resulted in moderate obesity (21% of body weight gain). These results suggest that some animals are resistant to HF diet-induced obesity [36] and may explain the non-effect of Tucum-do-Cerrado consumption on body weight gain during the 8-week treatment period. Furthermore, the higher concentration and bioavailability of polyphenolic compounds in extracts compared to fresh fruit, the route of administration (gavage *versus* mixed with diet), as well as the treatment time, obesity treatment model instead of prevention, and adult animals instead of newly weaned animals may be associated with the contradictory results obtained between studies [36 – 39].

Tucum-do-Cerrado consumption (150g fresh weight/kg diet) did not attenuate the detrimental effect on blood markers of glucose homeostasis compared to the HF(-) group. However, it decreased glycogen concentration in the liver and muscle when combined with a HF diet, regardless of the diet type. The lower hepatic glycogen concentration promoted by the consumption of Tucum-do-Cerrado when combined with a HF diet was associated with increased activity of the glycolytic enzyme phosphofructokinase-1 (PFK-1), suggesting that Tucum-do-Cerrado activated glycogenolysis, and consequently, the glycolytic pathway in a HF diet-induced obesity model.

In agreement with the above hypothesis, consumption of Tucum-do-Cerrado upregulated Slc2a2 mRNA levels (Glut-2) in the intestine independent of diet type and in the liver when combined with a HF diet. Therefore, we hypothesized that Tucum-do-Cerrado improves intestinal glucose uptake to compensate for the higher oxidation levels of glucose in hepatic cells and maintain blood glucose levels within the normal range. Similar to the findings of our study, Mezhibovsky et al. (2021) [9] showed that mice treated with diet-induced obesity (low in fiber, but high in fats and sugars) supplemented with grape polyphenols had higher ileal mRNA levels of glucose transporter 2 (Sl2a2) than those not supplemented. They suggested that grape polyphenols increase carbohydrate utilization by increasing intestinal glucose uptake and oxidation as a replacement for energy sources, since these mice had a lower concentration of butyrate (short-chain fatty acid), a major energy substrate of the distal intestine, and higher gene expression of duodenal pyruvate dehydrogenase (PDH). Therefore, we hypothesized that Tucum-do-Cerrado may have an effect similar to that observed for grape polyphenols, as no difference was observed in serum insulin concentration and insulin sensitivity as estimated by the HOMA-IR and HOMA- $\beta$  indices.

Divergent responses regarding the glycolytic pathway in the liver and muscles were expected because of the opposing sets of these two tissues [40]. Glycolytic pathway is stimulated by the activation of glycolytic enzymes such as PFK1 and hexokinase (HK) [41,42]. Fructose 2,6-bisphosphate allosterically activates PFK-1 more potently than its own product (fructose 1,6-bisphosphate). Considering that in the liver the activities of the bifunctional enzyme phosphofructokinase-2 (PFK-2)/ fructose 2,6-bisphosphatase (FBPase-2) are influenced by phosphorylation/dephosphorylation [42], we hypothesized that phytochemical compounds of Tucum-do-Cerrado lead to dephosphorylation of the PFK-2/FBPase-2 bifunctional enzyme and consequent activation of PFK-2, promoting an increase in the concentration of fructose 2,6-bisphosphate, which allosterically activates PFK-1 favoring glucose oxidation through glycolytic pathway.

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a metabolic energy sensor that upregulates catabolic pathways that generate ATP and down-regulates anabolic pathways. Activation of AMPK increases GLUT-4 expression or translocation through an insulin independent mechanism

[43]. Therefore, the upregulation of Prkaa1 (AMPK) and Slc2a4 mRNA (GLUT-4) levels, along with a decrease in muscle glycogen concentration in rats treated with Tucum-do-Cerrado, regardless of diet type, suggest an increase in muscle glucose uptake and oxidation. Unexpectedly, the activities of the enzymes of the glycolytic pathway, HK and PFK-1, decreased with Tucum-do-Cerrado consumption, regardless of diet type.

