

MARCOS VIDAL MARTINS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA CASTANHA  
DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* Cambess) EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M378a  
2016  
Martins, Marcos Vidal, 1977-  
Atividade antioxidante e anti-inflamatória da castanha de  
sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) em ratos Wistar / Marcos  
Vidal Martins. – Viçosa, MG, 2016.  
xv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Humberto de Queiróz.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Lecythis pisonis* - Efeito fisiológico. 2. Antioxidantes.  
3. Expressão gênica. 4. Inflamação. 5. Rato como animal  
de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

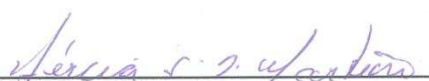
CDD 22. ed.583.76

MARCOS VIDAL MARTINS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA CASTANHA  
DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* Cambess) EM RATOS WISTAR**

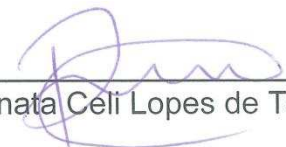
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

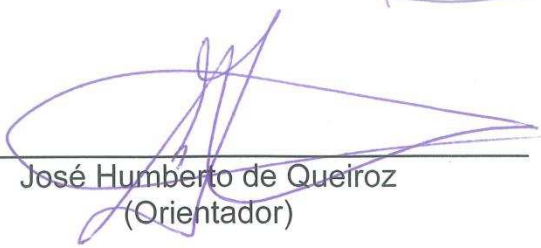
APROVADA: 14 de junho de 2016.

  
Hércia Stampini Duarte Martino

  
Virgínia Ramos Pizzolo

  
Larissa Froede Brito

  
Renata Celi Lopes de Toledo

  
José Humberto de Queiroz  
(Orientador)

*Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Maria Vidal Martins (In memoriam) e José Nunes Martins Filho.*

*“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais  
uma vez Deus, o autor dela”.*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que tudo fizeram por mim a quem devo a minha vida e minha educação. À minha mãe em especial, se eu tivesse o poder de escolha trocava tudo por sua presença. Exemplo de mulher lutou sem desistir da vida e despediu-se dela antes que eu pudesse concluir esse trabalho.

Aos meus irmãos Rita e Márcio e minhas sobrinhas Stella, Isadora e Helena.

À Taura, que me ajudou a controlar os momentos de angústia e ausência durante a execução das tarefas.

À Universidade Federal de Viçosa pelas oportunidades oferecidas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Professor José Humberto de Queiroz pela confiança em mim depositada e por suas valiosas contribuições e palavras de incentivo.

À Izabela Montezano por acreditar e confiar em mim a sequência do seu brilhante trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, especialmente aqueles que me concederam a honra de ser seu aluno.

Ao professor Mafra por disponibilizar o laboratório para a execução das análises de qPCR e por contribuir com suas colocações sempre muito pertinentes.

Às professoras Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Hercia Stampini por terem participado da qualificação com sugestões muito expressivas ao nosso trabalho, principalmente pela visão de nutricionistas e pesquisadoras.

Às Doutoradas: Hércia Stampini Duarte Martinho, Virgínia Ramos Pizzolo, Larissa Froede Brito e Renata Celi Lopes Toledo, por contribuições essenciais e muito cuidadosas na defesa da tese.

Aos colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo e Marco, sempre muito prestativos e competentes.

Aos colaboradores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular especialmente ao grande amigo Jean e a Carol Canal, Nathalie e Túlio.

À Mônica, que teve total disponibilidade e paciência para passar cada metodologia empregada no estudo. Sua ajuda foi mais que fundamental para a execução da pesquisa.

À Renata pessoa ímpar, muito generosa e amiga! Sem suas ajudas e incentivo dificilmente conseguiria chegar a algum lugar.

Aos demais amigos do Laboratório Angélica Gouveia, Angélica Quinelato, Filippe, Silvia, Carlos Mário, Bruna, Isadora, Gabriela, Ariane.

Aos amigos que fiz no programa de pós-graduação, Bil, Rafael Klein, Gabriel, Paulão, Alisson, Letícia, Duílio, Leandro, Fernanda Sales, Roméria, Fernanda Nascimento, Túlio, Didi, Rafa, Gilza, Anna Cláudia, Carlos Cardoso, Tiago Onofre, Mateus e Antônio.

Aos meus amigos de república, José Neto, Valtinho e Herbert.

Aos amigos Cleuber, Galdino, Ian e Evandro.

Ao meu grupo de amigos que fiz durante o mestrado na UFV Fernanda, Jack e Keila, Meirele e em especial, a Karina Martinho responsável pelo meu retorno a UFV.

Ao meu orientador do mestrado Adelson Tinoco pelas palavras de incentivo.

Aos meus novos amigos, colegas de trabalho e alunos da Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho, e que não citei o nome, mas que devo gratidão.

Meus sinceros agradecimentos.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1.0 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
1.3.1. CORRELAÇÕES ENTRE DIETA, ESTADO INFLAMATÓRIO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	5
1.3.2. A FAMÍLIA Lecythidaceae .....	9
1.3.3. <i>Lecythis pisonis</i> Cambess. ....	9
1.3.4. CASTANHA DE SAPUCAIA ( <i>Lecythis pisonis</i> Cambess.).....	10
1.3.5. NUTRIGENÔMICA.....	12
<b>1.4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.0. CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL 1 - Castanha de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i>) modula processo inflamatório e atividade antioxidante em tecido hepático de ratos submetidos à dieta de cafeteria.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
2.2.1. MATERIAL VEGETAL .....	33
2.2.2. ANIMAIS E DIETAS.....	33
2.2.3. EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
2.2.4. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE HEPATICOS .....	36
2.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
<b>2.3. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
2.3.1. GANHO DE PESO, CONSUMO ALIMENTAR E ÍNDICE HEPATO SOMÁTICO .....	38
2.3.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIXIODANTE .....	39
2.3.3. EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE HEPÁTICA.....	40
<b>2.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>

<b>2.6. REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>3.0 CAPÍTULO 3 - ARTIGO ORIGINAL 2 - Efeito neuroprotetor da Castanha de Sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i>) em ratos submetidos à dieta de cafeteria</b> .....	53
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>3.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
3.2.1. MATERIAL VEGETAL .....	56
3.2.2. ANIMAIS E DIETAS .....	56
3.2.3. EXPRESSÃO GÊNICA .....	58
3.2.4. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE CEREBRAL .....	59
3.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	60
<b>3.4. RESULTADOS</b> .....	61
3.4.1. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE .....	61
3.4.2. EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE NO TECIDO CEREBRAL .....	62
<b>3.5. DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>3.6. CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>3.7. REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>3.8. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	74
<b>3.9. ANEXOS</b> .....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B.....	7
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica de <i>L. pisonis</i> (Projeto Reflora).....	10
<b>Figura 3:</b> Flor; Fruto; Castanhas de sapucaia ( <i>Lecythis pisonis</i> Cambess.).....	11
<b>Figura 4:</b> Médias da expressão gênica relativa tecido hepático.....	41
<b>Figura 5:</b> Médias da expressão gênica relativa tecido cerebral.....	63
<b>Figura 6:</b> Interação dos compostos da sapucaia e efeitos no metabolismo.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composições químicas da castanha de sapucaia disponíveis na literatura: .....	12
Tabela 2: Composição da dieta padrão e da dieta padrão acrescida de sapucaia. ....	34
Tabela 3: Composição da Dieta de Cafeteria e da Dieta de Cafeteria acrescida de sapucaia..	35
Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos (Fw e Rv) utilizados no q-PCR .....	36
Tabela 5: Médias do ganho de peso, do consumo e Índice Hepatosomático . ....	39
Tabela 6: Médias das concentrações hepáticas (nmol MDA) e (U SOD) .....	40
Tabela 7: Médias das concentrações cerebrais (nmol MDA) e (U SOD) .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácidos graxos
AIN	Instituto Americano de Nutrição
ANOVA	Análise de variância
CCB	Centro de Ciências Biológicas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico recombinante
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CHO	Carboidratos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DC	Dieta de cafeteria
DC+SAP	Dieta de cafeteria acrescida de castanha de sapucaia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH	Etanol
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FAPEMIG	Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
H <sub>2</sub> O miliQ	Água Ultrapura
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSP-70	Proteína de choque térmico
HSP-72	Proteína de choque térmico
IHS	Índice hepatossomático
IKK	Inibidor Kappa Quinase
IκB	Inibidor Kappa B
IL-1β	Interleucina 1 Beta

IM	Intramuscular
Kcal	Quilocalorias
MDA	Malondialdeído
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MIQE	Informação mínima para publicação em q-PCR
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NTC	Controle negativo
nm	Nanômetros
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PTN	Proteínas
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RI	Resistência à insulina
RT	Transcriptase Reversa
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Hidroximetilaminometano
UFV	Universidade Federal de Viçosa
ZnSOD	Zinco superóxido dismutase

## RESUMO

MARTINS, Marcos Vidal, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2016. **Atividade antioxidante e anti-inflamatória da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) em ratos Wistar.** Orientador: José Humberto de Queiroz.

A *Lecythis pisonis* Cambess conhecida popularmente como castanha de sapucaia, tem origem brasileira e é proveniente da Floresta Pluvial Atlântica. Estudos prévios realizados com a sapucaia em nosso laboratório demonstraram a presença de importantes compostos químicos da sapucaia e revelaram que o uso contínuo na dieta poderá contribuir para efeitos benéficos à saúde. Os principais resultados mostraram que a sapucaia é fonte expressiva de ácidos graxos insaturados, proteínas e minerais como manganês, magnésio zinco e que, em conjunto, podem configurar como potenciais agentes protetores em diferentes desordens metabólicas. Tem-se verificado na literatura que o consumo de castanhas pode trazer importantes benefícios a saúde humana. Alguns trabalhos atribuem às castanhas e nozes efeitos na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis ligadas ao estresse oxidativo. Diante de tais informações objetivamos avaliar a capacidade antioxidante e anti-inflamatória da castanha de sapucaia inserida em diferentes tipos de dieta, a AIN93G e a Dieta de Cafeteria em tecidos hepático e cerebral de 48 ratos da linhagem Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos e o estudo foi conduzido por 28 dias e realizada eutanásia no 14º e no 28º de todos os grupos para que fosse avaliado o impacto em relação ao tempo no metabolismo animal. A Expressão gênica dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e NFkB, bem como dos marcadores antioxidantes ZnSOD e HSP-72 foi determinada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qPCR). A atividade antioxidante também foi verificada pela determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e por mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase. A expressão gênica dos marcadores inflamatórios NFkB (p65) e TNF- $\alpha$  foi menor para os grupos de ratos que consumiram as dietas enriquecidas com sapucaia com diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A proteína de choque térmico HSP-72 e a enzima ZnSOD apresentaram aumento da expressão gênica com

diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ambos os grupos que consumiram sapucaia em suas dietas. As propriedades nutricionais da castanha de sapucaia exerceram importante atividade protetora por modular a atividade antioxidante e o processo inflamatório nos tecidos hepático e cerebral dos animais avaliados

## ABSTRACT

MARTINS, Marcos Vidal, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **Antioxidant and anti-inflammatory activities of Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess ) in Wistar rats.** Adviser: José Humberto de Queiroz.

Popularly known as “sapucaia nut”, *Lecythis Pisonis* Cambess is a Brazilian native tree found in the Atlantic Pluvial Forest. The sapucaia nuts have a marvelous taste and can be eaten raw, boiled or baked. Chemical composition data from our laboratory studies shows that these nuts have great nutritional value the bioactive compounds found among its constituents. Literature as well indicates that nuts consumption can improve health by preventing chronic diseases related to oxidative stress. Thus, the present work aimed to investigate the potential of two sapucaia nuts enriched diets in Wistar rats tissues (liver and brain), AIN-93G and Cafeteria Diet. The animals were divided in four groups and fed during four weeks in order to evaluate the acute and chronic effects of the sapucaia nuts consumption. The gene expression of the anti-inflammatory markers TNF- $\alpha$  and NF $\kappa$ B and the antioxidant markers ZnSOD and HSP-72 were determined by Real-Time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-Time qRT-PCR). The antioxidant activity was also evaluated in the tissues (liver and brain) by quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and determination of the superoxide dismutase (SOD) enzyme activity. Results evince that the sapucaia nuts enriched diets presented antioxidant and anti-inflammatory effects in rat's liver and brain tissues with statistical significance. The two and four week periods of the sapucaia nut enriched Cafeteria diet intake were able to avoid liver and brain oxidative damages caused by the Cafeteria diet stress. Such health benefits are due to the SOD activity's increase and the lipid peroxidation decrease in rat's tissues, which in turn reduced the inflammatory markers gene expression. Accordingly, the gene expression of the inflammatory markers NF $\kappa$ B (p65) and TNF- $\alpha$  was lower in rats fed on diets supplemented with “sapucaia”, and they presented significant difference in the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The heat-shock HSP-72 protein and the ZnSOD enzyme raised the gene expression and showed significant statistical difference ( $p < 0.05$ ) in both groups fed on Sapucaia nut-based diet. Thus, the nutritional properties of the Sapucaia

nuts perform important protective activities because they modulated the anti-oxidant activity and the brain tissue inflammatory process in the assessed animals. According to the results found in this work the sapucaia nut becomes an important and protective dietary component against tissue oxidant and inflammatory agents.

## 1.0 INTRODUÇÃO GERAL

O padrão dietético pode atuar em mecanismos moduladores de processos patológicos (SHEN et al., 2015; ROS, 2009). A hipertrofia do tecido adiposo causada pelo desequilíbrio entre consumo de alimentos e gasto energético induz o aumento e a infiltração de macrófagos e conseqüentemente inflamação com produção de adipocinas inflamatórias (SPERETTA et al., 2014).

Dentre os macronutrientes, os lipídeos parecem possuir maior influência no acúmulo de adiposidade corporal desenvolvimento de doenças como hipertrigliceridemia e sensibilidade à insulina decorrente do aumento de peso corporal, uma alta ingestão de gorduras saturadas podem causar alterações na composição das membranas celulares, e reduzir a taxa metabólica basal de indivíduos que ingerem grande quantidade de ácidos graxos saturados (SHEN et al., 2015; ZHANG et al., 2011; NAKAZONE et al., 2007).

É verificado também associações entre aumento da ingestão de glicose e estado pró-inflamatório, associado a aumento da síntese do ânion superóxido pelos leucócitos e células mononucleares e elevação da quantidade e da atividade do fator nuclear kappa-B (NFκB), aumento de fatores de transcrição, bem como, aumento de formação de radicais livres e citocinas inflamatórias como TNF-α e Interleucinas (DE LA FUENTE et al., 2015; JIAO et al., 2008; ALJADA et al., 2004; CERIELLO et al., 2004)

Comportamentos alimentares saudáveis são inversamente associados com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (SHEN et al., 2015; MANGAT et al., 2009). Para minimizar tais acontecimentos, a literatura mostra por meio de diversos trabalhos que o consumo de castanhas pode trazer importantes efeitos benéficos a saúde humana (SOUZA et al., 2015; GROSSO et al., 2015; MCKAY et al., 2015; SABATÉ; ANG, 2009; MANGAT et al., 2009). As castanhas constituem o segundo grupo de alimentos que mais contém ácidos graxos insaturados que podem reduzir o colesterol e prevenir doenças cardiovasculares. Estão incluídas nesse grupo as variedades de castanhas do Pará e de caju, nozes, amêndoas, pistache, avelã, macadâmia e as sementes comestíveis como o amendoim e a amêndoa de baru (MARTIN et al., 2015;

BULLÓ et al., 2015; FREITAS et al., 2010; GRIEL et al., 2008; VENKATACHALAM, 2006).

Há indícios de que a dieta mediterrânea, por exemplo, possa influenciar os fatores envolvidos no processo inflamatório desencadeado pelo acúmulo de gordura corporal. A Dieta mediterrânea vem sendo largamente estudada, revelando a importância das castanhas na prevenção das doenças cardiovasculares. A referida dieta constitui-se de teores elevados de ácidos graxos monoinsaturados por conter peixes, azeite de oliva, além de ser rica em fibras alimentares e carboidratos complexos e com baixos teores de ácidos graxos saturados (SHEN et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2015; WIDMER et al., 2015; BRESSAN et al., 2009; SALAS-SALVADÓ et al., 2008; FITÓ et al., 2007).

Mesmo com várias espécies de castanhas em nosso bioma, apenas as de caju e a do Pará estão disponíveis, com maior frequência, para a população. Uma espécie pouco explorada para consumo humano é a castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), sendo considerada por alguns consumidores a melhor castanha da Amazônia (DE CARVALHO et al., 2012; SAMPAIO, 2000; LORENZI, 1995). A exploração de um alimento nativo e rico em nutrientes como a sapucaia possibilita a sua utilização, bem como se associa com desenvolvimento sustentável e geração de renda para pequenos agricultores.

Estudos prévios realizados com a sapucaia em nosso laboratório demonstraram a presença de importantes compostos químicos, a saber: ácido graxo oleico, linoleico e linolênico, manganês, magnésio e zinco. Tais nutrientes em conjunto, podem configurar como agentes protetores em diferentes desordens metabólicas. O nosso mesmo grupo ainda identificou no mesmo modelo, que a sapucaia foi capaz de reduzir o colesterol total e aumentar o HDL colesterol em ratos que consumiram a castanha em suas dietas (CARVALHO, 2013; DE CARVALHO et al, 2012).

Os demais trabalhos realizados até o momento sobre a castanha de sapucaia abordaram apenas características nutricionais (DE SOUZA et al., 2008; DENADAI et al., 2007; VALLILO et al., 1999). Porém há relatos na literatura com outras formas de utilização da *L. Pisonis*. Oliveira et al (2012) descreveram a investigação fitoquímica das folhas dessa espécie e a avaliação da citotoxicidade de seus extratos. O mesmo grupo de pesquisa investigou a

atividade antinociceptiva do extrato etanólico (EtOH) das folhas de *L. pisonis* em testes de avaliação da dor aguda em ratos (BRANDÃO et al, 2013).

De acordo com os componentes nutricionais da *L. pisonis* encontrados por De Carvalho et al (2012), o presente estudo baseia-se na hipótese de que a castanha de sapucaia inserida nas dietas de ratos poderá apresentar efeitos protetores à saúde como o aumento da atividade antioxidante bem como atenuação do processo inflamatório, nos tecidos hepático e cerebral de ratos wistar.

## **1.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da castanha de sapucaia na regulação da atividade antioxidante e anti-inflamatória em ratos Wistar.

## **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito da inserção da sapucaia na dieta nos tecidos hepático e cerebral de ratos alimentados com dieta padrão e de cafeteria:

- Na peroxidação lipídica por determinação da concentração de malondialdeído;
- Na atividade antioxidante por avaliação da enzima superóxido dismutase;
- Na defesa antioxidante pela expressão gênica da proteína HSP-72 e da enzima ZnSOD;
- Na atividade anti-inflamatória pela expressão gênica do TNF- $\alpha$  e do NF $\kappa$ B.

## 1.3. CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1. CORRELAÇÕES ENTRE DIETA, ESTADO INFLAMATÓRIO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A sociedade moderna trouxe consigo profundas mudanças no estilo de vida das pessoas. Os padrões das dietas estão cada vez menos saudáveis e os indivíduos se apresentam cada vez mais sedentários, o que resulta em desordens metabólicas que aumentam o risco para o surgimento de doenças (MICHA; MOZAFFARIAN, 2009; ESPOSITO; GIUGLIANO, 2006).

O consumo excessivo de energia aliado ou não ao comportamento sedentário contribui para o aparecimento de desordens metabólicas associadas ao aumento de peso corporal e à resistência sistêmica a insulina determinada pelo estado inflamatório crônico e subclínico que gera um aumento da adiposidade (CAROBBIO et al., 2011; ZHANG et al., 2011; NAKAZONE et al., 2007).

Além das funções de armazenamento energético, isolamento térmico e barreira física, o tecido adiposo desempenha o papel de um órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocinas, que atuam não somente no tecido adiposo, mas de forma sistêmica (LEITE et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2007).

As adipocinas desempenham um papel importante no equilíbrio energético, controle da ingestão alimentar, sensibilidade à insulina, resposta imunológica, regulação da coagulação e pressão sanguínea e doenças vasculares. Portanto, alterações no mecanismo de ação das adipocinas, podem estar relacionadas ao surgimento da obesidade e suas complicações (GODOY-MATOS et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2007; CARVALHO et al., 2006; HOTAMISLIGIL, 2006).

Estudos mostram que indivíduos obesos apresentam redução de adiponectina quando comparados com indivíduos não obesos e que sua concentração se correlaciona negativamente ao acúmulo de gordura em homens e mulheres. Investiga-se a possibilidade de que concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$  ou produtos secretados pelo próprio tecido adiposo visceral possam inibir a síntese e/ou secreção de adiponectina (ARITA, 2012;

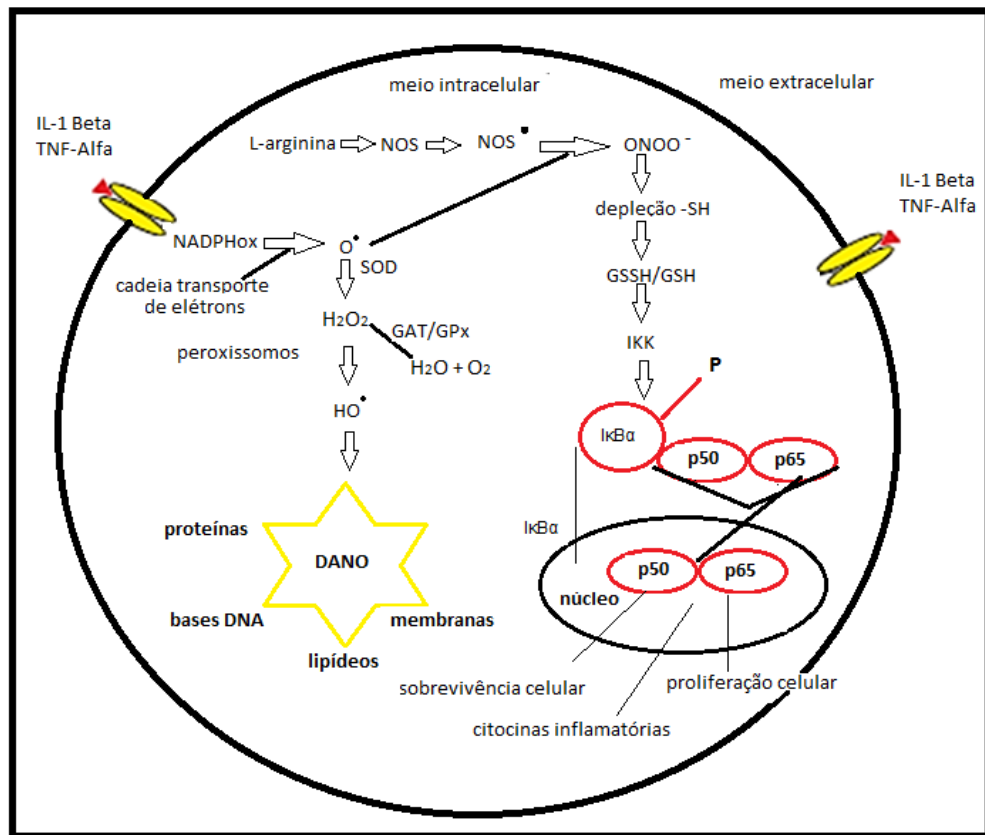
DA SILVEIRA et al., 2009; MATSUZAWA, 2006; STEFAN et al., 2002; WEYER et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2002).