Owing to opposing metabolic sets in the liver and muscle tissues, divergent responses are expected regarding the regulation of the glycolytic pathway [40]. In the muscle, the increase in fructose 2,6-bisphosphate occurs because of the accumulation of hexose monophosphates produced from the cAMP-dependent activation of glycogenolysis [40,44]. Therefore, in the present study, the lower glycogen concentration in the muscle of rats treated with Tucum-do-Cerrado may have decreased hexose monophosphate concentrations, inactivated PFK-2, and consequently decreased fructose 2,6-bisphosphate production by inhibiting glycolysis. Taken together, these results suggest that Tucum-do-Cerrado stimulates glucose uptake and oxidation.

In addition, a previous study observed that Tucum-do-Cerrado increased hepatic nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nfe2l2) mRNA and protein (Nrf2) levels [17]. Therefore, we also hypothesized that the dietary consumption of Tucum-do-Cerrado could induce Nrf2 expression and consequently stimulate glucose uptake and utilization, as rats fed the Tucum-do-Cerrado diet had lower muscle glycogen content associated with the upregulation of Slc2a4 and Prkaa1 mRNA levels. Uruno et al. (2016) [45] demonstrated that specific Keap1 knockout mice that abundantly expressed Nrf2 in their skeletal muscle showed reduced blood glucose levels and increased glycogen branching enzyme (GBE) and the phosphorylase b kinase  $\alpha$  subunit (Phk $\alpha$ ) protein in skeletal muscle compared to wild type mice. They suggested that Nrf2 induction improved glucose tolerance through the increased glucose uptake and utilization, mediated through GBE and Phk $\alpha$  induction and consequently activated muscle glycogen metabolism, resulting in diminished muscle glycogen content. Nrf2 induction also increases energy consumption in the skeletal muscles in specific Keap1 knockout mice that abundantly express Nrf2.

Obesity and insulin resistance are associated with low-grade systemic inflammation and oxidative stress [7]. In agreement with the literature HF diet consumption decreased the enzymatic antioxidant defense, as hepatic GR, GPX, GST, and SOD specific activities were lower than those of the control diet. Although oxidative damage occurred in the liver, carbonyl and MDA concentrations were not affected by HF diet. An et al. (2013) [46] observed a decrease in the polyunsaturated fatty acid to saturated fatty acid ratio (PUFA-to-SFA) in the livers of rats treated for 83 days with a HF diet. They suggested that a HF diet enhanced the peroxidation of polyunsaturated fatty acids and thus oxidative stress; under such conditions, apolipoprotein B undergoes proteolysis, which impairs very low-density lipoprotein secretion, contributing to triglyceride accumulation in the liver [47]. In the present study, HF diet treated rats also showed



higher hepatic triglyceride concentration in relation to control group rats ( $155.80 \pm 21.44$  and  $80.81 \pm 23.97$  mg/dL, respectively), therefore, reinforcing that an oxidative stress condition was established and associated with the impairment of enzymatic antioxidant defense.

The consumption of Tucum-do-Cerrado improved the total serum antioxidant capacity independent of diet type, suggesting that the phytochemical compounds found in Tucum-do-Cerrado [48] are bioavailable *in vivo* and display antioxidant activities, such as the reduction or chelation of oxidative metals and scavenging of free radicals. These data also suggest that dietary lipid content does not influence the bioavailability of these phytochemicals, as both the control and HF diet rats showed similar serum FRAP values. Phytochemical compounds also improve endogenous antioxidant defenses by increasing hepatic GR activity in rats fed a HF diet with Tucum-do-Cerrado compared to HF rats and maintain their activity similar to that of the control diet.