Diversos ácidos graxos exercem efeitos reguladores através do receptor nuclear kappa B (NFkB) (ALAYNICK, 2008; DE MARTIN et al., 2005). A família do NFkB é um complexo proteico que inclui: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. A ativação deste fator associa-se com a modulação de genes do processo inflamatório, a resposta imunológica inata, a anti-apoptose e a sobrevivência celular, os quais ativam o complexo de proteína quinase IKK que fosforila o Ikb levando a sua degradação pelo proteassoma, liberando dímeros, por exemplo, p50-p65 que migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos com um aumento da expressão de múltiplos genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias (HOESEL; SCHMID, 2013). Esta via é ativada por uma variedade de sinais inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, que leva a ativação do complexo IKK (HOESEL; SCHMID, 2013; FRANCO, 2010; DA SILVEIRA et al., 2009; BELLIDO et al., 2004; KALTSCHMIDT et al., 2005; XIAO, 2004) (Figura 1).

A compreensão dos mecanismos moleculares que levam à inflamação poderá gerar importantes implicações para a concepção de novas terapias para reduzir a morbidade e mortalidade ocasionada pelo aumento de peso através da prevenção de suas desordens inflamatórias crônicas associadas (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012).

Estudos com ratos wistar utilizados em modelos experimentais confirmaram que as dietas hipercalóricas e hiperlipídicas induzem a obesidade (BURNEIKO et al., 2006; KRETSCHMER et al., 2005; ESTADELLA et al., 2004), e estas conforme já explicitado induzem o aumento de lipídios corporais e o estresse oxidativo caracterizado pela inflamação (SCOARIS et al., 2010; ECHARRI et al., 2009; BELTOWSKI et al., 2009; BRUNETTI et al., 2009; GÓMEZ-RUIZ et al., 2009). O aumento de gordura no tecido adiposo gera infiltração de macrófagos generalizando uma inflamação crônica neste tecido e ao mesmo tempo engloba outros tecidos como o hepático e o cerebral (ALEMANY, 2013; ALVES et al., 2012). Portanto, evidências científicas sugerem que a ingestão excessiva de macronutrientes, em especial glicose e lipídios, esteja relacionada ao processo inflamatório sub-clínico associado à obesidade, ao aumento do estresse oxidativo e à ativação de fatores de

transcrição dos marcadores inflamatórios (SOTTERO et al., 2015; HOESEL; SCHMID, 2013; KALTSCHMIDT et al., 2005; XIAO, 2004).



**Figura 1:** Mecanismo de ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NFκB) a partir de alterações do desequilíbrio redox. Quando a proteína inibidora IκB é fosforilada o NFκB é translocado para o núcleo e a ativação deste fator promove a mediação de citocinas inflamatórias (esquema adaptado de Filippin et al, 2008).

O estresse oxidativo decorre da sobrecarga celular de glicose e lipídios pelo elevado consumo alimentar e inatividade física, resultando em maior produção de radicais livres. As células musculares e adiposas se protegem produzindo resistência à insulina (RI) de forma a impedir a penetração desses nutrientes nas células (SOTTERO et al., 2015; REBUGLIO VELLOSA et al., 2013; SHOELSON et al., 2007; CERIELLO et al., 2004).

Substâncias antioxidantes são aquelas que, quando em pequenas quantidades, são capazes de retardar ou inibir processos oxidativos, como, por exemplo, a lipoperoxidação (ATOUI et al., 2005; CHUN et al., 2005). A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) é equilibrada naturalmente pela existência desses compostos (BARBOSA et al., 2010; VELLOSA et al., 2007).

Nos organismos, o sistema enzimático configura-se como a primeira linha de defesa antioxidante contra as ERO (BORGES; LESSA, 2015). Porém, com a finalidade de melhor êxito em impedir danos celulares decorrentes de estresse oxidativo, o aporte exógeno de substâncias com potencial antioxidante é extremamente importante (BORGES; LESSA, 2015).

A célula possui um sistema de defesa que pode atuar como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, esse sistema é constituído pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, que na linha de defesa, possui a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; VELLOSSA et al., 2007).

Componentes da dieta, como o tocoferol, ascorbato, carotenoides e compostos fenólicos presentes nos alimentos constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo, incluindo moléculas lipofílicas ou hidrofílicas, que protegem compartimentos apolares e polares do meio biológico, respectivamente (STIPANUK, 2013; RIBEIRO et al., 2005).

Nos organismos submetidos a diferentes condições de estresse, além das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas existem uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas proteínas de choque térmico ou Heat Shock Proteins (HSP). Tais proteínas têm sua expressão gênica alterada por diferentes estímulos que resultam no acúmulo de proteínas desnaturadas no meio intracelular (CASTRO et al., 2014). Essas proteínas são consideradas chaperonas moleculares atuando em mecanismo que conferem proteção ao organismo, uma vez que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, desempenham funções importantes evitando interações incorretas entre estas, auxiliando na montagem final das mesmas, assim como em sua síntese, facilitando o dobramento correto de proteínas sintetizadas e suas translocações para os compartimentos celulares (CASTRO et al., 2014; MAYER; BUKAU, 2005).

As HSP são encontradas em pequenas concentrações e em diferentes compartimentos dentro das células, sendo em caso de injúria desencadeadas respostas intracelulares, que se inicia com a redução transitória da síntese de

proteínas não vitais, seguida por um aumento na expressão de genes específicos que levam ao aumento da concentração das HSP, as quais irão agir no reparo de estruturas na molécula proteica e na identificação e remodelamento de proteínas danificadas durante o estresse, além de auxiliar a síntese de novas proteínas, conservando e mantendo sua forma estrutural. Os mecanismos intracelulares e extracelulares que modulam a expressão dessas proteínas, ainda necessitam ser mais investigados, uma vez que apesar destas proteínas serem consideradas essenciais no processo de recuperação celular, ainda não está totalmente elucidado como isto ocorre (BURG et al., 2007).

As proteínas HSP exercem efeitos em diversos processos anti-apoptóticos (BURG et al., 2007): inibem vias de sinalização intracelular, tais como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do NFκB (SINGLETON et al., 2005); reduzem a ativação de sinais de tradução e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1β e o TNF-α; as HSP diminuem ainda a concentração do glutamato nas sinapses impedindo assim a translocação do NFκB ao núcleo levando ao bloqueio desta via (SINGLETON et al., 2005). Portanto, com o aumento da expressão da proteína HSP obtém-se um efeito anti-inflamatório devido ao bloqueio do fator de transcrição pró-inflamatório (NFκB) e conseqüentemente com inibição da expressão de marcadores inflamatórios como IL-1β e TNF-α (KIM et al., 2015; TAWFIK et al., 2012).

### 1.3.2. A FAMÍLIA Lecythydaceae

As Lecythydaceae, “família das castanhas brasileiras”, são árvores tropicais de planície que atingiram sua maior diversidade em espécies na região neotropical. A família se diversifica, principalmente em ambientes de terra firme, na Amazônia e Guianas. Cerca de 50% de todas as Lecythydaceae tropicais são encontradas na Amazônia (MORI, 1990).

### 1.3.3. *Lecythis pisonis* Cambess.

As folhas das *Lecythis pisonis* são comumente utilizadas no preparo de banhos contra pruridos corporais. O óleo de suas sementes também pode ser utilizado como analgésico muscular (FRANCO e BARROS, 2006; AGRA 2007).

Outros aspectos agregados a partir da *L. pisonis* podem ser explorados tais como, alimento animal e humano, cosmético, medicinal, ornamental, têxtil, entre outros (SAMPAIO, 2000).

Com mostra a Figura 2, *L. pisonis* pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, abrangendo os biomas Amazônia e Mata Atlântica.

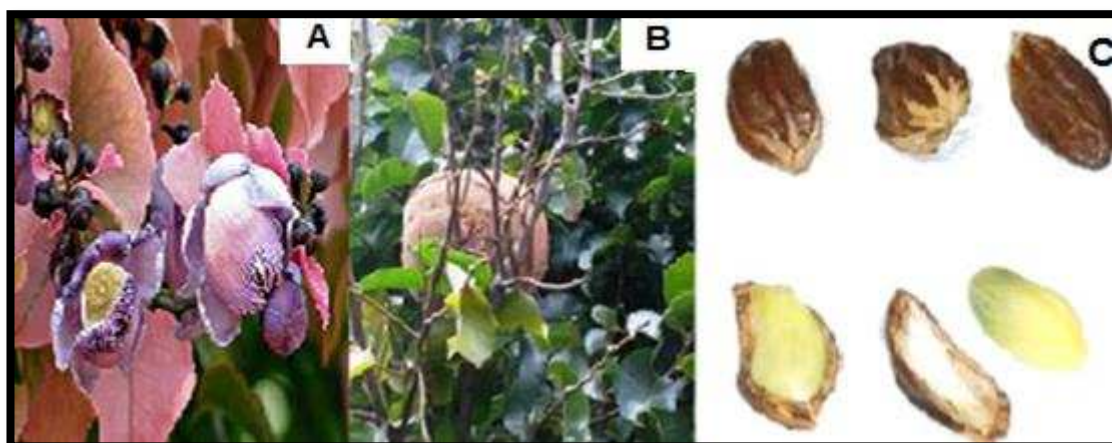


**Figura 2:** Distribuição geográfica de *L. pisonis* (Projeto Re flora, 2016).

#### 1.3.4. CASTANHA DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* Cambess.)

Atualmente as sementes, nozes e castanhas comestíveis têm recebido atenção especial de pesquisadores no que tange a possibilidade da sua utilização como fontes naturais de nutrientes como vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos essenciais, podendo assim contribuir para a dieta humana e de animais. Tais alimentos são fontes potenciais de compostos bioativos cujo consumo regular pode trazer benefícios significativos à saúde humana (GROSSO et al., 2015; BROWN et al., 2015; BULLÓ et al., 2015; ALASALVAR et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; CARVALHO 2013; DA COSTA et al., 2010; FREITAS et al., 2010; DENADAI et al., 2007).

As castanhas nativas comercializadas no Brasil são: caju (*Anacardium occidentale* L.) e castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Kunth) (CARVALHO et al., 2012; CHAVES et al., 2004). Entretanto, as florestas brasileiras possuem inúmeras outras espécies nativas cujos frutos e sementes podem ser incorporadas à alimentação como fontes de nutrientes, sendo, portanto, de extrema importância o estudo destas novas fontes alternativas de alimentos de baixo custo. O estudo em questão contempla uma dessas espécies nativas: a castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) (Figura 3).



**Figura 3:** A: Flor; B: Fruto; C: Castanhas de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.).

A castanha de sapucaia é comestível (MILLIKEN et al., 1986), oleaginosa e muito palatável (GEMTCHÚJNICOV, 1976; LORENZI, 1995). Pode ser consumida ao estado natural, tostada, assada ou cozida (REVILLA, 2002). Ainda pode ser usada na culinária e também em confeitarias (FAO, 1986), constituindo um excelente alimento, podendo substituir as nozes, amêndoas ou castanhas europeias. As castanhas de *L. pisonis* são consideradas como de qualidade superior comparada a outras castanhas (FAO, 1986) sendo ainda uma excelente fonte de calorias e proteínas, além de boa digestibilidade (DE CARVALHO et al., 2012; DENADAI et al., 2007; SAMPAIO, 2000; DE SOUZA et al, 2008; REVILLA, 2001; VALLILO et al., 1999; WICKENS, 1995). Os valores nutricionais do fruto abrangem uma variação de acordo com a sazonalidade e localização e estão descritos na Tabela 1.

O estudo conduzido em nosso laboratório realizado por De Carvalho et al. (2012) demonstrou que a sapucaia possui uma elevada concentração de

ácidos graxos insaturados na composição do óleo de castanha de sapucaia, dos quais, 42% ácidos graxos monoinsaturados e 43% ácidos graxos poli-insaturados. Entre os monoinsaturados, o ácido oleico se destacou por estar contido em 41% dos lipídios da amostra, e entre os poli-insaturados, o ácido linoleico com 43% do total de lipídios.

**Tabela 1:** Composições químicas da castanha de sapucaia disponíveis na literatura:

Nutrientes por 100 g	Referências e locais de estudo			
	DE CARVALHO et al., 2012 (Minas Gerais)	DE SOUZA et al., 2008 (Piauí)	DENADAI et al., 2007 (São Paulo)	VALLILO et al., 1999 (São Paulo)
Lipídios totais (%)	54,8	66	60,6	34 a 61
Proteínas (%)	26,8	19,6	20,4	-
Carboidratos (%)	5,0	-	3,2	-
Fibras (%)	-	8	5,6	-
Cinzas (%)	3,1	3,4	-	-
Zinco (mg)	4	-	4,3	2,6 a 13,7
Manganês (mg)	4,8	6,8	8	0,4 a 1,1
Ferro (mg)	7	-	3,2	-
Cobre (mg)	2,3	3	3,2	2,9 a 3,3
Magnésio (mg)	343	449	279	124 a 168
Cálcio (mg)	182	229	172	80 a 90

As propriedades nutricionais da sapucaia obtidas nos diferentes estudos apresentados na tabela 1 sugerem que este alimento pode apresentar efeitos protetores à saúde, sobretudo devido aos teores encontrados para zinco, manganês, magnésio e cobre. Tais componentes nutricionais encontrados estão diretamente relacionados com esta finalidade de impedir ou minimizar danos celulares decorrentes de estresse oxidativo. Ademais, há uma estreita relação entre a ação antioxidante e a diminuição do estado inflamatório, sendo assim a castanha poderá atuar como um componente alimentar muito importante no contexto de proteção à saúde.

### 1.3.5. NUTRIGENÔMICA

Com o sucesso do Projeto Genoma Humano e os avanços em tecnologias, uma quantidade significativa de informações foi relacionada com genes humanos e seus mecanismos. Por sua vez, a nutrigenômica, é um campo formado entre saúde, dieta e genômica para analisar os padrões de expressão gênica, expressão de proteínas e produção de metabólitos

desencadeada por nutrientes (MECHANICK et al., 2015; GHOSH et al. 2007; AFMAN; MÜLLER, 2006; MARTI et al., 2005).

A nutrigenômica pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais a nutrição afeta as vias metabólicas subjacentes do controle homeostático. Os nutrientes presentes na dieta são recebidos como sinais pelo sistema sensorial das diferentes células no organismo, que são interpretados pelas células para a expressão de genes, proteínas e produção de metabolitos. Assim, diferentes padrões de dieta podem induzir uma variedade de genes e expressão de proteínas e produção de metabolitos (MECHANICK et al., 2015; AFMAN; MÜLLER, 2006; TRUJILLO et al., 2006; MARTI et al., 2005; GILLIES, 2003).

Um importante objetivo da nutrigenômica é estudar as influências da nutrição sobre o papel do estresse metabólico na gênese da síndrome metabólica, a coleção de fenótipos que combinam aspectos da inflamação, do estresse metabólico, da resistência à insulina e do diabetes. Tal objetivo baseia-se na ideia de que a nutrição deve centrar-se, sobretudo, na prevenção de doenças e ser complementada à terapia farmacológica, que tem como alvo os aspectos fisiopatológicos da doença (QUINTERO et al., 2015; AFMAN; MÜLLER, 2006; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

A nutrigenômica tem-se concentrado principalmente em saúde e prevenção de doenças humanas (MUTCH et al., 2005; MÜLLER; KERSTEN, 2003). Estudos têm demonstrado como determinados genes contidos em tecidos e células brancas controlam o metabolismo, resposta imune, crescimento celular ou regulação da transcrição respondem a restrições dietéticas (BYRNE et al., 2005, DHAHBI et al., 2005; WEINDRUCH et al., 2001).

Os receptores nucleares que controlam a expressão gênica são proteínas que podem ser associados diferentes ligantes (glicocorticoides, mineralocorticoides, hormônios sexuais, hormônios da tireoide entre outros). Esses ligantes são agrupados em receptores endócrinos, receptores órfãos e receptores órfãos adotados, para os quais tiveram seus ligantes identificados. Estes últimos ocorrem em sua maioria no núcleo e possuem grande interesse biomédico e farmacológico (ALAYNICK, 2008; CHAWLA et al., 2001). A ligação dos fatores de transcrição com regiões específicas dos genes gera alterações na molécula de DNA possibilitando que a enzima RNA polimerase inicie a

transcrição, assim, podemos compreender a dinâmica que pode ativar ou inativar genes (KAUWELL, 2005).

Diversos ácidos graxos exercem efeitos reguladores através do receptor nuclear kappa B (NFkB) (DE MARTIN et al., 2005; ALAYNICK, 2008). A família do NFkB é um complexo proteico que inclui: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. A ativação deste fator associa-se com a modulação de genes do processo inflamatório, a resposta imunológica inata, a anti-apoptose e a sobrevivência celular, os quais ativam o complexo de proteína quinase IKK que fosforila o IκB levando a sua degradação pelo proteassoma, liberando dímeros, por exemplo, p50-p65 que migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos com um aumento da expressão de múltiplos genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias (HOESEL; SCHMID, 2013). Esta via é ativada por uma variedade de sinais inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, que leva a ativação do complexo IKK (FRANCO, 2010; DA SILVEIRA et al., 2009; KALTSCHMIDT et al., 2005;).

A compreensão dos mecanismos moleculares que levam à inflamação poderá gerar importantes implicações para a concepção de novas terapias para reduzir a morbidade e mortalidade ocasionada pelo aumento de peso através da prevenção de suas desordens inflamatórias crônicas associadas (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012).

#### 1.4. REFERÊNCIAS

AFMAN, Lydia; MÜLLER, Michael. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 106, n. 4, p. 569-576, 2006.

AGRA, Maria de Fátima; FREITAS, Patrícia França de; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALASALVAR, Cesarettin; BOLLING, Bradley W. Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S68-S78, 2015.

ALAYNICK, William A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. **Mitochondrion**, v. 8, n. 4, p. 329-337, 2008.

ALEMANY, Marià. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2013.

ALJADA, Ahmad et al., Glucose intake induces an increase in activator protein 1 and early growth response 1 binding activities, in the expression of tissue factor and matrix metalloproteinase in mononuclear cells, and in plasma tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 51-57, 2004.

ALVES, Natalia et al., Studies on mechanistic role of natural bioactive compounds in the management of obesity an overview. **Tonutraj**, v. 5 n.1, p.193-206, 2012.

ARITA, Yukio. Reprint of "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 3, p. 560-564, 2012.

ATOUI, Ali K. et al., Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al., Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BELLIDO, Cecilia et al., Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1487-1491, 2004.

BELTOWSKI, Jerzy et al., Resistance to acute NO-mimetic and EDHF-mimetic effects of leptin in the metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 85, n. 15, p. 557-567, 2009.

BONDIA-PONS, Isabel; RYAN, Lisa; MARTINEZ, J. Alfredo. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701-711, 2012.

BORGES, Juliana Pereira; LESSA, Marcos Adriano. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. AHEAD, p. 0-0, 2015.

BRANDÃO, M. S. et al., Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (*Lecythidaceae*) in models of acute pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 180-186, 2013.

BRESSAN, Josefina et al., Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 572-581, 2009.

BROWN, Rachel C. et al. Association of Nut Consumption with Cardiometabolic Risk Factors in the 2008/2009 New Zealand Adult Nutrition Survey. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7523-7542, 2015.

BRUNETTI, Luigi et al., Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1323-1327, 2009.

BULLÓ, M. et al. Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S79-S93, 2015.

BURG, Maurice B.; FERRARIS, Joan D.; DMITRIEVA, Natalia I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1441-1474, 2007.

BURNEIKO, Regina CM et al., Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.

BYRNE, K. A. et al., Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 1-12, 2005.

CAROBIO, Stefania; RODRIGUEZ-CUENCA, Sergio; VIDAL-PUIG, Antonio. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 520-526, 2011.

CARVALHO, Maria Helena C. de; COLAÇO, André Luiz; FORTES, Zuleica Bruno. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 304-312, 2006.

CARVALHO, Izabela Maria Montezano de. Composição e efeito da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) nos parâmetros bioquímicos, histológicos e inflamatórios em ratos alimentados com dieta de cafeteria. 2013.

CASTRO, Simone Vieira et al., PROTEÍNAS DE CHOQUE TERMICO HSP-70: ESTRUTURA E ATUAÇÃO EM RESPOSTA AO ESTRESSE CELULAR. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2014.

CERIELLO, Antonio; MOTZ, Enrico. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 816-823, 2004.

CHAVES, Mariana H. et al., Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 404-408, 2004.

CHAWLA, Ajay et al., Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, 2001.

CHUN, Sung-Sook et al., Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

DA COSTA, Paulo Afonso et al., Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603-1606, 2010.

DA SILVEIRA, Marcos Reginiet al., Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 11, n. 4, p. 466-472, 2009.

DE CARVALHO, Izabela Maria Montezano et al., Chemical characterization of sapucaia nuts (*Lecythis pisonis* Cambess.) from zona da mata mineira region. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.

DE LA FUENTE, Verónica et al., NF- $\kappa$ B Transcription Factor Role in Consolidation and Reconsolidation of Persistent Memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 50, 2015.

DE MARTIN, Rainer et al., The transcription factor NF- $\kappa$ B and the regulation of vascular cell function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 11, p. e83-e88, 2000.

DE SOUZA, Valdomiro Aurélio Barbosa et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, 2008.

DENADAI, Sandra Maria Silveira et al., In vitro digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DHAHBI, Joseph M. et al., Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling. **Physiological Genomics**, v. 23, n. 3, p. 343-350, 2005.

ECHEVERRI, Juan Alvaro et al., Witoto ash salts from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 492-502, 2011.

ESPOSITO, Katherine; GIUGLIANO, Dario. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. **European Heart Journal**, v. 27, n. 1, p. 15-20, 2006.

ESTADELLA, Debora et al., Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

FAO. Food and fruit-bearing forest species; examples from Latin America. **FAO Forestry Paper**, v. 44, p. 3, 1986.

FENECH, Michael. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics—diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1365-1370, 2008.

FILIPPIN, Lidiane Isabel et al. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

FITO, Montserrat et al., Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 11, p. 1195-1203, 2007.

FRANCO, Daiane Gil. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista de Biologia**, v. 4, p. 35-9, 2010.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FREITAS, Jullyana Borges; NAVES, Maria Margareth Veloso. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde: [revisão]. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

GEMTCHÚJNICOV, ID de. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico, agrícola, ornamentais e medicinais**. São Paulo: Ceres, 1976.

GIL-CAMPOS, Mercedes; CAÑETE, Ramón; GIL, Angel. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 963-974, 2004.

GILLIES, Peter J. Nutrigenomics: the Rubicon of molecular nutrition. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 103, n. 12, p. 50-55, 2003.

GODOY-MATOS, Amélio et al., Adipocinas: uma visão geral dos seus efeitos metabólicos. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.

GÓMEZ-RUIZ, Ana, et al., "Time-dependent regulation of muscle caveolin activation and insulin signalling in response to high-fat diet." **FEBS letters** 583.19 (2009): 3259-3264.

GRIEL, Amy E. et al., A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 4, p. 761-767, 2008.

GROSSO, Giuseppe et al. Nut consumption on all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 4, p. 783-793, 2015.

GUIMARÃES, Daniella Esteves Duque et al., Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 549-559, 2007.

GUIMARÃES, Raphael Mendonça et al., Regional differences in cardiovascular mortality transition in Brazil, 1980 to 2012. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 37, n. 2, p. 83-89, 2015.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HOESEL, Bastian; SCHMID, Johannes A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, n. 86, p. 1-15, 2013.

Projeto Re flora. Disponível em:

<<http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/jabot/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do;jsessionid=28F9D761F9891C033210DD01396897AD>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.

IMAMURA, Fumiaki et al., Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 3, p. e132-e142, 2015.

JIAO, Ping et al., Obesity-related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes: Involvement of NF- $\kappa$  B and JNK Pathways. **Diabetes**, 2008.

KALTSCHMIDT, Barbara; WIDERA, Darius; KALTSCHMIDT, Christian. AUWELL, Gail PA. Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 20, n. 1, p. 75-87, 2005.

KIM, J. Y.; YENARI, M. A.; LEE, J. E. Regulation of inflammatory transcription factors by heat shock protein 70 in primary cultured astrocytes exposed to oxygen–glucose deprivation. **Neuroscience**, v. 286, p. 272-280, 2015.

KRETSCHMER, Beate D. et al., Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, v. 76, n. 14, p. 1553-1573, 2005.

LEITE, Lúcia Dantas; DE MEDEIROS ROCHA, Érika Dantas; BRANDÃO-NETO, José. Obesidade: uma doença inflamatória. **Ciência & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2010.

LIN, Chih-Pei et al., Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. **Biomed Research International**, v. 2013, 2012.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.- col. illus. v. 4, 1992.

MANGAT, Iqwal. Do vegetarians have to eat fish for optimal cardiovascular protection? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1597S-1601S, 2009.

MARTI, Amelia et al., Avances em nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 3, p. 157-164, 2005.

MARTIN, Nicole et al., Nut consumption for the primary prevention of cardiovascular disease. **The Cochrane Library**, 2015.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Miguel A., et al., Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. **Progress in Cardiovascular Diseases**, 2015.

MATSUZAWA, Yuji. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 17, p. 1896-1901, 2010.

MATSUZAWA, Yuji. The metabolic syndrome and adipocytokines. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2917-2921, 2006.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. HSP-70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MCKAY, Diane L. et al. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. **Food Chemistry**, v. 168, p. 233-240, 2015.

MECHANICK, Jeffrey I. et al., Snapshot: The Molecular Nutrition Paradigm. In: **Molecular Nutrition The Practical Guide**. The Endocrine Society, 2015. p. 1-4.

MICHA, Renata; MOZAFFARIAN, Dariush. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 335-344, 2009.

MILLIKEN, W.; MILLER, R.P.; POLLARD, S.R.; WANDELLI, E.V. **The Ethnobotany of The Waimiri Atroariindians of Brazil**. Kew: Royal Botanic Garden, 1986. 146 p.

MORI, Scott. Diversificação e conservação das Lecythidaceae neotropicais. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, n. 1, 1990.

MÜLLER, Michael; KERSTEN, Sander. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 4, p. 315-322, 2003.

MUTCH, David M.; WAHLI, Walter; WILLIAMSON, Gary. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 12, p. 1602-1616, 2005.

NAKAZONE, Marcelo Arruda et al., Prevalência de síndrome metabólica em indivíduos brasileiros pelos critérios de NCEP-ATPIII e IDF. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 407-13, 2007.

NASCIMENTO, Clarissa de Matos et al., Estado nutricional e fatores associados em idosos do Município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 12, p. 2409-2418, 2011.

OLIVEIRA, Carvalho et al., Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis Pisonis* Camb. **Medicinal Plant Research**, p. 353, 2014.

OLIVEIRA, Jocélia PC et al., Chemical constituents of *Lecythispisonis* and cytotoxic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1140-1144, 2012.

PÉREZ-ECHARRI, Nerea et al., Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 705-714, 2009.

QUINTERO, Yurimay; BASTARDO, Gladys; ANGARITA, Coromoto. LA NUTRICIÓN MOLECULAR Y SUS APORTES AL ESTUDIO DE LA OBESIDAD. **Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo**, v. 13, n. 1, p. 14, 2015.

REBUGLIO VELLOSA, José Carlos et al., Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305-312, 2013.

REVILLA, Juan. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2002.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al., A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, 2006.

RIMBACH, Gerald et al., Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1308-1319, 2008.

ROS, Emilio. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1649S-1656S, 2009.

ROSS, David; MOLDEUS, Peter. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **Membrane Lipid Oxidation**, v. 2, p. 151-170, 1991.

SABATÉ, Joan; ANG, Yen. Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1643S-1648S, 2009.

SALAS-SALVADÓ, Jordi et al., Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 22, p. 2449-2458, 2008.

SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p. 141-147.

SANHUEZA, Julio; VALENZUELA, Alfonso. Receptores nucleares y regulación de la expresión génica por ácidos grasos poliinsaturados: Algo más que producción de energía y esencialidad. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 33, n. 2, p. 150-161, 2006.

SCOARIS, Célia Regina et al., Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 312-320, 2010.

SHEN, Jiaet al., Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. **Annual Review of Nutrition**, n. 0, 2015.

SHOELSON, Steven E.; HERRERO, Laura; NAAZ, Afia. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.

SIEBENLIST, Ulrich; FRANZOSO, Guido; BROWN, Keith. Structure, regulation and function of NF-kappaB. **Annual Review of Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 405-455, 1994.

SILVA, L. L. et al., Effects of *Lecythispisonis* Camb.(Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 90-97, 2012.

SINGLETON, Kristen D.; BECKEY, Virginia E.; WISCHMEYER, Paul E. Glutamine prevents activation of NF-κB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**, v. 24, n. 6, p. 583-589, 2005.

SMITH, William C. et al., A meta-analysis of education effects on chronic disease: The causal dynamics of the Population Education Transition Curve. **Social Science & Medicine**, v. 127, p. 29-40, 2015.

SOTTERO, Barbara et al., Postprandial Dysmetabolism and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Medicinal Research Reviews**, 2015.

SOUZA, Rávila GM et al. Nuts and legume seeds for cardiovascular risk reduction: scientific evidence and mechanisms of action. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 6, p. 335-347, 2015.

STEFAN, Norbert et al., Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4652-4656, 2002.

STIPANUK, Martha H.; CAUDILL, Marie A. **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. Elsevier Health Sciences, 2013.

TAWFIK, Vivianne L.; WHITE, Robin E.; GIFFARD, Rona. **Glial Cells, Inflammation and Heat Shock Proteins in Cerebral Ischemia**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

VALLILO, M. I. et al., *Lecythis Pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1999.

VELLOSA, José CR. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

VENKATACHALAM, Mahesh; SATHE, Shridhar K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

WEINDRUCH, Richard et al., Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 918S-923S, 2001.

WELLEN, Kathryn E.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111, 2005.

WEYER, Christian et al., Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, 2001.

WIDMER, R. Jay et al., The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 3, p. 229-238, 2015.

XIAO, Weihua. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 1, n. 6, p. 425-35, 2004.

YAMAMOTO, Yukihiro et al., Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. **Clinical Science**, v. 103, n. 2, p. 137-142, 2002.

YAMAUCHI, Toshimasa et al., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288-1295, 2002.

ZHANG, Nan; LAWRENCE, Daniel A. Tissue factor and obesity, a two-way street. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1343-1344, 2011.

## Capítulo 2

**Artigo original:** Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) modulate the hepatic inflammatory and antioxidant metabolism activity in high-fat diet-induced rats  
aceito para publicação em 18/05/2016

---

academicJournals

OPEN ACCESS JOURNALS  
<http://www.academicjournals.org/AJB>

**African Journal of Biotechnology**

---

### Acceptance Certificate

<i>Date:</i>	<i>05-Jun-2016</i>
<i>Manuscript Number</i>	<i>AJB/01.04.16/15377</i>
<i>Manuscript Title:</i>	<i>Sapucaia nuts (<i>Lecythis pisonis</i>) modulate the hepatic inflammatory and antioxidant metabolism activity in high-fat diet-induced rats</i>
<i>Corresponding Author:</i>	<i>Martins Marcos Vidal</i>

## **2.0. CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL 1 - Castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis*) modula processo inflamatório e atividade antioxidante em tecido hepático de ratos submetidos à dieta de cafeteria**

### **Resumo:**

A *Lecythis pisonis* Cambess é conhecida popularmente como castanha de sapucaia. Estudos prévios demonstraram que a mesma é rica em ácidos graxos insaturados e minerais antioxidantes. Objetivou-se avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios desta castanha inserida na dieta AIN-93G e na Dieta de Cafeteria em ratos *Wistar*. Os animais foram divididos em quatro grupos e receberam dieta entre 14 e 28 dias. A Expressão gênica dos marcadores Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), Fator Nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) Zinco Superóxido Dismutase (ZnSOD) e Proteína de choque térmico (HSP-72) foi determinada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qPCR). A atividade antioxidante também foi verificada por TBARS pela atividade da enzima superóxido dismutase. A expressão gênica dos marcadores inflamatórios NF $\kappa$ B (p65) e TNF- $\alpha$  foi menor para os grupos de ratos que consumiram as dietas enriquecidas com sapucaia com diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A proteína de choque térmico HSP-72 e a enzima ZnSOD apresentaram aumento da expressão gênica com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ambos os grupos que consumiram sapucaia em suas dietas. Os resultados apontaram que a sapucaia atuou como um alimento fonte de substâncias antioxidantes e protetores para redução de riscos e efeitos adversos à saúde.

**Palavras chaves:** castanha de sapucaia, inflamação, estresse oxidativo, expressão gênica.

## **Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) modulate the hepatic inflammatory and antioxidant metabolism activity in high-fat diet-induced mice**

### **Abstract:**

The *Lecythis pisonis* Cambess nuts are popularly known as sapucaia nuts. Previous studies have demonstrated that these nuts composition is rich in unsaturated fatty acids and also minerals and antioxidants. The present work aimed to evaluate the antioxidant and the anti-inflammatory effects of two sapucaia nuts enriched diets (the AIN-93G diet and a Cafeteria Diet) in Wistar rats. The animals were divided into four groups and the diets were fed with the effects evaluated after 14 and 28 days. The TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B (p65) and ZnSOD and HSP-72 gene expressions were determined by the quantitative Polymerase Chain Reaction after Reverse Transcription (qPCR). The antioxidant activity was also verified by TBARS and the superoxide dismutase enzyme activity. Accordingly, the gene expression of the inflammatory markers NF $\kappa$ B (p65) and TNF- $\alpha$  was lower in rats fed on diets supplemented with "sapucaia", and they presented significant difference in the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The heat-shock HSP-72 protein and the ZnSOD enzyme raised the gene expression and showed significant statistical difference ( $p < 0.05$ ) in both groups fed on Sapucaia nut-based diet. Thus, the nutritional properties of the Sapucaia nuts perform important protective activities because they modulated the anti-oxidant activity and the brain tissue inflammatory process in the assessed animals. According to the results found in this work the sapucaia nut becomes an important and protective dietary component against tissue oxidant and inflammatory agents.

**Key words:** sapucaia nuts, inflammation, oxidative stress, gene expression

## 2.1. INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de energia aliado ou não ao comportamento sedentário contribui para o aparecimento de desordens metabólicas associadas ao aumento de peso corporal e à resistência sistêmica a insulina determinada pelo estado inflamatório crônico e subclínico (CAROBBIO et al., 2011)

Modelos experimentais em que ratos wistar foram utilizados mostraram que dietas hiperlipídicas induzem a obesidade (BURNEIKO et al., 2006; KRETSCHMER et al., 2005; ESTADELLA et al., 2004), e estas induzem o aumento de lipídios corporais e o estresse oxidativo caracterizado pela inflamação (SCOARIS et al., 2010; PÉREZ-ECHARRI et al., 2009; BELTOWSKI et al., 2009; BRUNETTI et al., 2009; GÓMEZ-RUIZ et al., 2009;). O aumento de gordura no tecido adiposo gera infiltração de macrófagos generalizando uma inflamação crônica neste tecido e ao mesmo tempo engloba outros tecidos corporais (ALEMANY, 2013; ALVES et al., 2012).

As dietas ricas em gordura saturada podem afetar o equilíbrio redox no organismo uma vez que o metabolismo para a oxidação dos lipídios é considerado um forte gerador de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VIAL et al., 2011). Por outro lado, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante bastante eficaz, composto principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione-S-transferase (GST), que funcionam em sincronia para proteger as células contra moléculas oxidantes (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem proteínas altamente conservadas, denominadas proteínas de choque térmico (HSP). Tais proteínas têm sua expressão gênica alterada por diferentes estímulos que resultam no acúmulo de proteínas desnaturadas no meio intracelular (CASTRO et al., 2014). O aumento da expressão gênica das proteínas da família HSP-70 gera um efeito anti-inflamatório, pois essas proteínas atuam no ponto de regulação do Fator de Transcrição Kappa Beta (NFκB) e como consequência há uma inibição da expressão de marcadores inflamatórios como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α), a Interleucina 1 Beta (IL 1β) entre outros (DE LA FUENTE et al., 2015; KIM et al., 2015; TAWFIK et al., 2012).

Tem-se verificado na literatura que o consumo de castanhas pode trazer importantes efeitos benéficos a saúde humana devido aos seus componentes nutricionais (SABATÉ; ANG, 2009; DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015). As castanhas e nozes são ricas em ácidos graxos insaturados, aminoácidos sulfurados, minerais como selênio, magnésio, manganês, zinco, ferro, cobre além de conter concentrações satisfatórias de vitamina C e E, que em conjunto, podem modificar processos específicos relacionados a regulação da diferenciação celular, proteção do DNA e na regulação das respostas inflamatórias e ou ligadas ao estresse oxidativo (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015; CASSIDY et al., 2014; ROS, 2010; SABATÉ; ROS 2010; CASAS-AGUSTENCH et al., 2009; RAMOS, 2008; GONZÁLEZ; SALAS-SALVADÓ, 2006).

O vasto bioma brasileiro é pouco explorado no que tange a castanhas. Apenas as castanhas de caju e do Pará ou Brasil são disponíveis comercialmente. A castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), é uma espécie pouco explorada para consumo humano, entretanto, é considerada por alguns consumidores a melhor castanha da Amazônia (VALLILO et al, 1999).

Estudo prévio realizado com a castanha de sapucaia em nosso laboratório revelou que o seu uso na dieta poderá contribuir para efeitos benéficos à saúde. Os principais resultados publicados mostraram que a sapucaia é fonte expressiva de ácidos graxos insaturados: oleico, linoleico e linolencio e minerais como manganês, magnésio e zinco que, em conjunto, podem configurar como potenciais agentes protetores em diferentes desordens metabólicas (DE CARVALHO et al, 2012). Tais nutrientes podem contribuir nas vias inibidoras do NFkB e TNF- $\alpha$  minimizando agravos relacionados ao processo inflamatório.

Diante do exposto, o trabalho objetivou verificar a capacidade da castanha de sapucaia de reduzir a produção de agentes oxidantes bem como modular a expressão gênica de moléculas pró e anti-inflamatórias no tecido hepático de ratos wistar no tecido hepático de ratos alimentados com dieta padrão e de cafeteria acrescidas de sapucaia.

## 2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1. MATERIAL VEGETAL

As castanhas de sapucaia utilizadas no estudo foram coletadas em cinco árvores de ocorrência natural no campus da Universidade Federal de Viçosa, localizada (20°76'S e -42°86'W) na região da Zona da Mata Mineira, porção sudeste do estado. De cada árvore foram coletados cinco frutos, e de cada fruto foram extraídas dez castanhas. O estudo que contempla as informações de composição química dessa castanha foi realizado por De Carvalho et al (2012).

### 2.2.2. ANIMAIS E DIETAS

O experimento foi conduzido de acordo com as normas vigentes estabelecidas pela Lei 11.794 e as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI e o trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) (protocolo 77/2014). (Anexo 1)

Foram utilizados 48 ratos albinos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar. Os animais recém desmamados foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Viçosa. Foram pesados e randomicamente, distribuídos em quatro grupos experimentais de seis animais e acondicionados em gaiolas individuais, mantidas em ambiente controlado, com temperatura entre 22 – 25°C, ciclos claro-escuro de 12 horas por dia e receberam dieta e água *ad libitum* por todo o período do estudo havendo eutanásia no 14º e no 28º dia de acordo com o grupo que o animal foi inserido.

Baseando-se em um consumo humano habitual de três castanhas por dia, foram realizados cálculos para simular este padrão de ingestão nos ratos, a partir de informações nutricionais da castanha de sapucaia obtidas no estudo de De Carvalho et al. (2012). Para tais cálculos, foi tomado como referência um indivíduo, do sexo masculino, 70 kg de peso corporal, recebendo 2000 kcal por dia. Baseando-se nas informações da composição química da sapucaia três castanhas equivalem a 93,08 kcal que corresponde a 4,65% das 2000 kcal

diárias. Portanto, o consumo de 15 g de castanha de sapucaia por dia, representa 4,65% do valor energético total de uma dieta.

Quatro diferentes tipos de dietas foram oferecidas aos animais por um período de até 28 dias como se segue: dieta normal (AIN-93G) (REEVES et al 1993); dieta normal acrescida de castanha de sapucaia (AIN-93G+SAP), com 29,4 g de castanha por 1000 g de dieta (4,65% do valor calórico total da dieta), mantendo-se a mesma densidade calórica de AIN-93G (3,95 kcal/g) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Composição da dieta padrão e da dieta padrão acrescida de sapucaia (g/1000g de dieta).

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta AIN93G (g)</b>	<b>Dieta AIN93G+sapucaia</b>
Caseína (81,50%)	200	192,2
Amido dextrinizado	132	123
Sacarose	100	100
Óleo de soja	70	54
Celulose microcristalina	50	50
Mistura mineral	35	35
Mistura de vitaminas	10	10
L-Cistina	3	3
Colina	2,5	2,5
Castanha de sapucaia	-	29,4
Amido de milho	q.s.p. 1000	q.s.p. 1000
<b>Densidade calórica</b>	<b>3,95 kcal/g</b>	<b>3,96 kcal/g</b>

Dieta de cafeteria (DC) e dieta de cafeteria com adição de castanha de sapucaia (DC+SAP), com 52,2g de castanha por 1000 g de dieta (4,65% do valor calórico total da dieta), mantendo-se a mesma densidade calórica de DC (6,92 kcal/g) (Tabela 3). As dietas foram preparadas semanalmente e mantidas em ambiente refrigerado a 4°C prevenindo possível oxidação. Ao final de cada tempo do experimento, após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados sob anestesia com quetamina (25 mg/Kg IM) e xilazina (2 mg/Kg IM). Neste momento, o tecido hepático foi coletado, pesado e em seguida congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (- 80°C).

**Tabela 3:** Composição da Dieta de Cafeteria e da Dieta de Cafeteria acrescida de sapucaia (g/1000g de dieta).

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta Cafeteria (g)</b>	<b>Dieta Cafeteria+sapucaia (g)</b>
Patê de presunto	222,22	215,7
Batata palha	111,11	104,61
Bacon	111,11	104,61
Mortadela	111,11	104,61
Biscoito doce maisena	111,11	104,61
Achocolatado em pó	111,11	104,61
Leite integral em pó	111,11	104,61
Ração comercial	111,11	104,61
Castanha de sapucaia	-	52,2
<b>Densidade calórica</b>	<b>6,94 kcal/g</b>	<b>6,92 kcal/g</b>

### 2.2.3. EXPRESSÃO GÊNICA

A extração total de mRNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA) em 100 mg de tecido de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza foram avaliadas em espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Scientific, DE, EUA) sendo a integridade dos mRNA avaliada por eletroforese em gel de agarose. O mRNA recuperado foi tratado com RNase-free Dnase (Promega). Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi utilizado para determinar a expressão dos mRNA dos marcadores TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, ZnSOD, HSP-72 e o gene de referência utilizado foi o GAPDH.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando o reagente Sybr Green 2X Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). O volume final de cada reação foi de 10  $\mu$ L, sendo 2  $\mu$ L do cDNA; 0,8  $\mu$ L da mistura dos oligonucleotídeos a 2,5  $\mu$ M (senso e antisenso), 5,0  $\mu$ L do reagente Sybr Green 2X Master Mix e 2,2  $\mu$ L de água ultrapura para cada gene. O protocolo da reação de qPCR utilizado foi: 15 min a 95° C, em seguida 40 ciclos de 95°C (15s), 60°C (30s) e 72°C (30s), seguido pela análise da curva de *melting*. As amostras foram analisadas em quatro repetições biológicas e duas repetições técnicas, quantificadas em corridas independentes.

Os controles negativos (NTC) foram feitos em duas repetições técnicas substituindo-se as amostras de cDNA pelo mesmo volume de água na reação. Foi utilizado o equipamento “AB Step One Real Time PCR System” (Applied Biosystems) para execução do experimento. A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os pares de oligonucleotídeos (senso e antisenso) utilizados para amplificação dos genes de interesse estão descritos na Tabela 4. Os oligonucleotídeos foram desenhados baseados nas sequências de genes dos *Ratus norvegicus* da linhagem Wistar presentes no GenBank utilizando o programa Primer 3 plus. O experimento seguiu as diretrizes do *MIQE* estabelecidas para estudos que utilizam a técnica para qPCR em tempo real (BUSTIN et al., 2009).