A previous study showed that Tucum-do-Cerrado increased nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) protein levels, which upregulated antioxidant enzyme expression and attenuated oxidative stress [17]. The authors suggested that this antioxidant response is modulated by phytochemical compounds that induce the expression and activate Nrf2 transcription factor. Nrf2 positively regulates the antioxidant GSH-based system glutathione reductase maintaining intracellular levels of reduced glutathione (GSH) [49].

Nrf2 also mediates the induction of drug-metabolizing enzymes, such as glutathione-S-transferase [49], in agreement with our data, in which Tucum-do-Cerrado consumption increased GST activity in rat liver independent of diet type. Together, these results suggest that Tucum-do-Cerrado consumption promotes antioxidant response in both the control and HF diet groups, however, in the HF diet group, it reestablished the GSH-based antioxidant system to normal levels.

In the small intestine, the reduction in catalase and glutathione peroxidase activities observed in rats treated with Tucum-do-Cerrado may be attributed to the sparing effect of dietary antioxidants. The high content of polyphenols in Tucum-do-Cerrado increased the exogenous antioxidant concentration in the intestine, leading to an environment with high reducing potential, which decreased the need for enzymatic endogenous antioxidants. Pereira et al. (2014) [50] observed a similar response when rats treated with tropical fruit juice had lower antioxidant enzyme activity than control rats.

According to the literature, phytochemicals also exhibit anti-inflammatory effect by reducing the expression and activation of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 [51]. Unexpectedly, Tucum-do-Cerrado consumption upregulated intestinal Tnf and Il1b mRNA levels and serum IL-6 independent of diet type and serum IL-1b when consumed with a HF diet, suggesting a pro-inflammatory response. Zampelas et al. (2004) [52] when investigating the association between coffee consumption and inflammatory markers, showed that

subjects who consumed >200 mL coffee/day had higher serum IL-6, C-reactive protein, TNF- $\alpha$  concentrations compared with coffee nondrinkers. Therefore, the high polyphenol content, more specifically in the intestine than in other tissues, may be related to the greater pro-inflammatory response observed in this tissue.

Considering the high content of phenolic compounds of Tucum-do-Cerrado fruit, we suggest that one or more polyphenols may be responsible by the biological protective effects of Tucum-do-Cerrado observed in the present study. Flavonoids (flavanols, anthocyanins, flavones and flavonols), phenolic acids (hydroxybenzoics and hydroxycinnamic acids) and stilbenes (resveratrol) are three major classes of phenolic compounds already identified in the Tucum-do-Cerrado fruit [14]. Stilbenes seem to be associated with the upregulation of the nuclear factor-erythroid-2-related factor-2 (Nrf2) [16] that improves glucose tolerance, while the flavonoid anthocyanins, responsible for the blue-purple color of many fruits, induces glutathione synthesis and the flavonol, quercetin, acts as a free radical scavenger protecting cells against oxidative stress [53,54]. Despite flavonoids represent the major content of phenolic compounds in Tucum-do-Cerrado fruit, the biological protective effect of Tucum-do-Cerrado should be related to the type of phytochemical rather than its concentration. An *in vitro* study showed that tucum-do-cerrado peel methanolic extract had the highest phenolic concentration, however the lowest antioxidant activity, compared to the ethanolic extract [14].

## 5 Conclusion

Consumption of Tucum-do-Cerrado may ameliorate impaired glucose utilization in a HF diet-induced obesity model by increasing liver and muscle glucose uptake and oxidation. These data suggest that its' consumption improves muscle glucose oxidation in non-obese and obese rats. This response may be related to the improvement in the total antioxidant capacity of rats.

**Author contributions:** S.F.A. conceived and designed the project, oversaw project resources and administration. A.M.A and S.F.A conducted the methods, evaluated the results, and contributed to writing, revising, and editing the manuscript. Both authors reviewed the data and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgments:** We would like to thank Mr. Luiz Eduardo da Silva Araújo for technical assistance, as well as Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for English language editing.