**Tabela 4:** Sequência de oligonucleotídeos (Fw e Rv) utilizados no q-PCR

Genes	Iniciadores 1 (senso)	Iniciadores 2 (antisenso)
NFκB (p65)	5'-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA-3'	5'-TCGCACTTGTAACGGAAACG-3'
TNF-α	5'-GCCGATTTGCCATTTTCATACC-3'	5'-GGACTCCGTGATGTCTAAGTAG-3'
HSP-72	5'-AGGCCAACAAGATCACCATC-3'	5'-TAGGACTCGAGCGCATTCTT-3'
ZnSOD	5'-GAGCAGAAGGCAAGCGGTGAA-3'	5'-CCACATTGCCAGGTCTC-3'
GAPDH	5-GGTTGTCTCCTGTCACTTC-3	5-CTGTTGCTGTAGCCATATTC -3'

#### 2.2.4. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE HEPATICOS

Uma amostra de 200 mg de cada fígado foi removida e em seguida foi macerada e homogeneizada sob refrigeração em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 na proporção de 1 mL de tampão por 100 mg de tecido, e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar o conteúdo total de proteínas, a atividade antioxidante enzimática da superóxido dismutase e o da peroxidação lipídica pelas concentrações de malondialdeído.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. No meio de reação

foram utilizados 30 µL de homogeneizado do tecido hepático, 15µL de pirogalol 24 mmol/L e 15 µL de catalase preparada com 2,4 mg em 2mL de água destilada. Completou-se para 300 µL com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1 mM de EDTA. Um padrão (100% de oxidação do pirogalol) foi feito contendo 15 µL de catalase, 15 µL de pirogalol 24 mmol/L e 270 µL de tampão. No branco continham 15 µL de catalase e 285 µL de tampão. Inicialmente foi feita a leitura de absorvância a 420 nm. A reação foi, então, incubada a 37°C durante 5 minutos e novamente foi feita a leitura a 420 nm. As absorvâncias obtidas antes e depois da incubação por 5 minutos foram subtraídas a fim de minimizar a presença de interferentes. Os resultados foram expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985). Os cálculos foram realizados em relação ao valor da absorvância do padrão, considerando que este possuía zero unidade de SOD. A quantificação de proteínas foi realizada segundo Bradford (1976), utilizando uma curva padrão construída com albumina sérica bovina.

A análise de peroxidação lipídica foi determinada pela formação de malondialdeído (MDA), produto secundário da oxidação dos ácidos graxos por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944).

A peroxidação lipídica foi mensurada por meio de uma reação contendo 400 µL de homogenato de fígado, 1 mL de ácido tricloroacético 20% e 400 µL de ácido tiobarbitúrico 1,6%, sendo incubado a 95°C por 1 hora, adicionados 1,6 mL de n-butanol, e centrifugado a 3000 R.P.M / 10 min. A leitura foi realizada em 510, 532, e 560 nm. Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação, proposta por Pyles (1993) para minimizar a interferência dos pigmentos heme e da hemoglobina na dosagem de MDA:

$$\text{MDA}_{532} = 1,22[(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})]$$

A concentração de malondialdeído foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar  $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BUEGE, AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína.

## 2.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminov, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foram realizadas análises de variância ANOVA e teste de *Tukey* (Sigma Plot 11.0). O nível de significância adotado foi de 95% com valor de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão das observações. Considerando a diferença de densidade calórica entre as dietas administradas foi realizado apenas comparações entre os grupos AIN-93G e AIN-93G+SAP e entre os grupos DC e DC+SAP.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. GANHO DE PESO, CONSUMO ALIMENTAR E ÍNDICE HEPATO SOMÁTICO

A avaliação do ganho de peso dos animais demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa de ganho de peso entre os animais submetidos à DC e DC+SAP. O consumo diário de dieta por animal também não variou significativamente durante os períodos de tratamento com exceção do maior consumo de DC no 14º dia de tratamento e o menor consumo de AIN-93G no 28º dia do experimento. Os valores estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Médias do ganho de peso corporal, do consumo diário das dietas administradas nos animais e Índice Hepatosomático nos estágios inicial e final dos tratamentos.

Grupos e Tratamento	Ganho de peso (g)	Consumo diário por animal (g)	Índice Hepatosomático %
14 dias			
AIN-93G	95,10±19,89 <sup>a</sup>	26,60±7,02 <sup>a</sup>	4,9±0,44 <sup>a</sup>
AIN-93G+SAP	96,85±16,46 <sup>a</sup>	29,54±4,36 <sup>a</sup>	4,7±0,51 <sup>a</sup>
DC	97,82±14,46 <sup>a</sup>	32,73±6,05 <sup>a</sup>	4,7±0,62 <sup>a</sup>
DC+SAP	94,32±11,86 <sup>a</sup>	25,40±5,12 <sup>b</sup>	4,6±0,71 <sup>a</sup>
28 dias			
AIN-93G	152,27±12,49 <sup>a</sup>	26,56± 6,24 <sup>b</sup>	4,8±0,63 <sup>a</sup>
AIN-93G+SAP	160,89±8,14 <sup>a</sup>	30,21± 7,23 <sup>a</sup>	4,6±0,48 <sup>a</sup>
DC	186,67±26,88 <sup>a</sup>	32,62±9,39 <sup>a</sup>	4,6±0,52 <sup>a</sup>
DC+SAP	187,38±11,54 <sup>a</sup>	32,21±5,06 <sup>a</sup>	4,7±0,73 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ). AIN-93G, dieta AIN-93G; AIN-93G+SAP, AIN-93G+sapucaia; DC, Dieta de Cafeteria; DC+SAP, Dieta de Cafeteria+sapucaia, Índice hepatossomático (peso relativo do fígado = peso do fígado/peso corporal x 100).

### 2.3.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIXIODANTE

A peroxidação lipídica (MDA) e a atividade enzimática antioxidante expressa em SOD (Tabela 6) foram mensuradas para avaliar o impacto da DC em provocar estresse oxidativo no tecido hepático dos ratos, bem como avaliar o efeito protetor da inserção da castanha nas dietas empregadas. Todos os grupos em que houve enriquecimento da dieta com a castanha de sapucaia apresentaram concentrações em nmol MDA/mg de PTN inferiores aos demais, independente da dieta utilizada e do tempo de tratamento avaliado.

A avaliação do MDA mostrou que para AIN-93G não houve variação significativa das concentrações de nmol MDA/mg de PTN hepáticos. Para AIN-93G+SAP e DC foi observado aumento significativo do MDA durante os dias avaliados e os animais submetidos à DC+SAP aumentou com 28 dias as concentrações iniciais de nmol MDA/mg de PTN. A atividade enzimática antioxidante expressa em unidades de SOD foi maior para todos os grupos que tiveram a castanha de sapucaia acrescida em suas dietas durante todo o tempo de tratamento avaliado.

**Tabela 6:** Médias das concentrações hepáticas de malondialdeído (MDA) (nmol MDA/mg de PTN) e de Superóxido-dismutase (SOD) (U SOD/mg de PTN) em 14 e 28 dias de tratamento para cada dieta (AIN-93G, AIN-93G+SAP, DC, DC+SAP) administrada aos animais

Grupos	MDA		SOD	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias
AIN-93G	1,10 ± 0,04 <sup>aA</sup>	1,16 ± 0,02 <sup>aA</sup>	8,10 ± 0,44 <sup>bA</sup>	8,45 ± 0,72 <sup>bA</sup>
AIN-93G+SAP	0,62 ± 0,05 <sup>bB</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>cB</sup>	11,78 ± 1,14 <sup>aB</sup>	13,65 ± 0,50 <sup>aB</sup>
DC	1,39 ± 0,01 <sup>aA</sup>	1,72 ± 0,05 <sup>bA</sup>	6,30 ± 0,48 <sup>aA</sup>	10,35 ± 0,47 <sup>bA</sup>
DC+SAP	0,65 ± 0,05 <sup>bB</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>aB</sup>	14,28 ± 0,81 <sup>bB</sup>	14,86 ± 0,62 <sup>bB</sup>

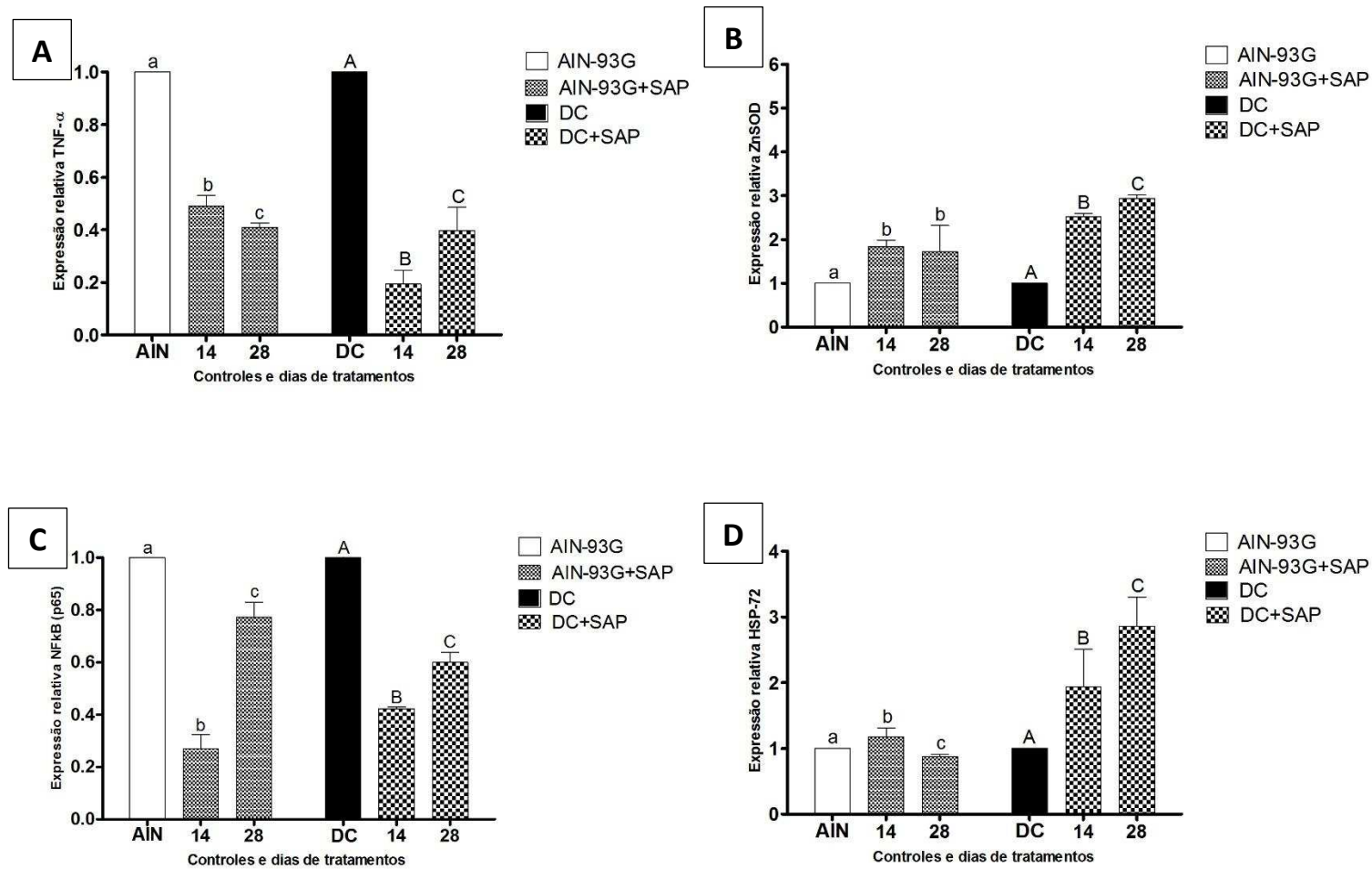
Médias (n=6) seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna comparação apenas com dietas de mesma densidade calórica, apresentam diferença estatisticamente significativa segundo ANOVA (p<0,05). AIN-93G (Dieta Padrão), AIN-93G+SAP (Dieta Padrão+sapucaia), DC (Dieta de Cafeteria), DC+SAP (Dieta de Cafeteria+sapucaia), PTN (Proteínas).

### 2.3.3. EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE HEPÁTICA

Para compreender a interferência provocada pela inserção da castanha de sapucaia nas dietas foi avaliada a expressão gênica relativa dos mRNA em comparação aos grupos controle dos marcadores envolvidos no processo inflamatório e na atividade antioxidante hepáticos por meio da técnica de RTq-PCR em tempo real (Figura 4). A expressão gênica do TNF- $\alpha$  foi menor para os ratos que tiveram a castanha de sapucaia acrescida em suas dietas em comparação com os controles. Tanto para AIN-93G+SAP quanto para DC+SAP não houve diferença significativa na expressão gênica do TNF- $\alpha$  nos distintos tempos de tratamento.

A expressão gênica de NFkB (p65), assim como para TNF- $\alpha$ , também foi menor para os grupos de ratos que consumiram as dietas enriquecidas com sapucaia comparado ao controle. ZnSOD, por sua vez, apresentou-se relativamente superior quanto a expressão gênica para ambos os grupos em comparação com os controles. Os animais submetidos à dieta AIN-93G+SAP e DC+SAP tiveram expressão gênica aumentadas desta enzima em todo o tempo do experimento.

Também houve aumento da expressão gênica da HSP-72 hepática para ambos os tratamentos. Contudo, a DC+SAP mostrou valores mais relevantes.



**Figura 4:** Médias da expressão gênica relativa (amostra calibradora,  $y=1$ ) para 14 e 28 dias, dos mRNA de TNF- $\alpha$  (A), ZnSOD (B), NFκB (p65) (C) e HSP-72 (D) por qPCR d o tecido hepático ratos submetidos às dietas AIN-93G+sapucaia e DC+sapucaia. Médias seguidas de letras distintas (minúsculas para AIN-93G e maiúsculas para DC) apresentam diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

## 2.4. DISCUSSÃO

Dietas hiperlipídicas administradas em ratos podem induzir processos inflamatórios e estresse oxidativo (ESTADELLA et al., 2004; KRETSCHEMER et al., 2005; BURNEIKO et al., 2006; ECHARRI et al., 2009; BELTOWSKI et al., 2009; BRUNETTI et al., 2009; GÓMEZ-RUIZ et al., 2009; SCOARIS et al., 2010). Os ratos que tiveram ingestão de dieta hiperlipídica não apresentaram um Índice Hepato Somático IHS (peso relativo do fígado) maior que os grupos com dieta normal ou acrescida de sapucaia, provavelmente em virtude do curto período de tempo do estudo (14 e 28 dias).

Embora a dieta com castanha de sapucaia não tenha demonstrado efeito no ganho de peso dos animais nem no IHS, nossos achados mostraram que a sapucaia foi capaz de prevenir agravos relacionados ao desequilíbrio redox provocado pela dieta hiperlipídica, uma vez que a sapucaia interferiu tanto nas concentrações de MDA quanto na atividade da enzima superóxido dismutase. Nos animais que consumiram DC, conforme o esperado, constatamos aumento dos agentes oxidantes, porém, nos animais com DC+SAP tal efeito foi minimizado pelo aumento significativo da atividade da SOD minimizando os efeitos da peroxidação lipídica no fígado dos animais (Tabela 6).

No estudo realizado por De Carvalho et al (2012), foi demonstrado que em relação aos valores de referência estabelecidos pela FAO (2001), cada 100 gramas de castanhas de sapucaia, suprem as necessidades diárias de manganês e magnésio e de 50% das necessidades nutricionais de ferro. Em outros estudos realizados com a sapucaia, quantidades elevadas de magnésio, ferro, selênio e fósforo também foram encontradas (DE SOUZA et al., 2008; VALLILO et al 1999), além de boa digestibilidade proteica (DENADAI et al., 2007). Tais informações referentes aos compostos nutricionais das castanhas e em especial *L. pisonis* reforçam a hipótese de que houveram importantes alterações no metabolismo dos animais que consumiram castanha de sapucaia.

Nos organismos, o sistema enzimático configura-se como a primeira linha de defesa antioxidante (BORGES; LESSA, 2015). Associado ao estímulo do aporte enzimático pelos seus componentes minerais a castanhas apresentam ainda componentes nutricionais que podem atuar como

antioxidantes exógenos, tais como tocoferol, ascorbato, carotenoides, e compostos fenólicos (STIPANUK, 2013). Esse conjunto de nutrientes podem exercer efeitos diversos no organismo gerando impactos positivos em condições adversas ao metabolismo como, por exemplo, a obesidade e patologias associadas.

O fígado é um órgão de múltiplas funções e está diretamente envolvido quando ocorre processo oxidativo (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; STADLER et al., 2004). Alterações no equilíbrio redox hepático podem interferir na translocação sensíveis ao estresse oxidativo para o núcleo da célula através da ativação do IKK. (CASSIDY et al., 2014; SADI et al., 2008; MARITIM et al., 2003). O estresse oxidativo provocado pela DC tende a aumentar a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e NFkB (p65) como resposta ao processo desencadeado pelo desequilíbrio relacionado ao aumento de ácidos graxos saturados uma vez estes podem ser ligantes dos receptores TLR4 que aumentam a expressão gênica de TNF- $\alpha$ . Além disso, a família de proteína de choque térmico HSP-70 também é afetada por esse estresse provocado pelo desequilíbrio dietético (LIGHTFOOT et al., 2015; GABAI; JANGALE et al., 2013; BURG et al., 2007; YAGLOM et al., 2003).

Houve uma diferença significativa da expressão gênica de HSP-72 entre os ratos tratados tanto com DC e DC+SAP quanto nos que receberam AIN-93G e AIN-93G+SAP. Os ratos que continham a castanha de sapucaia acrescida em suas dietas apresentaram expressão gênica de HSP-72 significativamente maiores do que os ratos alimentados apenas com as dietas controles (DC e AIN-93G), indicando que a castanha de sapucaia pode ter desempenhado um importante papel na modulação desse gene. A HSP-72 faz parte da família das proteínas HSP-70, que atuam na inibição da ativação do NFkB (p65), reduzindo a produção de citocinas pró inflamatórias (TANAKA et al., 2014; DOKLADNY et al., 2010; SHI et al. 2006; SINGLETON; WISCHMEYER, 2006). Portanto, o aumento da expressão gênica de HSP-72 observado nos grupos que tiveram castanha acrescida na dieta (DC+SAP e AIN-93G+SAP), podem ter influenciado na redução da ativação do NFkB (p65).

A menor expressão gênica do NFkB (p65) interferiu possivelmente na expressão do TNF- $\alpha$ , visto que o fator de necrose tumoral alfa é um agente pró inflamatório cuja expressão é acionada pelo NFkB (p65) (TANAKA et al., 2014).

A diminuição da expressão gênica do TNF- $\alpha$  também foi observada para os animais que receberam DC+SAP em relação ao seu controle (DC).

Acrescentam-se a todos esses fatores o aumento da expressão gênica de ZnSOD, uma enzima diretamente ligada ao aumento da atividade antioxidante, observado em todos os grupos que receberam castanha na dieta. Isso permite inferir que a presença da castanha na dieta teve um papel relevante uma vez que a expressão gênica dessa enzima foi maior em DC+SAP em comparação a DC.

A correlação entre o consumo de gordura saturada e o estresse oxidativo não é simples uma vez que existem vários mecanismos bioquímicos envolvidos que podem aumentar o consumo de oxigênio e gerar outras moléculas oxidantes (DANDEKAR et al., 2015; HYBERTSON et al., 2011; SEIFERT et al., 2010; SOHAL et al., 2002). Entretanto, baseado em nossos resultados, foi observado aumento da capacidade antioxidante e anti-inflamatória, devido as menores expressões gênicas de TNF- $\alpha$  e NF $\kappa$ B reafirmando que, antioxidantes dietéticos são particularmente importantes na proteção contra doenças crônicas. Em suma, a castanha de sapucaia atuou como um potencial alimento fonte de agentes antioxidantes e protetores à saúde dos animais testados.

## **2.5. CONCLUSÃO**

A castanha de sapucaia inserida nas dietas foi capaz de estimular a atividade enzimática da superóxido dismutase e reduzir a peroxidação lipídica no tecido hepático dos ratos com dieta hiperlipídica, independentemente do tempo de dieta empregado conforme o estudo.

O importante resultado, foi ratificado pela modulação da expressão gênica diretamente envolvida neste processo metabólico da enzima ZnSOD e de outro gene bem específico para a reversão de condições de estresse metabólico HSP-72, tais genes foram significativamente aumentados nos ratos que receberam sapucaia nas dietas.

Para melhorar a compressão dos resultados, verificamos que a castanha influenciou também a modulação gênica dos marcadores relacionados ao processo inflamatório TNF- $\alpha$  e NF $\kappa$ B. Uma vez que esses processos

bioquímicos são interligados, e devido à constituição química da castanha, pelos seus componentes minerais, a redução desses marcadores possivelmente esteve atrelada ao aumento da atividade antioxidante apresentada nos resultados.

Mais estudos sobre essa castanha precisam ser realizados com o intuito de avaliar impactos do uso em longo prazo como alimento humano, porém, com os resultados até o momento, a sapucaia configura-se como um alimento rico em nutrientes com potenciais efeitos benéficos a saúde.

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do estudo (APQ 00832 12).

## **2.6. REFERÊNCIAS**

ALEMANY, Maria. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2013.

ALVES, Natalia et al., Studies on mechanistic role of natural bioactive compounds in the management of obesity an overview. **Tonutraj**, v. 5 n.1, p.193-206, 2012.

BELTOWSKI, Jerzy et al. Resistance to acute NO-mimetic and EDHF-mimetic effects of leptin in the metabolic syndrome. **Life sciences**, v. 85, n. 15, p. 557-567, 2009.

BORGES, Juliana Pereira; LESSA, Marcos Adriano. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. AHEAD, p. 0-0, 2015.

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

BRUNETTI, Luigi et al., Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1323-1327, 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

BURG, Maurice B.; FERRARIS, Joan D.; DMITRIEVA, Natalia I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1441-1474, 2007.

BURNEIKO, Regina CM et al., Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAROBIO, Stefania; RODRIGUEZ-CUENCA, Sergio; VIDAL-PUIG, Antonio. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 520-526, 2011.

CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Nuts, hypertension and endothelial function. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, p. S21-S33, 2011.

CASSIDY, Aedín et al. Intake of dietary flavonoids and risk of epithelial ovarian cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, p. ajcn. 088708, 2014.

CASTRO, Simone Vieira et al., PROTEÍNAS DE CHOQUE TERMICO HSP-70: ESTRUTURA E ATUAÇÃO EM RESPOSTA AO ESTRESSE CELULAR. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2014.

DANDEKAR, Aditya; MENDEZ, Roberto; ZHANG, Kezhong. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease. **Stress Responses: Methods and Protocols**, p. 205-214, 2015.

DE CARVALHO, Izabela Maria Montezano et al., Chemical characterization of sapucaia nuts (*Lecythis pisonis* Cambess.) from zona da mata mineira region. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.

DE LA FUENTE, Verónica et al., NF- $\kappa$ B Transcription Factor Role in Consolidation and Reconsolidation of Persistent Memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 50, 2015.

DENADAI, Sandra Maria Silveira et al., In vitro digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DOKLADNY, Karol et al. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP-70 in rats: possible role of NF- $\kappa$ B. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 2, p. 153-163, 2010.

DOMÍNGUEZ-AVILA, Jesús A. et al. The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. **Food Chemistry**, v. 168, p. 529-537, 2015.

ESTADELLA, Debora et al., Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

GABAI, Vladimir L.; SHERMAN, Michael Y. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1743-1748, 2002.

GÓMEZ-RUIZ, Ana, et al., "Time-dependent regulation of muscle caveolin activation and insulin signalling in response to high-fat diet." **FEBS letters** 583.19 (2009): 3259-3264.

GONZÁLEZ, Carlos A.; SALAS-SALVADÓ, Jordi. The potential of nuts in the prevention of cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. S2, p. S87-S94, 2006.

HYBERTSON, Brooks M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 4, p. 234-246, 2011.

JANGALE, Nivedita M. et al. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 187-195, 2013.

JOHN, Jenny A.; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

KIM, J. Y.; YENARI, M. A.; LEE, J. E. Regulation of inflammatory transcription factors by heat shock protein 70 in primary cultured astrocytes exposed to oxygen–glucose deprivation. **Neuroscience**, v. 286, p. 272-280, 2015.

KOHN, HENRY IRVING; LIVERSEDGE, MARGARET. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KRETSCHMER, Beate D. et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, v. 76, n. 14, p. 1553-1573, 2005.

LIGHTFOOT, Adam P. et al. O16. Heat Shock Protein 70 Protects Against ER Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction; A Potential Therapeutic Target to Reduce Muscle Weakness in IIM? **Rheumatology**, v. 54, n. suppl 1, p. i31-i32, 2015.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, 3rd JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 2438.26, 2003.

MARKLUND, Stefan L. Pyrogallol autoxidation. **Handbook of methods for oxygen radical research**. CRC Press, Boca Raton, p. 243-247, 1985.

PÉREZ-ECHARRI, Nerea et al., Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 705-714, 2009.

PYLES, Lee A.; STEJSKAL, Elizabeth J.; EINZIG, Stanley. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 4, p. 407-419, 1993.

REEVES, Philip G. et al. 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. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Heriberto et al. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, 2013.

ROS, Emilio. Health benefits of nut consumption. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 652-682, 2010.

SABATÉ, Joan; ANG, Yen. Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1643S-1648S, 2009.

SABATÉ, Joan; ODA, Keiji; ROS, Emilio. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 9, p. 821-827, 2010.

SADI, Gökhan; YILMAZ, Ökkes; GÜRAYS, Tülin. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu–ZnSOD and catalase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 309, n. 1-2, p. 109-116, 2008.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p. 141-147.

SCOARIS, Célia Regina et al., Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 312-320, 2010.

SEIFERT, Erin L. et al. Electron transport chain-dependent and-independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 8, p. 5748-5758, 2010.

SHI, Yongzhong et al. The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP-70 involves inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway but not the MAPK pathways. **Shock**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2006.

SINGLETON, Kristen D.; WISCHMEYER, Paul E. Effects of HSP-70. 1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 5, p. L956-L961, 2006.

SOHAL, Rajindar S.; MOCKETT, Robin J.; ORR, William C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 575-586, 2002.

STADLER, K. et al. [Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats]. **Orvosi Hetilap**, v. 145, n. 21, p. 1135-1140, 2004.

TANAKA, Takashi et al. HSP-70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling. **Science Signaling**, v. 7, n. 356, p. ra119-ra119, 2014.

VIAL, Guillaume et al. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 348-356, 2011.

VALLILO, M. I. et al., *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1999.

YAGLOM, Julia et al. Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and HSP-72. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 11, p. 3813-3824, 2003.

ZHANG, Nan; LAWRENCE, Daniel A. Tissue factor and obesity, a two-way street. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1343-1344, 2011.

## Capítulo 3

**Artigo original:** “Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) on rats fed with high-fat diet” aceito para publicação em 05/05/2016



Dear Vidal, MD:

The Editorial Committee of the *Nutricion Hospitalaria* journal has decided that your article “**Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) on rats fed with high-fat diet**”, reference 10712, has been accepted for publication in our journal.

Yours faithfully,

Date 05-May-2016  
Rosa Palacios  
Departamento Editorial  
Nutrición Hospitalaria  
917451729  
e-mail: [nutricion@grupoaran.com](mailto:nutricion@grupoaran.com)

### 3.0 CAPÍTULO 3 - ARTIGO ORIGINAL 2 - Efeito neuroprotetor da Castanha de Sapucaia (*Lecythis pisonis*) em ratos submetidos à dieta de cafeteria

#### Resumo:

A *Lecythis pisonis* Cambess é conhecida popularmente no Brasil como castanha de sapucaia. Estudos de composição química revelaram que esta castanha é uma excelente fonte de minerais antioxidantes e de lipídios essenciais. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no tecido cerebral de ratos Wistar. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=6) totalizando 48 ratos. Os tratamentos foram conduzidos por um período de 14 e 28 dias com dietas padrão AIN-93G e de cafeteria acrescidas de castanha de sapucaia. A Expressão gênica dos marcadores TNF- $\alpha$ , NFkB, ZnSOD e HSP-72 foi determinada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qPCR). A atividade antioxidante foi verificada pela determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e por mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase. A expressão gênica dos marcadores inflamatórios NFkB (p65) e TNF- $\alpha$  foi menor para os grupos de ratos que consumiram as dietas enriquecidas com sapucaia com diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A proteína de choque térmico HSP-72 e a enzima ZnSOD apresentaram aumento da expressão gênica com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ambos os grupos que consumiram sapucaia em suas dietas. As propriedades nutricionais da castanha de sapucaia exerceram importante atividade neuroprotetora por modular a atividade antioxidante e o processo inflamatório nos tecidos cerebrais dos animais avaliados.

**Palavras chaves:** tecido cerebral, estresse oxidativo, inflamação, expressão gênica.

## Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) on rats fed with high-fat diet

### Abstract:

*Lecythis pisonis* Cambess is commonly known as “castanha de sapucaia” in Brazil. Chemical composition studies revealed that this nut is an excellent source of anti-oxidant minerals and of essential lipids. The aim of the present study is to assess the anti-oxidant and anti-inflammatory effect of *Lecythis pisonis* Cambess on the brain tissue of Wistar rats. The animals were divided in four experimental groups (n=6), total of forty-eight rats. Treatments included the standard diet (AIN-93G) and high-fat food, supplemented with *Sapucaia* nut from 14 to 28 days. The gene expression markers TNF- $\alpha$ , NFkB, ZnSOD and HSP-72 were defined through reverse transcriptase polymerase chain reaction (rtPCR). The anti-oxidant effect was assessed through the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and the measurement of the activity performed by superoxide dismutase enzymes. Accordingly, the gene expression of the inflammatory markers NFkB (p65) and TNF- $\alpha$  was lower in rats fed on diets supplemented with “sapucaia”, and they presented significant difference in the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The heat-shock HSP-72 protein and the ZnSOD enzyme raised the gene expression and showed significant statistical difference ( $p < 0.05$ ) in both groups fed on Sapucaia nut-based diet. Thus, the nutritional properties of the Sapucaia nuts perform important neuroprotective activities because they modulated the anti-oxidant activity and the brain tissue inflammatory process in the assessed animals.

**Keywords:** brain tissue, oxidative stress, inflammation, gene expression.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Dietas com teores elevados de gordura saturada podem favorecer o desequilíbrio redox no organismo uma vez que o metabolismo para a oxidação dos lipídios é considerado um forte gerador de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VIAL et al., 2011). O cérebro é particularmente suscetível aos efeitos deletérios das ERO em virtude da sua elevada taxa metabólica e ao mesmo tempo da baixa capacidade de regeneração celular quando comparado com outros órgãos (DAVIES, 2000; REYNOLDS et al., 2007).

As ERO possuem a característica de sinalização intracelular no sistema imunológico, uma vez que as células fagocitárias são ativadas sob condições de estresse oxidativo. O desequilíbrio redox exerce ação direta no Fator de Transcrição Kappa B (NFκB) gerando aumento dos mediadores do processo inflamatório (TRUSHINA; MCMURRAY, 2007).

O acúmulo do dano causado pelo desequilíbrio redox pode gerar doenças crônicas não transmissíveis e disfunção mitocondrial e apoptose (GAO et al., 2014), entretanto, nosso organismo possui sistemas antioxidantes que buscam preservar a integridade celular e neutralizar esses efeitos danosos que funcionam em sincronia para proteger as células contra moléculas oxidantes (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015).

Ainda como sistema de defesa, o organismo em condições de estresse metabólico, promove um aumento da atividade de proteínas da família HSP-70 produzindo um efeito anti-inflamatório pois essas proteínas atuam no ponto de regulação do NFκB e como consequência inibe a expressão de marcadores inflamatórios como TNF-α e IL 1β (KIM et al., 2015).

A literatura tem mostrado importantes resultados relacionados com ingestão de castanhas e efeitos benéficos a saúde humana devido aos seus componentes nutricionais (SABATÉ; ANG, 2009; DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015). As oleaginosas de uma forma geral são ricas em ácidos graxos insaturados, aminoácidos sulfurados, minerais como selênio, magnésio, manganês, zinco, ferro, cobre além de conter concentrações satisfatórias de vitamina C e E, que em conjunto, podem modificar processos específicos relacionados a regulação da diferenciação celular, proteção do DNA e na regulação das respostas inflamatórias e ou ligadas ao estresse oxidativo

(DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015; CASSIDY et al., 2014; CASAS-; ROS, 2010; SABATÉ; ROS 2010; AGUSTENCH et al., 2009).

O bioma brasileiro necessita de maiores investigações científicas em várias espécies. As castanhas brasileiras mais consumidas pela população são a do Brasil ou do Pará e a castanha de caju, ambas são ricas em minerais e lipídios essenciais. A castanha de sapucaia, embora não seja muito conhecida possui uma rica composição nutricional, composta principalmente, por lipídios essenciais e com minerais importantes como zinco, ferro, cobre, manganês, magnésio e selênio.

Diante do exposto, nota-se a importância de explorar alimentos que possam minimizar ou prevenir patologias que englobem as interações entre o estresse oxidativo e mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração. Assim, o presente trabalho avaliou a capacidade de ação antioxidante e anti-inflamatória da castanha de sapucaia no tecido cerebral de ratos.

## **3.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1. MATERIAL VEGETAL**

A coleta das castanhas de sapucaia foi realizada em cinco árvores de ocorrência natural no campus da Universidade Federal de Viçosa, localizada (20°76'S e -42°86'W) na região da Zona da Mata Mineira, porção sudeste do estado. De cada árvore foram coletados cinco frutos, e de cada fruto foram extraídas dez castanhas. O estudo de composição química dessa castanha foi realizado por De Carvalho et al (2013).

### **3.2.2. ANIMAIS E DIETAS**

O trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) (protocolo 77/2014). O experimento foi conduzido de acordo com as normas vigentes estabelecidas pela Lei 11.794 e as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI.

O ensaio bilógico foi realizado com 48 ratos albinos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar. Os animais recém desmamados foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais de seis animais, mantidos em ambiente controlado, com temperatura entre 22 – 25°C, ciclos claro-escuro de 12 horas por dia e receberam ração e água *ad libitum* no período compreendido entre 14 e 28 dias de acordo com o grupo que o animal foi inserido.

Embasado por trabalhos em que uma porção de castanha ao dia possa trazer efeitos benéficos ao organismo, foi estabelecido um padrão de consumo de três castanhas de sapucaia diárias e foram realizados cálculos para simular este padrão de ingestão nos ratos. Tais cálculos foram construídos a partir de informações nutricionais da castanha de sapucaia obtidas no trabalho conduzido pelo nosso grupo de pesquisa (DE CARVALHO et al., 2012). Foi tomado como referência um indivíduo, do sexo masculino, 70 kg de peso corporal, recebendo 2000 kcal por dia. Baseando-se nas informações da composição química da sapucaia, três castanhas equivalem a 93,08 kcal que corresponde a 4,65% das 2000 kcal diárias. Portanto, o consumo de 15 g de castanha de sapucaia por dia, representa 4,65% do valor energético total de uma dieta.

Quatro tratamentos foram conduzidos por um período de 28 dias como se segue: Dieta normal (AIN-93G) (REEVES et al, 1993) com densidade calórica de 3,95 kcal/g; Dieta normal acrescida de castanha de sapucaia (AIN-93G+SAP), com 24 g de castanha por 1000 gramas de dieta (4,65% do valor calórico total da dieta), mantendo-se a mesma densidade calórica de AIN-93G (3,95 kcal/g). Dieta de Cafeteria (DC) constituída por patê de presunto, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, batata palha, leite em pó integral, ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1. com densidade calórica de 6,92 kcal/g; Dieta de Cafeteria com adição de castanha de sapucaia (DC+SAP), com 52,2g de castanha por 1000 gramas de dieta (4,65% do valor calórico total da dieta), mantendo-se a mesma densidade calórica da Dieta de Cafeteria (6,92 kcal/g). Os ratos tiveram acesso *ad libitum* às dietas e à água. As dietas foram preparadas semanalmente e mantidas em ambiente refrigerado a 4 °C prevenindo possível oxidação. Ao final de cada tempo do experimento (14 e 28 dias), após jejum de 12 horas, os animais foram

eutanasiados sob anestesia com quetamina (25 mg/Kg IM) e xilazina (2 mg/Kg IM). Neste momento os tecidos cerebrais foram coletados, transportados em recipiente com nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (- 80°C).

### 3.2.3. EXPRESSÃO GÊNICA

Para realizar a extração total de mRNA utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA) em 100 mg de tecido cerebral macerado previamente em nitrogênio líquido para obter uma homogeneização do mesmo, as recomendações do fabricante foram seguidas. A concentração e pureza foi avaliada por espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Scientific, DE, EUA) e a integridade dos mRNA avaliada por eletroforese em gel de agarose. O mRNA recuperado foi tratado com RNase-free Dnase (Promega). Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi utilizado para determinar a expressão dos mRNA dos marcadores TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B (p65), ZnSOD, HSP-72, e o gene de referência utilizado foi o GAPDH.

A técnica utilizada para quantificação relativa foi por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando o reagente Sybr Green 2X Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). O volume final de cada reação foi de 10  $\mu$ L, sendo 2  $\mu$ L do cDNA; 0,8  $\mu$ L da mistura dos oligonucleotídeos a 2,5  $\mu$ M (senso e antisenso), 5,0  $\mu$ L do reagente Sybr Green 2X Master Mix e 2,2  $\mu$ L de água ultrapura para cada gene. O protocolo da reação de qPCR utilizado foi: 15 min a 95° C, em seguida 40 ciclos de 95°C (15s), 60°C (30s) e 72°C (30s), seguido pela análise da curva de *melting*. As amostras foram analisadas em quatro repetições biológicas e duas repetições técnicas, quantificadas em corridas independentes.

Realizou-se os controles negativos (NTC) em duas repetições técnicas substituindo-se as amostras de cDNA pelo mesmo volume de água na reação. O equipamento “AB Step One Real Time PCR System” (Applied Biosystems) foi utilizado para execução do experimento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse foram: NF $\kappa$ B (p65) (Fw 5'-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA-3') e (Rw 5'-

TCGCACTTGTAACGGAAACG-3'), TNF- $\alpha$  (Fw 5'-GCCGATTTGCCATTTTCATACC-3') e (Rw 5'-GGACTCCGTGATGTCTAAGTAG-3'), HSP-72 (Fw 5'-AGGCCAACAAAGATCACCATC-3') e (Rw 5'-TAGGACTCGAGCGCATTCTT-3'), ZnSOD (Fw 5'-GAGCAGAAGGCAAGCGGTGAA-3') e (Rw 5'-CCACATTGCCAGGTCTC-3'), GAPDH (Fw 5'-GGTTGTCTCCTGTCACTTC-3') e 5' CTGTTGCTGTAGCCATATTC -3'). Os oligonucleotídeos foram desenhados baseados nas sequências de genes dos *Ratus norvegicus* da linhagem Wistar presentes no GenBank utilizando o software *Primer 3 plus*. O experimento seguiu as diretrizes MIQE, estabelecidas para estudos que utilizam a técnica para qPCR em tempo real (BUSTIN et al., 2009).

### 3.2.4. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE CEREBRAL

A análise de peroxidação lipídica foi determinada pela formação de malondialdeído (MDA), produto secundário da oxidação dos ácidos graxos por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Recolheu-se uma amostra de 200 mg de cada cérebro e em seguida a mesma foi macerada e homogeneizada sob refrigeração em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 na proporção de 5 mL de tampão por 500 mg de tecido, e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar o conteúdo total de proteínas pelo método de Bradford (1976), a atividade antioxidante enzimática da superóxido dismutase (SOD) e o nível de peroxidação lipídica.

A análise da atividade da enzima superóxido dismutase foi dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. No meio de reação foram utilizados 30  $\mu$ L de homogeneizado do tecido hepático, 15  $\mu$ L de pirogalol 24 mmol/L e 15  $\mu$ L de catalase preparada com 2,4 mg em 2mL de água destilada. Completou-se para 300  $\mu$ L com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1 mM de EDTA. Um padrão (100% de oxidação do pirogalol) foi feito contendo 15  $\mu$ L de catalase, 15  $\mu$ L de pirogalol 24 mmol/L e 270  $\mu$ L de tampão. No branco continham 15  $\mu$ L de catalase e 285  $\mu$ L de tampão. Inicialmente foi feita a leitura de absorvância a 420 nm. A reação foi, então, incubada a 37°C durante 5 minutos e novamente foi feita a leitura a 420 nm. As

absorvâncias obtidas antes e depois da incubação por 5 minutos foram subtraídas a fim de minimizar a presença de interferentes. Os resultados foram expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985). Os cálculos foram realizados em relação ao valor da absorvância do padrão, considerando que este possuía zero unidade de SOD. A quantificação de proteínas foi realizada segundo Bradford (1976), utilizando uma curva padrão construída com albumina sérica bovina.

Para mensurar a peroxidação lipídica, foi realizada uma reação contendo 400 µL de homogenato de tecido cerebral, 1 mL de ácido tricloroacético 20% e 400 µL de ácido tiobarbitúrico 1,6% foi incubado a 95°C por 60 minutos, sendo adicionados 1,6 mL de n-butanol, e centrifugado a 3000 R.P.M / 10 min. A leitura foi realizada em 510, 532, e 560 nm. Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação, proposta por Pyles (1993) para minimizar a interferência dos pigmentos heme e da hemoglobina na dosagem de MDA:

$$MDA_{532}=1,22[(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})]$$

Para mensurar a concentração de malondialdeído utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar  $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BUEGE, AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína.

### 3.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv e aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foram realizadas análises de variância ANOVA seguida do teste de *Tukey* (Sigma Plot 11.0) para todos os tratamentos. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão das observações.

### 3.4. RESULTADOS

#### 3.4.1. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A peroxidação lipídica (MDA) e a atividade enzimática antioxidante expressa em unidades de SOD foram mensuradas para avaliar o efeito protetor da inserção da castanha nas dietas empregadas (Tabela 7). Todos os grupos em que tiveram acréscimo de castanha de sapucaia apresentaram menores concentrações de nmol MDA/mg de PTN independente da dieta utilizada e do tempo de tratamento avaliado.

O tempo de administração da dieta (14 e 28 dias) influenciou na menor concentração de nmol MDA/mg de PTN cerebrais nos animais que ingeriram sapucaia independentemente da dieta. Os animais que estavam submetidos somente a dieta de cafeteria apresentaram maiores concentrações de MDA.

A atividade enzimática antioxidante expressa em unidades de SOD foi maior e estatisticamente diferente para os animais em dieta de cafeteria acrescida de sapucaia e o tempo de administração da dieta não afetou a atividade da enzima que se manteve estável entre os 14 e 28 dias de experimento.

**Tabela 7:** Médias das concentrações cerebrais de malondialdeído (MDA) (nmol MDA/mg de PTN) e de Superóxido Dismutase (SOD) (U SOD/mg de PTN) em 14 e 28 dias de tratamento para cada dieta (AIN-93G, AIN-93G+SAP, DC, DC+SAP) administrada aos animais

Grupos	MDA		SOD	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias
AIN-93G	0,84 ± 0,02 <sup>aA</sup>	0,89 ± 0,04 <sup>aA</sup>	6,07 ± 0,30 <sup>aA</sup>	8,56 ± 0,33 <sup>bA</sup>
AIN-93G+SAP	0,67 ± 0,02 <sup>aB</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>bB</sup>	9,56 ± 0,57 <sup>aB</sup>	11,91 ± 0,37 <sup>bB</sup>
DC	1,01 ± 0,03 <sup>aA</sup>	1,21 ± 0,02 <sup>bA</sup>	4,14 ± 0,51 <sup>aA</sup>	7,01 ± 0,34 <sup>bA</sup>
DC+SAP	0,67 ± 0,02 <sup>aB</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>bB</sup>	12,17 ± 0,29 <sup>AB</sup>	11,13 ± 0,51 <sup>aB</sup>

Médias (n=6) seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna comparação apenas com dietas de mesma densidade calórica, apresentam diferença estatisticamente significativa segundo ANOVA (p<0,05). AIN-93G (Dieta Padrão), AIN-93G+SAP (Dieta Padrão+sapucaia), DC (Dieta de Cafeteria), DC+SAP (Dieta de Cafeteria+sapucaia), PTN (Proteínas).