## REFERENCES

- [1] Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 2019 Mar;92:6-10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005.
- [2] WHO: World Health Organization. Obesity and overweight. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed April 15, 2023.
- [3] Hasani-Ranjbar, S., Jouyandeh, Z., & Abdollahi, M. (2013). A systematic review of anti-obesity medicinal plants—An update. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 28. doi: 10.1186/2251-6581-12-28.
- [4] Hernández, H. R. et al. Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. *International Journal of Endocrinology*. 2013. V. 2013, p. 11. doi: 10.1155/2013/678159.
- [5] Kwaifa, I. K. et al. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules*. 2020. V. 10, n. 2. doi: 10.3390/biom10020291.
- [6] Coelho DF, Pereira-Lancha LO, Chaves DS, Diwan D, Ferraz R, Campos-Ferraz PL, Poortmans JR and Lancha Junior AH. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Braz J Med Biol Res*, October 2011, Volume 44(10) 966-972. doi: 10.1590/s0100-879x2011007500107.
- [7] Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52 (3): 537-539. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000300015>.
- [8] Siroma TK, Machate DJ, Zorgetto-Pinheiro VA, Figueiredo PS, Marcelino G, Hiane PA, Bogo D, Pott A, Cury ERJ, Guimarães RCA, Vilela MLB, Ferreira RDS, do Nascimento VA. Polyphenols and  $\omega$ -3 PUFAs: Beneficial Outcomes to Obesity and Its Related Metabolic Diseases. *Front Nutr*. 2022 Jan 17;8:781622. doi: 10.3389/fnut.2021.781622.
- [9] Mezhibovsky E, Knowles KA, He Q, Sui K, Tveter KM, Duran RM, Roopchand DE. Grape Polyphenols Attenuate Diet-Induced Obesity and Hepatic Steatosis in Mice in Association With Reduced Butyrate and Increased Markers of Intestinal Carbohydrate Oxidation. *Front Nutr*. 2021 Jun 14;8:675267. doi: 10.3389/fnut.2021.675267.
- [10] Khare P, Jagtap S, Jain Y, Baboota RK, Mangal P, Boparai RK, Bhutani KK, Sharma SS, Premkumar LS, Kondepudi KK, Chopra K, Bishnoi M. Cinnamaldehyde supplementation prevents fasting-induced hyperphagia, lipid accumulation, and inflammation in high-fat diet-fed mice. *Biofactors*. 2016;42(2):201-11. doi: 10.1002/biof.1265.
- [11] Ballard, C.R.; dos Santos, E.F.; Dubois, M.J.; Pilon, G.; Cazarin, C.B.B.; Marostica Junior, M.R.; Marette, A. Two polyphenol-rich Brazilian fruit extracts protect from diet-induced obesity and hepatic steatosis in mice *Food & Function*, 11 (2020), pp. 8800-8810. doi: 10.1039/D0FO01912G.
- [12] Zhang AJ, Rimando AM, Mizuno CS, Mathews ST.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. *J Nutr Biochem*. 2017 Sep;47:86-93. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.05.008.
- [13] Siqueira EM, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PLoS One*. 2013 Aug 21;8(8):e72826. doi: 10.1371/journal.pone.0072826.
- [14] Rosa, F.R, Arruda, A. F., Siqueira, E. M., & Arruda, S. F. (2016). Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's native fruit. *Nutrients*, 8, 110-127. doi: 10.3390/nu8030110.
- [15] Heibel, A.B.; da Cunha, M. de S.B.; Ferraz, C.T.S. and Arruda, S.F. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing

- gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition. *Food Research International*, 113 (2018), pp. 433-442. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.032.
- [16] Fustinoni-Reis AM, Arruda SF, Dourado LPS, da Cunha Marcela SB, Siqueira EMA. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver Nutrients. 2016 Feb 17;8(2):38. doi: 10.3390/nu8020038.
- [17] Da Cunha, M., Arruda, S. Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) May Promote AntiAging Effect by Upregulating SIRT1-Nrf2 Pathway and Attenuating Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*, v. 9, n. 11, p. 1243, 2017. doi: 10.3390/nu9111243.
- [18] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 Nov;123(11):1939-51. doi: 10.1093/jn/123.11.1939.
- [19] Ulman, E. A. The “Original” High-Fat Diets for Diet Induced Obesity. *Product Dat - DIO series diets*. p. 1–3, 2011.
- [20] Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970 Feb;28(2):234-6. doi: 10.1152/jappl.1970.28.2.234.
- [21] Wasowick, W.; NEVE, J.; PERETZ, A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*. 1993; 39:2522– 6.
- [22] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 1999; v. 299, n. 1995, p. 15–27. doi: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5.
- [23] Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; v. 105, n. C, p. 121–126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- [24] Joannis, D. R.; Storey, K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 1996 Sep;271(3 Pt 2):R545-53. doi: 10.1152/ajpregu.1996.271.3.R545.
- [25] Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). *Methods in Enzymology*. 1981; v. 77, n. C, p. 218–231. doi: 10.1016/s0076-6879(81)77029-0.
- [26] Mccord, J. M. Analysis of superoxide dismutase activity. *Curr Protoc Toxicol*, v. Chapter 7, p. Unit7 3, 2001. doi: 10.1002/0471140856.tx0703s00.
- [27] Coelho, W. S.; Costa, K. C.; Sola-Penna, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Molecular genetics and metabolism*. 2007; v. 92, n. 4, p. 364–370. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.07.010.
- [28] Gopal SS, Lakshmi MJ, Sharavana G, Sathaiyah G, Sreerama YN, Baskaran V. Lactucaxanthin - a potential anti-diabetic carotenoid from lettuce (*Lactuca sativa*) inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity in vitro and in diabetic rats. *Food Funct*. 2017 Mar 22;8(3):1124-1131. doi: 10.1039/c6fo01655c.
- [29] Mosa RA, Cele ND, Mabhida SE, Shabalala SC, Penduka D, Opoku AR. In vivo antihyperglycemic activity of a lanosteryl triterpene from *Protorhus longifolia*. *Molecules*. 2015 Jul 22;20(7):13374-83. doi: 10.3390/molecules200713374.
- [30] Baginski, E. S., Foà, P. P., & Zak, B. Glucose-6-phosphatase. Bergmeyer HU (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (2nd ed.), Academic Press, New York (1974), pp. 876-880. doi: 10.1016/B978-0-12-091302-2.50072.
- [31] Hayanga, J. A. et al. Grapefruit juice improves glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic gluconeogenesis. *European journal of nutrition*. 2016; v. 55, n. 2, p. 631–638. doi: 10.1007/s00394-015-0883-4.
- [32] da Cunha MS, Siqueira EM, Trindade LS, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem*. 2014 Oct;25(10):1035-44. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.05.005.