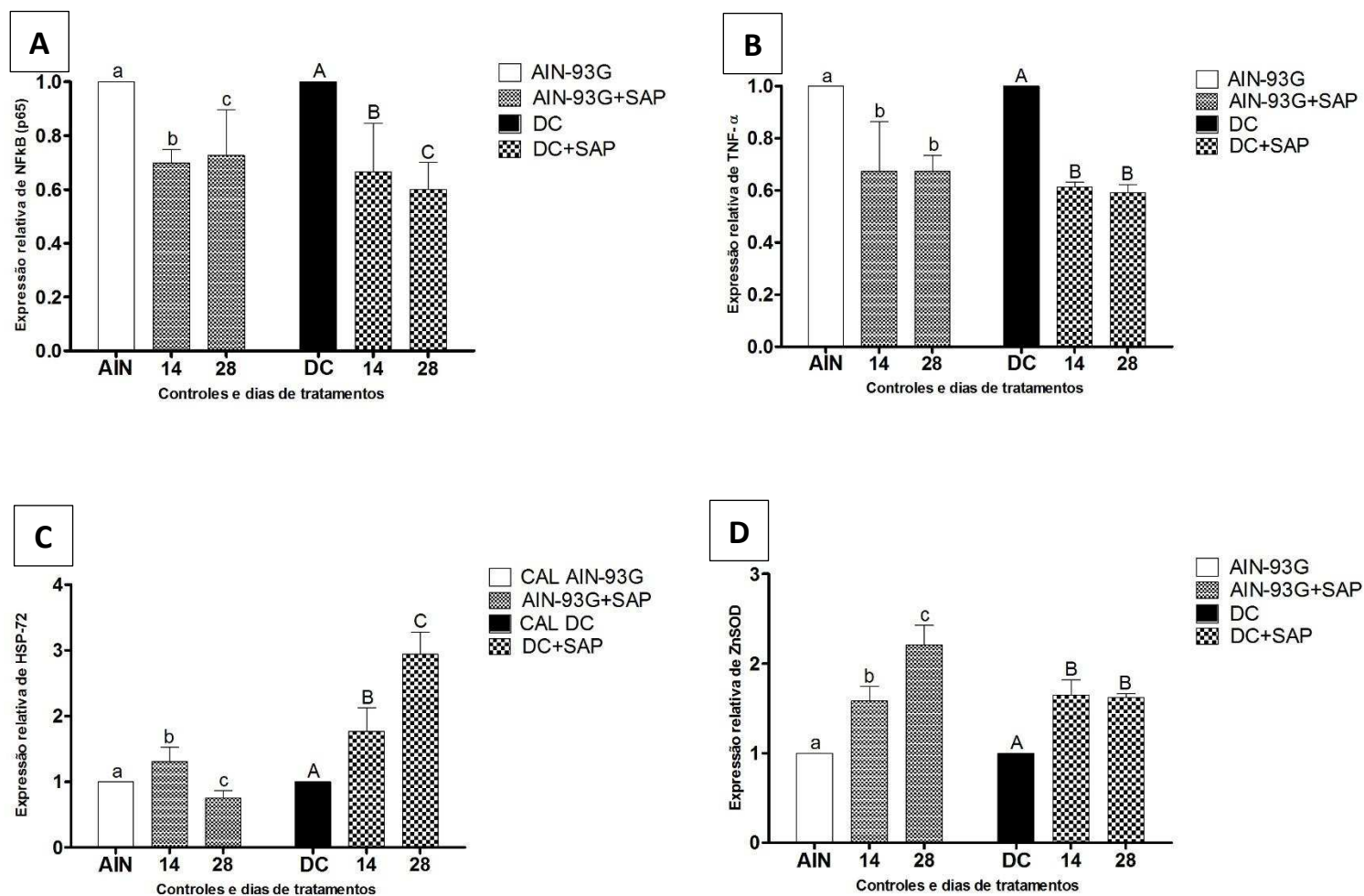
### 3.4.2. EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE NO TECIDO CEREBRAL

Para avaliar o impacto da inserção da castanha de sapucaia nas dietas foi avaliada a expressão gênica relativa dos mRNA em comparação aos grupos controle dos marcadores envolvidos no processo inflamatório e na atividade antioxidante cerebrais por meio da técnica de RTq-PCR em tempo real (Figura 5). A expressão gênica do NFkB (p65) foi menor para os grupos de ratos que consumiram as dietas enriquecidas com sapucaia. Tendo o tempo de tratamento influenciado na menor expressão desse marcador no grupo com DC+SAP.

A expressão gênica do TNF- $\alpha$  foi menor para os ratos que tiveram a castanha de sapucaia acrescida em suas dietas. Tanto para AIN-93G+SAP quanto para DC+SAP não houve diferença significativa na expressão gênica do TNF- $\alpha$  nos distintos tempos de tratamento.

Na avaliação da expressão gênica de HSP-72, o grupo com DC+SAP mostrou valores mais expressivos e com diferenças nos tempos de administração das dietas, sendo o 28<sup>o</sup> dia com maior expressão deste gene.

ZnSOD teve expressão gênica aumentada para ambos os grupos com sapucaia e o grupo com dieta normal acrescida de sapucaia teve valores aumentados de acordo com o tempo de dieta. Porém, no grupo com DC+SAP o tempo não interferiu no aumento da expressão desse gene.



**Figura 5:** Médias da expressão gênica relativa (amostra calibradora,  $y=1$ ) para 14 e 28 dias dos mRNA de NfκB (p65) (A), TNF- $\alpha$  (B), HSP-72 (C) e ZnSOD (D) por qPCR do tecido cerebral de ratos submetidos às dietas AIN-93G+SAP (Dieta Padrão+sapucaia) e DC+SAP (Dieta de Cafeteria+sapucaia). Médias seguidas de letras distintas (minúsculas para AIN-93G e maiúsculas para DC) apresentam diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

### 3.5. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos que houve um aumento do estresse oxidativo no cérebro sinalizado pela elevação das concentrações de malondialdeído (MDA) e uma redução da concentração de superóxido dismutase (SOD) nos tecidos cerebrais dos ratos que consumiram dieta de cafeteria. Estudos suportam a hipótese de que dietas ricas em açúcares e lipídios e o dano oxidativo ao DNA podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CASSIDY et al., 2014; ROS, 2010).

O produto final da peroxidação lipídica possui grande toxicidade e gera uma ação inibidora sobre as enzimas de proteção afetando o mecanismo de defesa antioxidante (HYBERTSON et al., 2011; VIAL et al., 2011). Assim, agentes pró-oxidantes desempenham um papel significativo na patogênese da inflamação. Existem muitos mediadores que iniciam e amplificam a resposta inflamatória como as citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e macrófagos (HYBERTSON et al., 2011; LIN et al., 2012).

Não existem trabalhos publicados que avaliaram a atividade antioxidante e anti-inflamatória utilizando a castanha de sapucaia, entretanto, trabalhos publicados que utilizaram nozes e outras castanhas foram realizados com resultados que subsidiam possíveis inferências com o nosso estudo.

Os resultados mostraram que a atividade antioxidante da castanha de sapucaia *in vivo* promoveu efeito protetor contra o ataque dos radicais livres. Ao avaliarmos os efeitos da ingestão de dieta de cafeteria acrescida de sapucaia por um período de 14 e 28 dias, verificamos que houve interferências tanto na redução das concentrações de MDA quanto no aumento da atividade da enzima superóxido dismutase minimizando os efeitos da peroxidação lipídica no cérebro dos animais (Tabela 7). O tempo de administração da dieta mostrou que em apenas duas semanas de tratamento com sapucaia o tecido cerebral teve maior atividade da enzima superóxido dismutase, portanto menor concentração de ERO.

Pode-se atribuir esses efeitos numa interação metabólica dos ácidos graxos insaturados, magnésio, manganês, selênio, cobre, ferro e zinco já

identificados por estudos de composição química da castanha e possíveis compostos fenólicos e tocoferol que podem estar presentes nesta castanha (DE CARVALHO et al., 2012; DENADAI et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008; VALLILO et al., 1999). Observações realizadas com nozes também mostraram atividades antioxidantes e as mesmas foram correlacionadas positivamente com compostos bioativos presentes em nozes, incluindo minerais, tocoferol, fibras e fitoquímicos que podem contribuir como agentes protetores nos processos de inflamação e do estresse oxidativo (ALVES et al., 2012; BORGES et al., 2015; HUDTHAGOSOL et al., 2012; STIPANUK, 2013).

O processo de inflamação e o estresse oxidativo podem ser controlados por mecanismos de defesas endógenos. A enzima superóxido dismutase é descrita como a primeira linha de defesa do organismo para combater as espécies reativas de oxigênio (ERO), já que a mesma realiza a dismutação dos ânions superóxidos produzidos pelas mitocôndrias em situações de estresse (BURNEIKO et al., 2006; REBUGLIO VELLOSA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2005).

Os resultados encontrados da expressão gênica de ZnSOD mostraram um aumento significativo da mesma sendo observado em todos os grupos que receberam castanha na dieta. Isso permite inferir que a castanha foi eficaz em contribuir na resposta antioxidante, visto que a expressão gênica dessa enzima foi maior em DC+SAP em comparação a DC, assim como nos animais submetidos à dieta AIN-93G+SAP em comparação com o controle. O tecido cerebral é bem suscetível aos efeitos deletérios das ERO em virtude da sua elevada taxa metabólica quando comparado com outros tecidos (REYNOLDS et al., 2007), e a presença da castanha na dieta mostrou-se muito eficaz para auxiliar o aumento da expressão gênica e atividade da SOD.

O estresse oxidativo provocado pela DC tende a aumentar a expressão gênica dos mediadores do processo inflamatório como TNF- $\alpha$  e NF $\kappa$ B (p65) assim como, afetar outros componentes moleculares envolvidos como a proteína de choque térmico (BURG et al., 2007; BRUNETTI et al., 2009; GABAI; JANGALE et al., 2013; LIGHTFOOT et al., 2015; YAGLOM et al., 2003). Os resultados encontrados mostraram que os ratos tratados com a

castanha de sapucaia acrescida em suas dietas apresentaram expressão de HSP-72 significativamente maiores do que os ratos alimentados apenas com as dietas controles (DC e AIN-93G), sinalizando que a sapucaia pode ter desempenhado um importante papel na modulação dessa resposta gênica.

A proteína de choque térmico HSP-72 faz parte da família das proteínas HSP-70, capazes de atuar na inibição de vias de sinalização intracelular como a via do NFkB (p65) gerando como resposta uma menor produção de citocinas pró inflamatórias (CASTRO et al., 2014; TANAKA et al., 2014; DOKLADNY et al., 2010; SINGLETON; WISCHMEYER, 2006; SHI et al. 2006; YAGLOM et al., 2003). Os resultados do presente estudo mostraram menor expressão do fator de transcrição NFkB (p65), podendo atribuir tal fato à maior expressão de HSP-72.

Como são fatores interligados, a inibição do NFkB (p65) provocada pela família HSP-70 no grupo de ratos tratados com DC+SAP afetou também numa menor expressão gênica do TNF- $\alpha$ . A expressão gênica do TNF- $\alpha$  foi menor em entre os animais tratados com DC+SAP e AIN-93G+SAP comparados com DC e AIN-93G, respectivamente (Figura 5).

Em suma, a expressão aumentada de HSP-72 observado nos grupos que tiveram castanha acrescida na dieta, interferiu na cascata de ativação do NFkB (p65) e esta por sua vez, contribuiu significativamente na redução da expressão do TNF- $\alpha$ , visto que o fator de necrose tumoral alfa é um agente pró inflamatório cuja expressão é acionada pelo NFkB (p65) (DANDEKAR et al., 2015; DE LA FUENTE et al., 2015; TANAKA et al., 2014).

### **3.6. CONCLUSÃO**

Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórias encontrados no estudo podem ser correlacionados com a composição nutricional descrita desta castanha. Podemos deduzir que as propriedades antioxidantes da sapucaia exerceram importante atividade na modulação do processo inflamatório e que a

mesma poderá ser considerada como um alimento que exerça efeito neuroprotetor.

Os resultados que englobam a redução significativa da expressão gênica de agentes inflamatórios NFκB (p65) e TNF-α associado com o aumento significativo de ZNSOD e HSP-72, mostraram que um alimento pode ser efetivo nos processos de prevenção e proteção à saúde.

Outra observação importante foi em relação aos efeitos com as semanas de tratamento, uma vez que apenas 14 dias de dieta enriquecida com castanha de sapucaia foi capaz de mostrar resultados muito expressivos tanto na ação antioxidante quanto na redução da inflamação.

Mesmo diante de achados tão importantes, ressaltamos a necessidade de maiores investigações acerca desta castanha com vistas a conhecer melhor os mecanismos envolvidos nessas respostas.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do estudo. (APQ 00832 12)

### **3.7. REFERÊNCIAS**

ALVES, Natalia et al., Studies on mechanistic role of natural bioactive compounds in the management of obesity an overview. **Tonutraj**, v. 5 n.1, p.193-206, 2012.

BORGES, Juliana Pereira; LESSA, Marcos Adriano. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. AHEAD, p. 0-0, 2015.

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

BRUNETTI, Luigi et al., Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1323-1327, 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

BURG, Maurice B.; FERRARIS, Joan D.; DMITRIEVA, Natalia I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1441-1474, 2007.

BURNEIKO, Regina CM et al., Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Nuts, hypertension and endothelial function. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, p. S21-S33, 2011.

CASSIDY, Aedín et al. Intake of dietary flavonoids and risk of epithelial ovarian cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, p. ajcn. 088708, 2014.

CASTRO, Simone Vieira et al., proteínas de choque termico HSP-70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2014.

DANDEKAR, Aditya; MENDEZ, Roberto; ZHANG, Kezhong. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease. **Stress Responses: Methods and Protocols**, p. 205-214, 2015.

DAVIES, Kelvin JA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279-289, 2000.

DE CARVALHO, Izabela Maria Montezano et al., Chemical characterization of sapucaia nuts (*Lecythis pisonis* Cambess.) from zona da mata mineira region. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.

DE LA FUENTE, Verónica et al., NF- $\kappa$ B Transcription Factor Role in Consolidation and Reconsolidation of Persistent Memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 50, 2015.

DENADAI, Sandra Maria Silveira et al., In vitro digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DE SOUZA, Valdomiro Aurélio Barbosa et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, 2008.

DOKLADNY, Karol et al. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP-70 in rats: possible role of NF- $\kappa$ B. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 2, p. 153-163, 2010.

DOMÍNGUEZ-AVILA, Jesús A. et al. The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. **Food Chemistry**, v. 168, p. 529-537, 2015.

GABAI, Vladimir L.; SHERMAN, Michael Y. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1743-1748, 2002.

GAO, Hui-Ming; ZHOU, Hui; HONG, Jau-Shyong. Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. In: Neuroinflammation and neurodegeneration. Springer New York, 2014. p. 81-104.

GONZÁLEZ, Carlos A.; SALAS-SALVADÓ, Jordi. The potential of nuts in the prevention of cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. S2, p. S87-S94, 2006.

HUDTHAGOSOL, Chatrapa et al. Pecans acutely increase plasma postprandial antioxidant capacity and catechins and decrease LDL oxidation in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 56-62, 2011.

HYBERTSON, Brooks M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 4, p. 234-246, 2011.

JANGALE, Nivedita M. et al. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 187-195, 2013.

KIM, J. Y.; YENARI, M. A.; LEE, J. E. Regulation of inflammatory transcription factors by heat shock protein 70 in primary cultured astrocytes exposed to oxygen–glucose deprivation. **Neuroscience**, v. 286, p. 272-280, 2015.

KOHN, HENRY IRVING; LIVERSEDGE, MARGARET. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

LIGHTFOOT, Adam P. et al. O16. Heat Shock Protein 70 Protects Against ER Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction; A Potential Therapeutic Target to Reduce Muscle Weakness in IIM? **Rheumatology**, v. 54, n. suppl 1, p. i31-i32, 2015.

LIN, Chih-Pei et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. **BioMed Research International**, v. 2013, 2012.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARKLUND, Stefan L. Pyrogallol autoxidation. **Handbook of methods for oxygen radical research**. CRC Press, Boca Raton, p. 243-247, 1985.

PYLES, Lee A.; STEJSKAL, Elizabeth J.; EINZIG, Stanley. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 4, p. 407-419, 1993.

REEVES, Philip G. et al. 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. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REBUGLIO VELLOSA, José Carlos et al., Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305-312, 2013.

REYNOLDS, Ashley et al. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **International Review of Neurobiology**, v. 82, p. 297-325, 2007.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al., A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, 2006.

ROS, Emilio. Health benefits of nut consumption. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 652-682, 2010.

SABATÉ, Joan; ANG, Yen. Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1643S-1648S, 2009.

SABATÉ, Joan; ODA, Keiji; ROS, Emilio. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 9, p. 821-827, 2010.

SADI, Gökhan; YILMAZ, Ökkes; GÜRDAY, Tülin. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu–ZnSOD and catalase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 309, n. 1-2, p. 109-116, 2008.

SHI, Yongzhong et al. The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP-70 involves inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway but not the MAPK pathways. **Shock**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2006.

SINGLETON, Kristen D.; WISCHMEYER, Paul E. Effects of HSP-70. 1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 5, p. L956-L961, 2006.

STIPANUK, Martha H.; CAUDILL, Marie A. **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. Elsevier Health Sciences, 2013.

TANAKA, Takashi et al. HSP-70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling. **Science Signaling**, v. 7, n. 356, p. ra119-ra119, 2014.

TRUSHINA, E.; MCMURRAY, C. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1233-1248, 2007.

VIAL, Guillaume et al. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 348-356, 2011.

VALLILO, M. I. et al., *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1999.

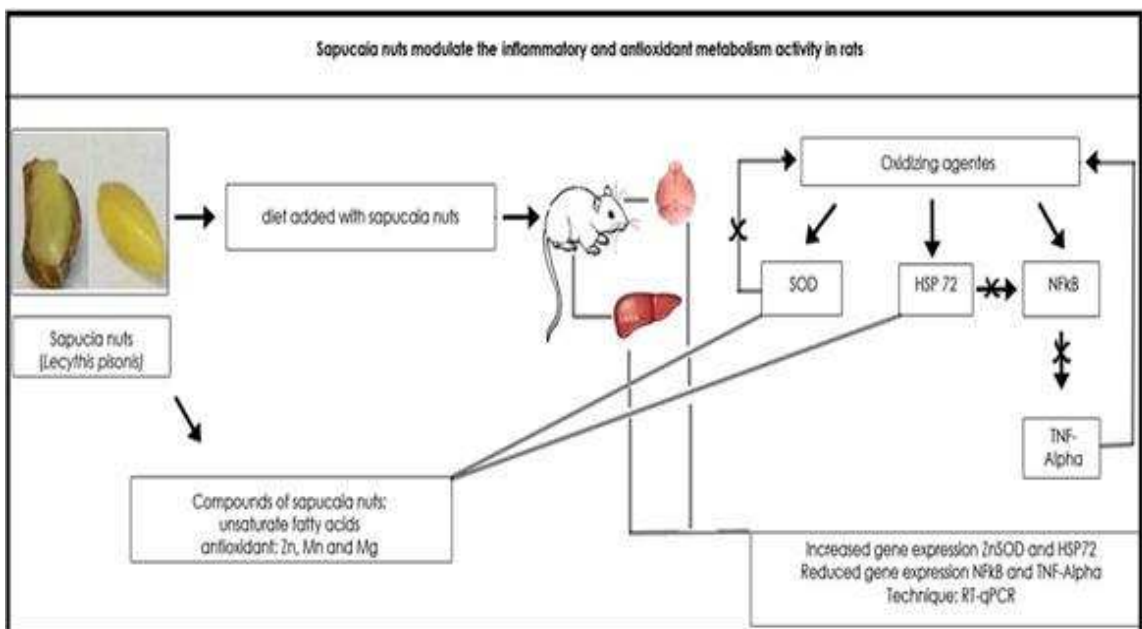
YAGLOM, Julia et al. Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and HSP-72. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 11, p. 3813-3824, 2003.

### 3.8. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo objetivou avaliar o efeito modulador da castanha de sapucaia na regulação do estado inflamatório e da atividade antioxidante em ratos alimentados com dieta de cafeteria e revelou que a sapucaia se configurou como um alimento com efeitos benéficos a saúde.

A sapucaia foi capaz de estimular a atividade enzimática da superóxido dismutase e reduzir a peroxidação lipídica no tecido hepático e cerebral dos ratos nas diferentes dietas empregadas padrão e hiperlipídica com acréscimo da castanha observado nos diferentes tempos avaliados (14° e 28° dias).

Observamos importantes resultados de modulação da expressão gênica da enzima ZnSOD e de HSP-72 e dos marcadores relacionados ao processo inflamatório TNF- $\alpha$  e NF $\kappa$ B tanto no fígado quanto no cérebro dos ratos conforme a via proposta na figura 6, nas diferentes dietas empregadas padrão e hiperlipídica com acréscimo da castanha. Tal observação ocorreu tanto do 14° quanto no 28° dia de dieta, o que reforça o efeito agudo da castanha no metabolismo do rato, porém não podemos extrapolar tal condição protetiva por longo período.



**Figura 6:** Interação dos compostos da sapucaia e efeitos no metabolismo de ratos wistar

Podemos sugerir que as propriedades nutricionais verificadas no estudo de composição química da castanha de sapucaia que foram adicionadas às dietas oferecidas aos ratos, correlacionaram positivamente com a modulação dos compostos antioxidantes e pró-inflamatórios que obtivemos nos resultados da pesquisa.

Mais estudos sobre esta castanha precisam ser realizados com o intuito de avaliar impactos do uso em longo prazo como alimento humano e animal e discutir a viabilidade de produção e de extravismo. Contudo, é razoável assumir que com os resultados encontrados até o momento, a sapucaia configurou-se como uma importante fonte de nutrientes que apresentam efeitos protetores no fígado e no cérebro de ratos wistar.

### 3.9. ANEXOS

#### Anexo 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV)

##### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 77/2014, intitulado “Efeito da castanha de sapucaia *Lecythis pisonis Cambess* na modulação da expressão de marcadores pró e anti-inflamatórios e atividades antioxidante no tecido hepático de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria”, coordenado pelo professor José Humberto de Queiroz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado definitivamente em 14/10/2015.

##### CERTIFICATE

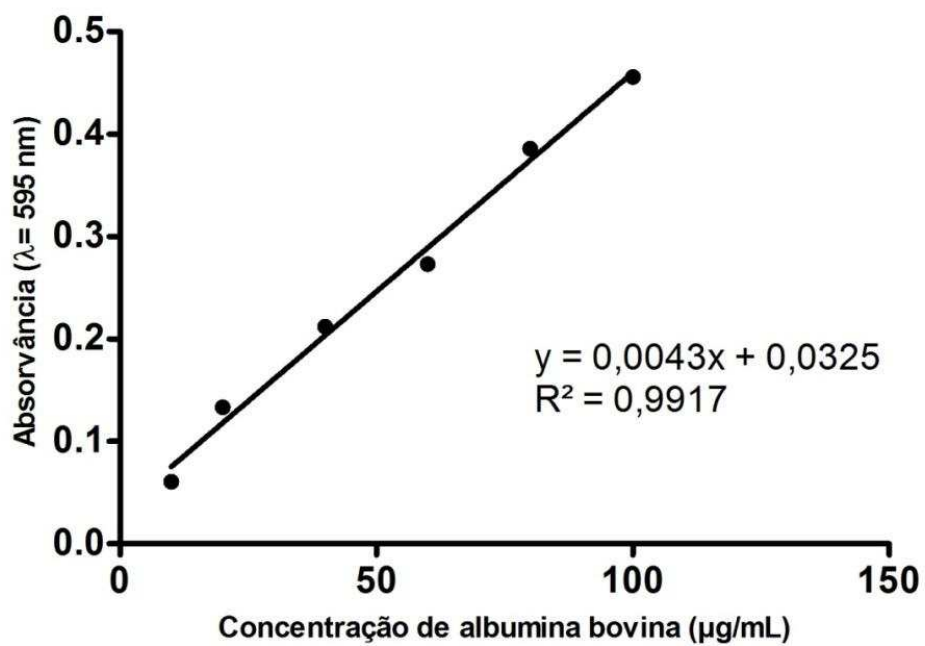
The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 77/2014, named “Effect Chestnut sapucaia *Lecythis pisonis Cambess* in modulating the expression of pro and anti-inflammatory markers and antioxidant activities in liver tissue of Wistar rats fed cafeteria diet”, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being definitive approved on October 14, 2015.

  
Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

Anexo 2 - Curva padrão utilizada para quantificar proteínas pelo método Bradford



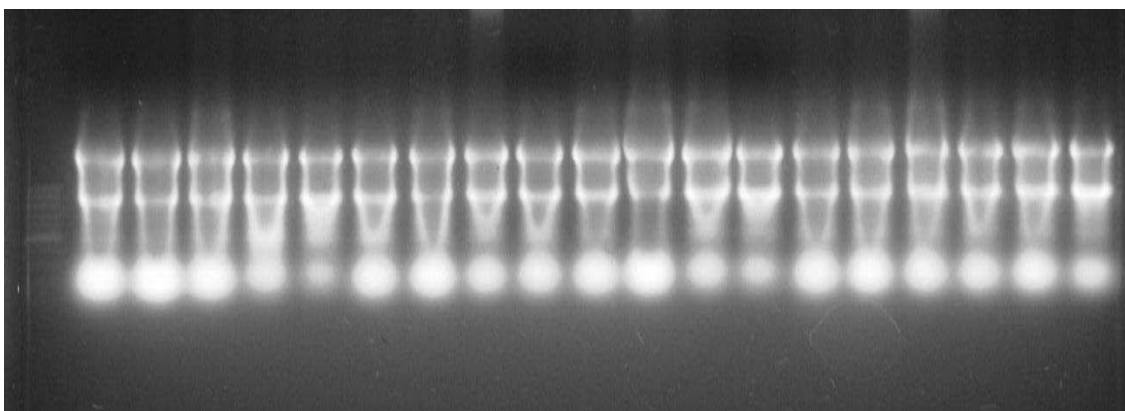
### Anexo 3 - Quantidade de proteínas nas amostras dos tecidos

Concentrações hepáticas e cerebrais de proteínas (mg/mL) nos animais submetidos às dietas durante os períodos de tratamento avaliados:

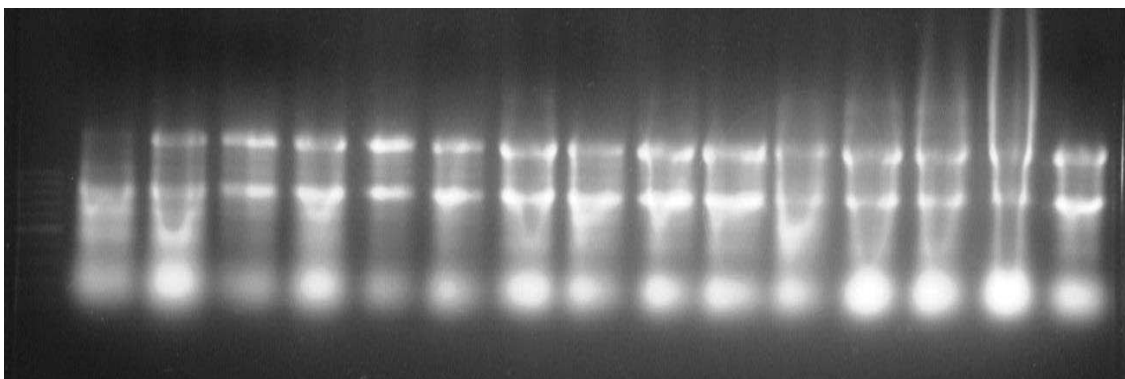
Grupos	Tecido hepático		Tecido cerebral	
	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
AIN93G	5,73 ± 0,23 <sup>b</sup>	5,40 ± 0,25 <sup>d</sup>	2,42 ± 0,20 <sup>e</sup>	4,03 ± 0,23 <sup>f</sup>
AIN93G + Sap	5,32 ± 0,27 <sup>b</sup>	5,30 ± 0,48 <sup>d</sup>	2,47 ± 0,18 <sup>e</sup>	3,92 ± 0,37 <sup>f</sup>
Dieta Cafeteria	5,50 ± 0,32 <sup>b</sup>	5,47 ± 0,20 <sup>d</sup>	2,63 ± 0,31 <sup>e</sup>	3,75 ± 0,18 <sup>f</sup>
Dieta Caf + Sap	5,90 ± 0,45 <sup>b</sup>	5,60 ± 0,32 <sup>d</sup>	2,54 ± 0,15 <sup>e</sup>	3,66 ± 0,45 <sup>f</sup>

Tanto no tecido hepático quanto no cerebral, não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à concentração de proteínas em cada período avaliado, expresso pelas letras iguais nas colunas, segundo o teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ).

#### Anexo 4 – Gel de agarose do tecido hepático de ratos

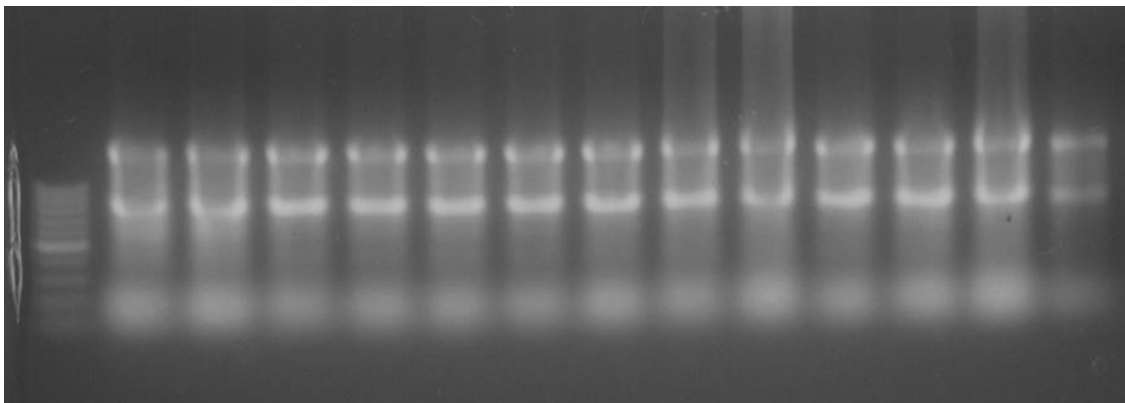


Verificação da integridade e qualidade de amostras aleatórias de mRNA hepático dos animais dos grupos G1 e G2, em todos os períodos de tratamento, porEletroforese emgel agarose (1%), apresentando as bandas 18S e 28S.

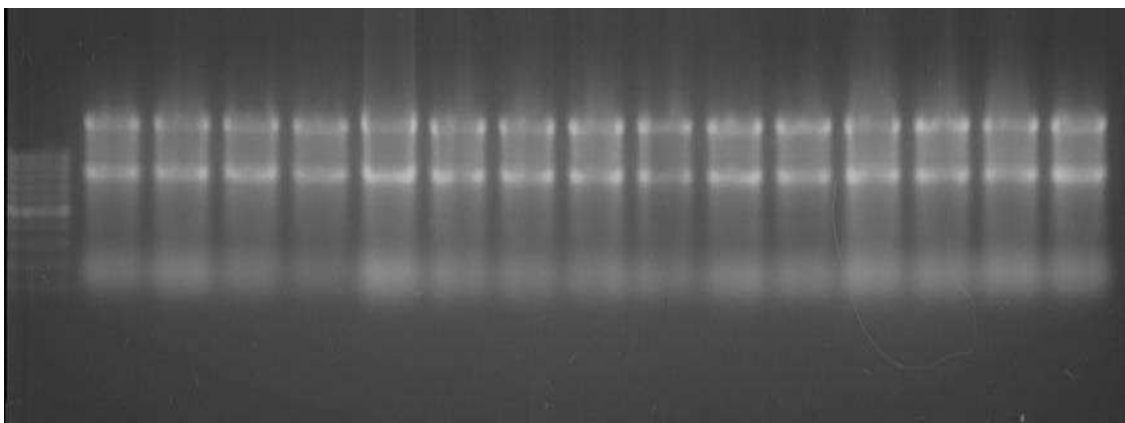


Verificação da integridade e qualidade de amostras aleatórias de mRNA hepático dos animais dos grupos G3 e G4, em todos os períodos de tratamento, porEletroforese emgel agarose (1%), apresentando as bandas 18S e 28S.

## Anexo 5 – Gel de agarose do tecido cerebral de ratos

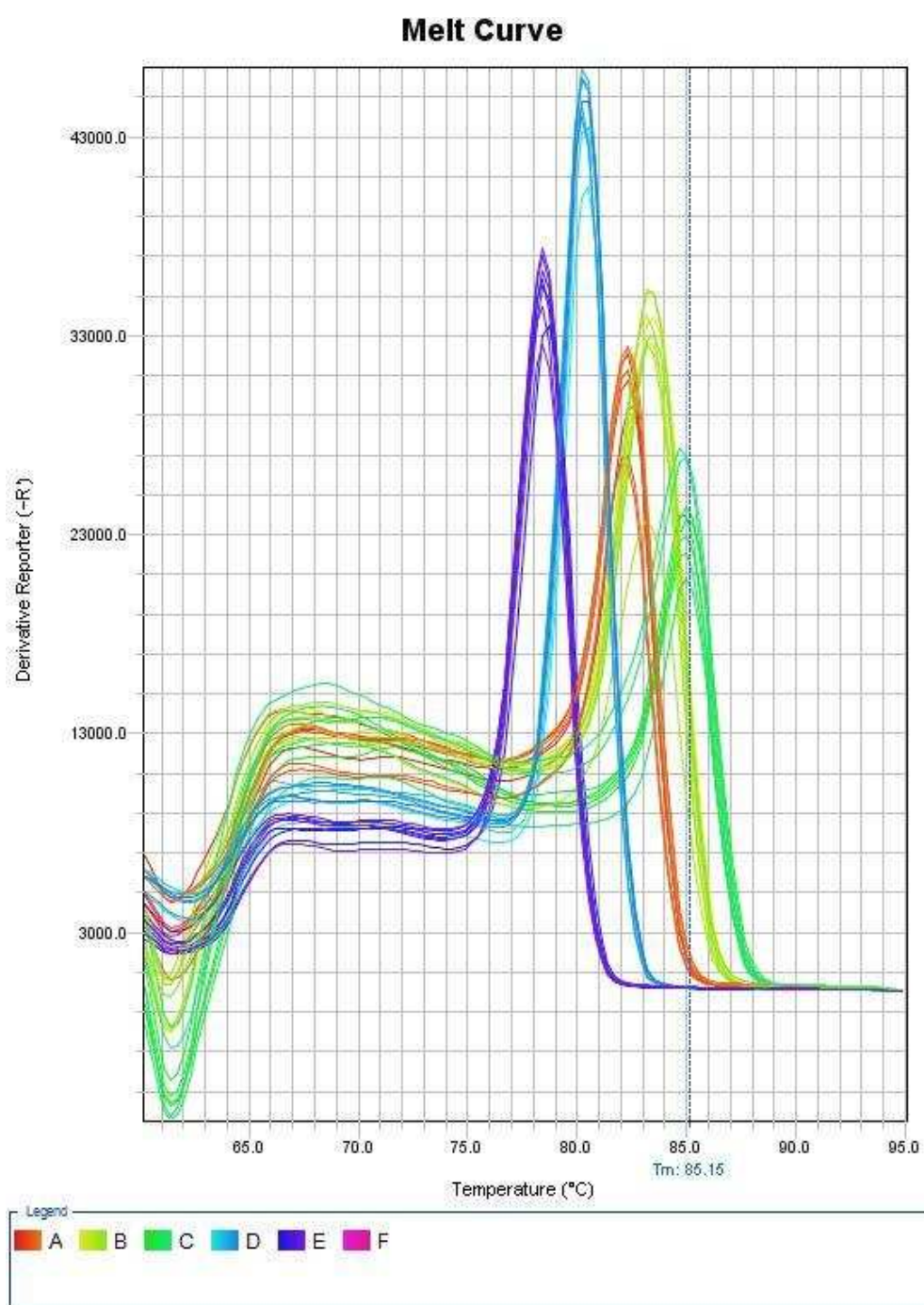


Verificação da integridade e qualidade de amostras aleatórias de mRNA cerebral dos animais dos grupos G1 e G2, em todos os períodos de tratamento, porEletroforese emgel agarose (1%), apresentando as bandas 18S e 28S.



Verificação da integridade e qualidade de amostras aleatórias de mRNA cerebral dos animais dos grupos G3 e G4, em todos os períodos de tratamento, porEletroforese emgel agarose (1%), apresentando as bandas 18S e 28S.

## Anexo 6 – Padrão das curvas de *Melting* do estudo



Full Length Research Paper

### Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) modulate the hepatic inflammatory and antioxidant metabolism activity in rats fed high-fat diets

Marcos Vidal Martins<sup>1\*</sup>, Izabela Maria Montezano de Carvalho<sup>2</sup>, Mônica Maria Magalhães Caetano<sup>1</sup>, Renata Celi Lopes Toledo<sup>1</sup>, Antônio Avelar Xavier<sup>1</sup> and José Humberto de Queiroz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Sergipe, Brazil.

Received 1 April 2016, Accepted 18 May, 2016.

*Lecythis pisonis* Cambess is commonly known as “sapucaia” nut. Previous studies show that it is rich in unsaturated fatty acids and in antioxidant minerals. The aim of the present study was to assess the antioxidant and anti-inflammatory effects of this nut after its introduction into a control (AIN-93G) or high-fat diet in Wistar rats. The animals were divided into four groups: a control diet, the same control diet supplemented with sapucaia nuts, a high-fat diet or the high-fat diet supplemented with sapucaia nuts and were fed with these diets for 14 or 28 days. The gene expression of the markers tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  NF $\kappa$ B (p65) zinc superoxide dismutase (ZnSOD) and heat shock protein 72 (HSP72) was determined by the chain reaction to the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (q-PCR). The antioxidant activity was also measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) through the activity of the SOD enzyme. The groups treated with “sapucaia” nuts presented reduced lipid peroxidation values and increased ZnSOD and HSP72 gene expression, as well as decreased TNF- $\alpha$  and NF $\kappa$ B (p65) gene expression levels. The significant results showed that “sapucaia” could serve as a potential source of antioxidants and as a protector agent for the examined animals.

**Key words:** Sapucaia nuts, inflammation, oxidative stress, gene expression.

#### INTRODUCTION

Excessive consumption of food associated or not with sedentary lifestyle contributes to the onset of metabolic disorders linked to increased body weight and systemic insulin resistance due to chronic inflammatory condition (Carobbio et al., 2011). Experimental data demonstrates that Wistar rats can develop obesity when they are fed with high-fat diets (Burneiko et al., 2006; Estadella et al.,

2004; Kretschmer et al., 2005). The intake of these high-fat diets increases the total amount of body lipids, and thus, raises the oxidative stress, which is strongly related with inflammation (Brunetti et al., 2009; Pérez-Echarri et al., 2009). The increase of body fat reserves stimulates the macrophage infiltration into adipose tissue that could activate a chronic inflammation cascade, which may

\*Corresponding author. E-mail: marcosvidalmartins@yahoo.com.br.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

expand to other tissues and cause several health disorders (Alemany, 2013).

High-fat diets can affect the redox balance in the body. Fisiologia (ROS) (Vial et al., 2011). On the other hand, human and animal organisms have developed a very effective antioxidant defense system, which mainly consists of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione-S-transferase (GST) enzymes. These enzymes co-operate to protect cells from free radicals (Dominguez-Avila et al., 2015).

In addition to the enzymatic antioxidant defense, there are also highly conserved proteins that help in protecting the body, such as heat shock proteins (HSP). Different stimuli can interfere with the gene expression of these proteins and could result in the intracellular accumulation of denatured proteins. An increased gene expression of the HSP 70 protein family generates an anti-inflammatory effect, since these proteins down-regulate the Kappa Beta Transcription Factor (NFkB). Consequently, some inflammatory expression markers such as the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and the interleukin 1 beta (IL 1 $\beta$ ) are inhibited (De la Fuente et al., 2015; Kim et al., 2015).

Literature shows that the consumption of nuts has beneficial effects on human health due to their nutritional components. Nuts are rich in unsaturated fatty acids, sulfur amino acids and minerals, such as selenium, magnesium, manganese, zinc, iron and copper. At the same time, they contain satisfactory levels of vitamin C and E (Dominguez-Avila et al., 2015; Sabaté et al., 2010; Serrano et al., 2007). The combined effects of these acids, minerals and vitamins may influence specific processes related to the regulation of cell differentiation, DNA protection and inflammatory responses due to their protective role in oxidative stress (Casas-Agustench et al., 2009; Cassidy et al., 2014; Dominguez-Avila et al., 2015; González and Salas-Salvadó, 2006; Ross, 2010; Sabaté et al., 2010).

The vast Brazilian biome remains almost untouched when it comes to nut extraction. Only the cashew and the Pará nuts are commercially available. The "sapucaia" nut (*Lecythis pisonis* Cambess) for human consumption remains commercially unexplored, although some local citizens consider it as the best Amazon nut (Clay et al., 2000). Previous studies using "sapucaia" nuts conducted in our laboratory have shown that their use in diets can favor health. The composition of this nut makes it a significant source of unsaturated fatty acids, proteins and minerals such as manganese, magnesium, iron and calcium. Besides, "sapucaia" serves as a potential protective agent against different metabolic disorders (Carvalho et al., 2012). Thus, the aim of the current study is to verify the sapucaia nut ability to reduce oxidizing agent production and to modulate the gene expression of pro and anti-inflammatory molecules in the liver tissue of Wistar rats fed with a high-fat diet.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant

The "sapucaia" nuts used in the present study were collected from five trees at the Federal University of Viçosa campus, which is located in the Zona da Mata Mineira region (20°76'S and -42°86'W), Southeastern of Minas Gerais State. Five fruits were collected from each tree and ten nuts were taken from each of them. The current study uses information about the chemical composition of these nuts indicated by Carvalho et al. (2012).

### Animals and diets

The experiment followed the standards established by Law 11.794 and the CONCEA/MCTI Regulatory Resolutions, 2008. The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Federal University of Viçosa (CEUA-UFV) (Protocol 77/2014). Forty eight male albino rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) were used in the present experiment. The newly weaned animals were obtained from the Central Animal Laboratory of the Biological Sciences Center (CCB) at Federal University of Viçosa, Minas Gerais State - Brazil. The weight of the animals was recorded and they were, then, randomly allocated to eight groups, each with six animals, and housed in individual cages with a controlled environment under temperatures between 22 and 25°C and light-dark cycle of 12 h per day. Experimental diets and water were offered *ad libitum* either for 14 or 28 days. Calculations were performed to simulate the human standard consumption of three nuts a day. The nutritional information of the "Sapucaia" nut (SAP) was obtained by the study of Carvalho et al. (2012). A reference intake of 2000 kcal per day, which corresponds to 4.65% of the total calories of three Sapucaia nuts (93.08 kcal for three nuts), was adopted; thus, the diets contained 4.65% of sapucaia nut.

The animals were fed with four different diets for 14 or 28 days, as follows: Group 1, was fed with a standard diet (AIN-93G) (Reeves et al., 1993); Group 2, was fed with the standard diet supplemented with sapucaia nuts (24 g/kg; 4.65% of total calories) (AIN-93G + SAP), although caloric density (3.95 kcal/g) remained the same (Table 1); Group 3, was fed with a high-fat diet (HFD); and Group 4, was fed with the high-fat diet supplemented with sapucaia nuts (HFD + SAP) (52.2 g/kg; 4.65% of total calories), although again the caloric density remained unaffected (6.92 kcal/g) (Table 2). The rats had *ad libitum* access to the diets and water. The diets were prepared weekly and stored at 4°C to prevent oxidation. The animals were euthanized with ketamine (25 mg/kg IM) and xylazine (2 mg/kg IM) at the end of each study period (14 or 28 days), after fasting for 12 h. The liver tissue of the euthanized animals was collected, frozen in liquid nitrogen and stored in an Ultrafreezer (-80°C).

### Gene expression

The total RNA extraction was performed in Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) using 100 mg of liver tissue, according to the recommendation of the manufacturer. The concentration and purity were assessed in a spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific DE, USA) and the integrity of the mRNAs was checked through agarose gel electrophoresis. The recovered mRNA was treated with RNase-free DNase (Promega). The cDNA synthesis was performed using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, CA, USA), according to the protocol of the manufacturer. cDNA was used to determine the expression of mRNAs for the markers TNF- $\alpha$ , NFkB, ZnSOD, HSP72 and the reference house keeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

**Table 1.** Diet compositions (g/1000 g of diet).

Ingredient	AIN93G (g)	AIN93G+Sapucaia
Caseine (81.50%)	200	192.2
Dextrinized starch	132	123
Saccharose	100	100
Soy oil	70	54
Microcrystalline cellulose	50	50
Mineral mixture	35	35
Vitamin mix	10	10
L-cystine	3	3
Coline	2.5	2.5
Sapucaia nuts	-	29.4
Corn starch	397.5	400.9
Caloric density (kcal/g)	3.95	3.96

**Table 2.** High hat diet (HFD) compositions with sapucaia nuts (g/1000 g of diet).

Ingredient	AIN93G (g) [HFD]	AIN93G+Sapucaia (g) [HFD+SAP]
Ham pâté	222.22	215.7
Potato sticks	111.11	104.61
Bacon	111.11	104.61
Bologna	111.11	104.61
Sweet biscuit cornstarch	111.11	104.61
Chocolate powder	111.11	104.61
whole milk powder	111.11	104.61
Commercial Diet	111.11	104.61
Sapucaia nuts	-	52.2
Caloric density (kcal/g)	6.94	6.92

gene.

The relative quantification of the gene expression was performed through real-time polymerase chain reaction (qPCR) using the Sybr Green Reagent 2X Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). The final volume of each reaction was 10 µl: 2 µl of the cDNA, 0.8 µl of the primers mixture (2.5 µM) (sense and antisense), 5.0 µl of 2X Master Mix Sybr Green reagent and 2.2 µl of ultrapure water in each tested gene. The used qPCR reaction protocol was: 15 min at 95°C, then 40 cycles at 95°C (15 s), 60°C (30 s) and 72°C (30 s) followed by melting curve analysis. Samples were analyzed in four biological repetitions and two technical repetitions and quantified in independent runs.