- [33] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [34] Frayn KN; The glucose–fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem Soc Trans* 1 December 2003; 31 (6): 1115–1119. doi: <https://doi.org/10.1042/bst0311115>.
- [35] Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep;297(3):E578-91. doi: 10.1152/ajpendo.00093.2009.
- [36] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):270-99. doi: 10.1017/S0954422410000168.
- [37] Peng CH, Cheng JJ, Yu MH, Chung DJ, Huang CN, Wang CJ. Solanum nigrum polyphenols reduce body weight and body fat by affecting adipocyte and lipid metabolism. *Food Funct*. 2020 Jan 29;11(1):483-492. doi: 10.1039/c9fo02240f.
- [38] Boix-Castejón M, Herranz-López M, Pérez Gago A, Olivares-Vicente M, Caturla N, Roche E, Micol V. Hibiscus and lemon verbena polyphenols modulate appetite-related biomarkers in overweight subjects: a randomized controlled trial. *Food Funct*. 2018 Jun 20;9(6):3173-3184. doi: 10.1039/c8fo00367j. Erratum in: *Food Funct*. 2018 Jul 17;9(7):4037.
- [39] Zhao X, Chen Z, Yin Y, Li X. Effects of polysaccharide from *Physalis alkekengi* var. *francheti* on liver injury and intestinal microflora in type-2 diabetic mice. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):2020-2025. doi: 10.1080/13880209.2017.1345953.
- [40] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*. 2011 Sep 15;25(18):1895-908. doi: 10.1101/gad.17420111.
- [41] Hue L, Rider MH; Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J* 15 July 1987; 245 (2): 313–324. doi: <https://doi.org/10.1042/bj2450313>.
- [42] Tanner LB, Goglia AG, Wei MH, Sehgal T, Parsons LR, Park JO, et al. Quatro etapas principais controlam o fluxo glicolítico em células de mamíferos. *Cell Syst* (2018) 7 ( 1 ):49–62.e8. doi: 10.1016/j.cels.2018.06.003
- [43] Tornheim, K. Glucose metabolism and hormonal Regulation ☆ I. Huhtaniemi, L. Martini (Eds.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (second ed.), Academic Press, Oxford (2018), pp. 87-94, 10.1016/B978-0-12-801238-3.03816-2
- [44] Winder WW, Fisher SR, Gygi SP, Mitchell JA, Ojuka E, Weidman DA. Divergence of muscle and liver fructose 2,6-diphosphate in fasted exercising rats. *Am J Physiol*. 1991 May;260(5 Pt 1):E756-61. doi: 10.1152/ajpendo.1991.260.5.E756.
- [45] Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol*. 2013 Aug;33(15):2996-3010. doi: 10.1128/MCB.00225-13.
- [46] An Y, Xu W, Li H, Lei H, Zhang L, Hao F, Duan Y, Yan X, Zhao Y, Wu J, Wang Y, Tang H. High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats. *J Proteome Res*. 2013 Aug 2;12(8):3755-68. doi: 10.1021/pr400398b.
- [47] Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidative stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest*. 2004 May;113(9):1277-87. doi: 10.1172/JCI19197.
- [48] Rosa, F.R.; Antioxidant activity of cerrado fruits and identification of compounds in *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (tucum-do-cerrado). 2013. 146 f. Thesis (Ph.D.) - Human Nutrition Course, School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília-df, 2013.
- [49] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):199-218. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.
- [50] Pereira ACS, Dionísio AP, Wurlitzer NJ, Alves RE, de Brito ES, Silva AMO, Brasil IM, Filho JM. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. *Food Chem*. 2014 Aug 15;157:179-85. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.090.

- [51] Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph BV, Alessa FM, Al-MssallemMQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*. 2022 May 2;27(9):2901. doi: 10.3390/molecules27092901.
- [52] Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr*. 2004 Oct;80(4):862-7. doi: 10.1093/ajcn/80.4.862
- [53] Zhu W, Jia Q, Wang Y, Zhang Y, Xia M. The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan;52(2):314-27. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.483.
- [54] Rani N, Velan LPT, Vijaykumar S, Arunachalam A. An insight into the potentially old-wonder molecule-quercetin: the perspectives in foresee. *Chin J Integr Med*. 2015 Sep;9:1-16. doi: 10.1007/s11655-015-2073-x.



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 8 de maio de 2018.

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO CONSUMO DE CAFÉ OU TUCUM-DO-CERRADO (BACTRIS SETOSA MART.) NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS: INTER-RELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS REDOX / INFLAMATÓRIA, MICROBIOTA E A MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, EM RATOS WISTAR.", Protocolo n.º 25/2018, sob responsabilidade da Professora Sandra Fernandes Arruda foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (48 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/07/2018 a 01/07/2022.



Prof. Dr. Cássio José da Silva  
Coordenador da CEUA – UnB