The negative controls (NTC) were made in two technical repetitions by replacing the cDNA samples by the same water volume in the reaction. "AB Step One Real Time PCR System" (Applied Biosystems) equipment was used to run the experiment. The relative quantification of the gene expression was analyzed through the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

The pairs of oligonucleotides used to amplify the genes of interest were: NFkB (p65) (Fw 5'-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA-3') and (Rw 5'-TCGCACTTGTAACGAAACG-3'), TNF-α (Fw5'-GCCGATTGCCATTTACATACC-3') and (Rw 5'-GGACTCCGTGATGTCTAAGTAG-3'), HSP 72 (Fw 5'-AGGCCAACAAGATCACCATC-3') and (Rw 5'-TAGGACTCGAGCGCATTCTT-3'), ZnSOD (Fw 5'-

GAGCAGAAGGCAAGCGGTGAA-3') and (Rw 5'-CCACATTGCCAGGTCTC-3'), GAPDH (Fw 5'-GGTTGTCTCCTGTCACTTC-3') and (Rw 5'-CTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'). The oligonucleotides were designed based on the gene sequences of the Wistar *Rattus norvegicus* found in the GenBank, using Primer 3 plus software. The experiment followed the MIQE guidelines established for studies that use the qPCR technique in real time (Bustin et al., 2009).

#### Preparation of liver homogenate

Liver samples (200 mg) were collected from each rat and after their thawing, were homogenized in Tris-HCl 0.01 M buffer, pH 7.4 at the ratio of 5 ml buffer per 500 mg of tissue and finally, centrifuged at 10.000 g for 15 min at 4°C. The supernatants were used to determine the total protein content, the superoxide anion dismutase antioxidant activity, and hepatic lipid peroxidation.

#### Enzymatic activity of the hepatic SOD

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined in relative units. Each SOD unit was defined by the amount of enzyme able to

**Table 3.** Mean body weight gain, daily diet consumption and hepatosomatic index in the initial and final stages of the treatment.

Group/Treatment	Weight gain (g)	Daily diet consumption (g)	Hepatosomatic Index
<b>14 days</b>			
AIN-93G	95.10±19.89 <sup>a</sup>	26.60±7.02 <sup>b</sup>	4.9±0.44 <sup>a</sup>
AIN-93G+SAP	96.85±16.46 <sup>a</sup>	29.54±4.36 <sup>b</sup>	4.7±0.51 <sup>a</sup>
HFD	97.82±14.46 <sup>a</sup>	32.73±6.05 <sup>a</sup>	4.7±0.62 <sup>a</sup>
HFD+SAP	94.32±11.86 <sup>a</sup>	25.40±5.12 <sup>b</sup>	4.6±0.71 <sup>a</sup>
<b>28 days</b>			
AIN-93G	152.27±12.49 <sup>b</sup>	26.56± 6.24 <sup>b</sup>	4.8±0.63 <sup>a</sup>
AIN-93G+SAP	160.89±8.14 <sup>b</sup>	30.21± 7.23 <sup>a</sup>	4.6±0.48 <sup>a</sup>
HFD	186.67±26.88 <sup>a</sup>	32.62±9.39 <sup>a</sup>	4.6±0.52 <sup>a</sup>
HFD+SAP	187.38±11.54 <sup>a</sup>	32.21±5.06 <sup>a</sup>	4.7±0.73 <sup>a</sup>

Means (n = 6) followed by different letters in the same column are statistically different (Tukey test, p <0.05). AIN-93G, AIN-93G diet; AIN-93G + SAP, AIN-93G + sapucaia nuts diet; HFD, high-fat diet; HFD + SAP, high-fat diet + sapucaia nuts diet, liver somatic index (liver's relative weight = liver weight / body weight).

inhibit 50% of the pyrogallol oxidation rate. The used reaction medium contained 30 µl of liver homogenate and 15 µl of pyrogallol 24 mmol/L and 15 µl of catalase prepared with 2.4 mg in 2 ml of distilled water. The volume was completed with Tris-HCl buffer 50 mM 270 µl up to 300 µl, pH 8.2 and 1 mM of EDTA. A standard 100% pyrogallol oxidation was conducted in 15 µl of catalase and 15 µl of pyrogallol 24 mmol/L. The blank solution contained 15 µl of catalase and 285 µl of the buffer. Initially, the readings were performed at 420 nm absorbance. The reaction was then incubated at 37°C for 5 min and the readings were performed again at 420 nm. The absorbance found before and after the 5 min incubation was subtracted to minimize the presence of interferents. The results were expressed as U SOD/mg of protein (Marklund, 1985). Calculations were made based on the standard absorbance value, by considering that such value had zero SOD units. Protein quantification was performed according to Bradford (1976) using a standard curve, which was based on bovine serum albumin calibration.

#### Hepatic lipid peroxidation analysis

This was conducted through the measurement of malondialdehyde (MDA), which is produced by the oxidation of fatty acids through the reaction of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Kohn and Liversedge, 1944). The lipid peroxidation was measured by means of a reaction containing 400 µl liver homogenate, 1 ml trichloroacetic acid (20%) and 400 µl thiobarbituric acid (1.6%). The mixture was incubated at 95°C for 1 h, 1.6 ml n-butanol was added and it was then centrifuged at 3000 rpm/10 min. The reading was performed at 510, 532, and 560 nm. Equation proposed by Pyles et al. (1993) was used to calculate the final values in order to minimize interferences from pigments of heme in the hemoglobin in the MDA dosage:

$$MDA_{532} = 1.22[(A_{532}) - (0.56)(A_{510}) + (0.44)(A_{560})]$$

Malondialdehyde concentration was determined through the coefficient of molar absorptivity  $E_{0} = 1.56 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Buege and Aust, 1978) and the results were expressed in nmoles of MDA per mg of protein.

#### Statistical analysis

ANOVA analysis was performed to assess the distribution of variables in the experiments. It was followed by the Tukey test (Graphpad Prism 5) in all treatments. The significance level was 95%, p <0.05. The results were expressed as mean ± standard deviation. The comparisons were conducted between the AIN-93G and AIN-93G groups + SAP and between HFD and HFD + SAP groups by considering the calorific density difference between the administered diets.

## RESULTS

### Weight gain and diet consumption

Weight assessments comparing animals subjected to HFD/HFD + SAP and those fed with AIN-93G/AIN-93G + SAP showed that the weight gain of animals was significantly different after 28 days of treatment. Daily feed intake per animal was higher in the HFD group at day 14 and lower in the AIN-93G group at day 28 of the experiment compared to the other groups (Table 3).

### Lipid peroxidation values and antioxidant activity

Lipid peroxidation (MDA) values and the antioxidant activity expressed in SOD units (Table 4) were determined with the intention to assess the impact of the high-fat diet on the oxidative stress in the liver of rats and to discover the possible protective effect of sapucaia nut supplementation. All groups treated with "sapucaia" nut-enriched diets showed lower MDA concentration compared to the other groups in both tested diets (HFD and AIN-93G). MDA level measurements showed that the AIN-93G diet had similar values at days 14 and 28 of the

**Table 4.** Means of the hepatic malondialdehyde (MDA) concentrations (nmol MDA / mg STP) and superoxide dismutase units (SOD) (U SOD/mg LWA) at the 14th and 28th day in each diet (AIN-93G, AIN-93G + SAP, HFD, HFD + SAP) administered to the animals.

Group	MDA		SOD	
	14 days	28 days	14 days	28 days
AIN-93G	1.10 ± 0.04 <sup>BA</sup>	1.16 ± 0.02 <sup>BA</sup>	8.10 ± 0.44 <sup>BA</sup>	8.45 ± 0.72 <sup>BA</sup>
AIN-93G+SAP	0.62 ± 0.05 <sup>BB</sup>	1.03 ± 0.03 <sup>CB</sup>	11.78 ± 1.14 <sup>AB</sup>	13.65 ± 0.50 <sup>AB</sup>
HFD	1.39 ± 0.01 <sup>AC</sup>	1.72 ± 0.05 <sup>BC</sup>	6.30 ± 0.48 <sup>AA</sup>	10.35 ± 0.47 <sup>BC</sup>
HFD+SAP	0.65 ± 0.05 <sup>BB</sup>	0.96 ± 0.02 <sup>AB</sup>	14.28 ± 0.81 <sup>BB</sup>	14.86 ± 0.62 <sup>BB</sup>

Means (n=6) followed by different letters in the same column are statistically different (Tukey test, p <0.05). AIN-93G, AIN-93G diet, AIN-93G + SAP, AIN-93G + sapucaia nuts diet, HFD, high-fat Diet; HFD + SAP, HFD + sapucaia nuts diet, PTN - Proteins.

experiment, although a significant increase in the MDA levels was observed in the other groups. The antioxidant enzyme activity expressed in SOD units was significantly higher in the sapucaia supplemented groups both at days 14 and 28.

#### Antiinflammatory and antioxidant hepatic gene expressions

Relative mRNAs gene expression was determined to help understand the effects caused by the inclusion of the "sapucaia" nuts in the diets. The experiment compared the diets with or without sapucaia nuts to find the genes involved in the inflammatory process and the hepatic antioxidant activity by real time RT qPCR (Figure 1). The gene expression of TNF- $\alpha$  was lower in animals fed with the sapucaia nuts than in those of the controls. There were no significant differences in both AIN-93G + SAP and HFD + SAP in the TNF- $\alpha$  gene expression in all treatment periods.

It was also observed that the gene expression of the NFkB (p65) was significantly lower in the group of rats that consumed the diets supplemented with "sapucaia" nuts. The gene expression of ZnSOD, in turn, was relatively higher in sapucaia supplemented groups than in the controls.

There was also an increased gene expression in the hepatic HSP72 gene in both diets. However, the HFD + SAP showed more significant amounts.

#### DISCUSSION

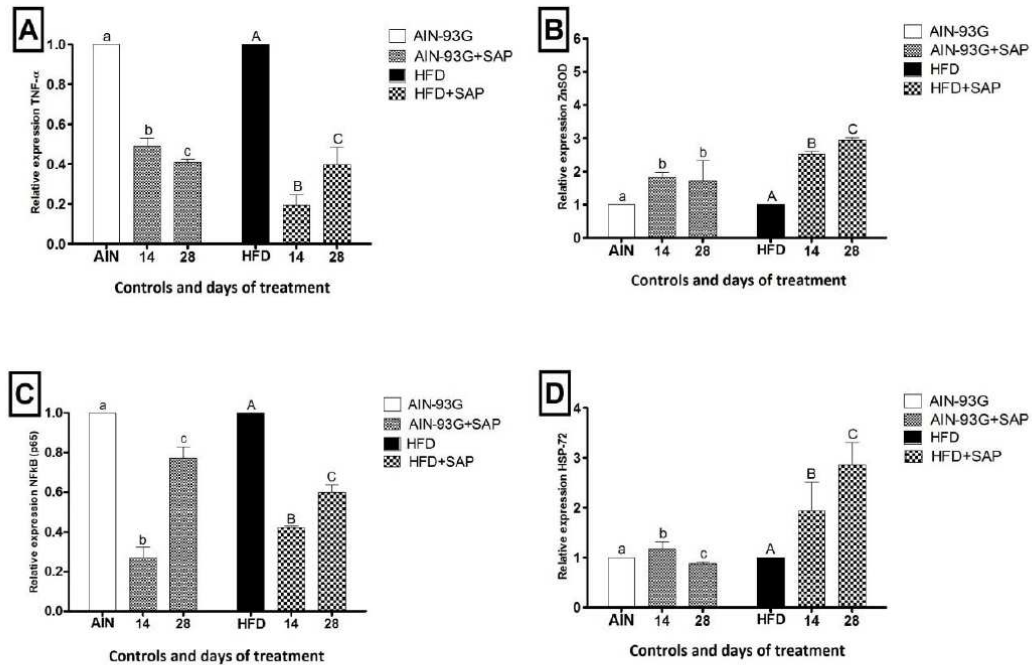
High-fat diets administered to rats can induce inflammation and oxidative stress (Burneiko et al., 2006; Brunetti et al., 2009; Estadella et al., 2004; Kretschmer et al., 2005; Pérez-Echarri et al., 2009; Scoaris et al., 2010). Rats fed with the hyperlipidic diet (HFD) did not show a significantly higher hepatosomatic index (HIS; relative liver weight) compared to the other groups. Sapucaia

dietary supplementation and the duration of the experiment appeared not to affect HIS value. Although, diets enriched with "sapucaia" nuts did not have any effect on weight gain and on HSI, our findings showed that sapucaia enrichment contributed in the prevention of the redox imbalance caused by high-fat diets due to its interference in both the MDA concentrations and in the SOD enzyme activity. As it was expected, more oxidizing agents in animals fed with high-fat diet were observed. However, this negative effect was diminished after sapucaia supplementation as shown by the significant increase in the SOD activity and of the decrease in MDA values.

Carvalho et al. (2012) showed that 100 g of sapucaia nuts cover the daily needs for manganese and magnesium and the half of them for iron, according to the reference values. Other studies using "sapucaia" nuts found high magnesium, iron, selenium and phosphorus concentration levels (Kerdell-Vargas, 1966; Souza et al., 1996; Vallilo et al., 1999), as well as a desired protein digestibility (Denadai et al., 2007). Such findings about the nutritional value of the the sapucaia nut (*L. pisonis*), reinforce the hypothesis that are several benefits in the metabolism of animals fed with the sapucaia enriched diets.

The enzyme system is the first line of antioxidant defense of the organism. The constituents of the nuts associated with the gene stimulation of the enzymes can play an important role as exogenous antioxidants, such as tocopherol, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds, due to their mineral components. This set of nutrients can cause many beneficial health effects against metabolic disorders such as obesity and diabetes (Borges and Lessa, 2015; Casas-Agustench et al., 2009; Cassidy et al., 2014; Dominguez-Avila et al., 2015; Fernandes et al., 2015; Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

The liver has multiple functions and is directly involved in the oxidative processes (Rodríguez-Hernández et al., 2013; Stadler et al., 2004). Changes in the hepatic redox balance can interfere in the translocation of proteins



**Figure 1.** Averages of the mRNA relative gene expression (calibrator sample,  $y=1$ ) of TNF- $\alpha$  (A), ZnSOD (B), NFKB (p65) (C) and HSP-72 (D) byqPCR for the animals fed with AIN-93G + SAP and HFD + SAP for 14 and 28 days. Means followed by different letters (lowercase for AIN-93G and capital to HFD) are significantly different according to the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

sensitive to oxidative stress from the cytoplasm to the cell nucleus (Cassidy et al., 2014; Maritim et al., 2003; Sadi et al., 2008). Thus, the oxidative stress induced by high-fat diets tends to increase the gene expression of TNF- $\alpha$  and NFKB (p65), as a response to the process triggered by the oxidative imbalance associated to the high content of saturated fatty acids. In addition, the HSP70 HSP family is also affected by the oxidative stress caused by dietary fats (Jangale et al., 2013; Lightfoot et al., 2015; Yaglom et al., 2003; Gabai and Sherman, 2002).

There has been a significant difference in the HSP-72 gene expression between rats treated with both HFD and HFD + SAP and those fed with AIN-93G and AIN-93G + SAP. Rats treated with the sapucaia nut-enriched diets showed significantly higher HSP-72 gene expression than those fed just with the control diets (HFD and AIN-93G), except AIN-93G at day 28. As it is concluded, "sapucaia" nut could play an important role in the modulation of this gene expression. The HSP-72 is part of the HSP-70 proteins family, which inhibits NFKB (p65) activation by reducing the production of pro-inflammatory cytokines (Dokladny et al., 2010; Shi et al., 2006; Tanaka

et al., 2014). Therefore, increased HSP-72 expression seen in groups fed with the sapucaia nuts-enriched diets (HFD + SAP and AIN-93G + SAP) could be correlated with the decrease in the NFKB activation cascade activity (p65).

There is an interaction of NFKB signaling cascade (p65) with the TNF- $\alpha$  gene expression, since TNF- $\alpha$  is a pro inflammatory agent and can be activated by the NFKB (p65) protein (Dokladny et al., 2010; Tanaka et al., 2014). As it was shown in the present study, there was a decrease in the TNF- $\alpha$  gene in animals fed with HFD + SAP compared to the HFD group. Higher ZnSOD gene expression was observed in all groups treated with sapucaia nuts-enriched diets, in addition to all the aforementioned findings. It allows inferring that the presence of these nuts in the diets played an important role, since the gene expression of this enzyme was higher in the HFD + SAP than in the HFD.

The correlation between saturated fat acids consumption and oxidative stress is not simple, because there are many biochemical mechanisms involved. Thus, saturated fat acids consumption can increase oxygen

consumption and generate other oxidizing molecules (Dandekar et al., 2015; Hybertson et al., 2011; Seifert et al., 2009). However, our results showed increased antioxidant and anti-inflammatory capacity due to the lower gene expressions of TNF- $\alpha$  and NF $\kappa$ B. These findings reinforce the hypothesis that dietary antioxidants are particularly important for protection against chronic diseases. Finally, the sapucaia nuts could serve as a potential antioxidant source and their protection is profound even in animals fed with high-fat diets.

## Conclusion

The sapucaia nut dietary supplementation stimulated the enzymatic activity of SOD and reduced lipid peroxidation values in the hepatic tissue of rats fed with high-fat diets. These results were confirmed by the observed differences in the expression of genes directly involved in the metabolic processes. ZnSOD enzyme and HSP72 protein expressions were significantly higher in rats fed with the sapucaia nuts-enriched diets. Diet enriched with sapucaia nuts was found to influence the gene expression of the inflammation markers TNF- $\alpha$  and NF $\kappa$ B; reduction in their expression levels can be linked with the increased antioxidant activity, since these parameters are related. Further studies on sapucaia must be conducted in order to assess the impacts of its consecutive use as food, since is rich in nutrients and could have beneficial effects on health status.

## Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support (APQ 00832 12).

## REFERENCES

- Alemaym M (2013). Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. *Nutr. Res.* 33(1):1-11.
- Borges J P and Lessa M A (2015). Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq. Bras. Cardiol.* 105(1):71-81.
- Bradford M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2):248-254.
- Brunetti L, Leone S, Orlando G, Recinella L, Ferrante C, Chiavaroli A, Vacca M (2009). Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat. *Peptides.* 30(7):1323-1327.
- Buege JA and Aust SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Biomembranes- Part C: Biological Oxidations.* pp. 302-310.
- Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, Novelli ELB (2006). Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem. Toxicol.* 44(7):1167-1172.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Wittwer C T (2009). "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clin. Chem.* 55(4):611-622.
- Carobbio S, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A (2011). Origins of metabolic complications in obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 14(6):520-526.
- Casas-Agustench P, López-Urriarte P, Ros E, Bulló M, Salas-Salvadó J (2011). Nuts, hypertension and endothelial function. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 21:S21-S33.
- Clay JW, Paulo de Tarso BS, Clement CR (2000). Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. (1th ed.) Brasília: Ministerio de Ciência e Tecnologia.
- Dandekar A, Mendez R, Zhang K (2015). Cross talk between er stress, oxidative stress, and Inflammation in Health and Disease. *Methods Mol. Biol.* pp. 205-214.
- Carvalho IM, Queiros LD, Brito LF, Santos FA, Moreira Bandeira AV, de Souza, AL, Queiroz JH (2012). Chemical characterization of sapucaia nuts (*LecythispisonisCambess.*) from zona da matameira region. *Biosci. J.* 28(6):971-977.
- De la Fuente V, Federman N, Zalzman G, Salles A, Freudenthal R, Romano A (2015). NF- $\kappa$ B transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. *Front. Mol. Neurosci.* 8: 1-9.
- Denadai SMS, Hiane PA, Marangoni S, Baldasso PA, Miguel AMRO, Macedo MLR (2007). In vitro digestibility of globulins from sapucaia (*LecythispisonisCamb.*) nuts by mammalian digestive proteinases. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27(3):535-543.
- Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, Moseley PL (2009). LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF- $\kappa$ B. *Cell Stress and Chaperones.* 15(2):153-163.
- Dominguez-Avila JA, Alvarez-Parrilla E, López-Díaz JA, Maldonado-Mendoza, I E, Gómez-García MC, De la Rosa LA (2015). The pecan nut (*Caryaillinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. *Food Chem.* 168:529-537.
- Estadella D (2004). Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Nutrition* 2(2):218-224.
- Fernandes DC, Alves AM, Castro GSF, Junior AAJ, Naves MMV (2015). Effects of Baru Almond and Brazil Nut Against Hyperlipidemia and Oxidative Stress In Vivo. *J. Food Res.* 4(4):38.
- Gabai VL, Sherman MY (2002). Invited Review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J. Appl Physiol.* 92(4):1743-1748.
- González CA, Salas-Salvadó J (2006). The potential of nuts in the prevention of cancer. *Br. J. Nutr.* 96(S2): S87-S94.
- Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM (2011). Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.* 32(4-6):234-246.
- Jangale NM, Devarshi PP, Dubal AA, Ghule AE, Koppikar SJ, Bodhankar SL, Harsulkar AM (2013). Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Food Chem.* 141(1):187-195.
- Kerdell-Vargas F (1966). The depilatory and cytotoxic action of coco de mono (*Lecythis ollaria*) and its relationship to chronic seleniosis. *Econ. Bot.* 20:187-105.
- Kim JY, Yenari MA, Lee, JE (2015). Regulation of inflammatory transcription factors by heat shock protein 70 in primary cultured astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neuroscience* 286:272-280.
- Kohn HI, Liversedge M (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82(3):292-300.

- Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, Haus A (2005). Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci.* 76(14): 1553-1573.
- Lightfoot AP, Jackson MJ, McArdle A, Cooper RG (2015). Heat Shock Protein 70 Protects Against ER Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction; A Potential Therapeutic Target to Reduce Muscle Weakness in IIM. *Rheumatology*, 54(1):i31-i32.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins J (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17(1):24-38.
- Marklund SL (1985). Pyrogallol autoxidation. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press. Boca Raton. pp. 243-247.
- Pérez-Echarri N, Pérez-Matute P, Marcos-Gómez B, Martí A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2009). Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. *J. Nutr. Biochem.* 20(9):705-714.
- Pyles LA, Stejskal EJ, Einzig S (1993). Spectrophotometric Measurement of Plasma 2-Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in the Presence of Hemoglobin and Bilirubin Interference. *Exp. Biol. Med.* 202(4):407-419.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993). 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.* 123(11):1939-1951.
- Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendia LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int. J. Endocrinol. Metab.* pp. 1-11.
- Ross E (2010). Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients.* 2(7):652-682.
- Sabaté J, Ang Y (2010a). Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 89(5):1643S-1648S.
- Sabaté J, Oda, K, Ros, E (2010b). Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. *Arch. Intern. Med.* 170(9):821-827.
- Sadi G, Yılmaz Ö, Güray T (2008). Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol. Cell. Biochem.* 309(2):109-116.
- Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F (2007). Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* 40(1):15-21.
- Shahidi F and Ambigaipalan P (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods* 18:820-897.
- Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, Moraes SMF, Proença ARG, Peralta RM, Natali MRM (2010). Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* 26(3):312-320.
- Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME (2009). Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation. *J. Biol. Chem.* 285(8):5748-5758.
- Shi Y, Tu Z, Tang D, Zhang H, Liu M, Wang K, Xiao X. (2006). The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway but not the MAPK pathways. *Shock.* 26(3):277-284.
- Souza ADGD, Sousa NR, Silva SD, Nunes CDM, Canto ADC, Cruz LDA (1996). *Fruteiras da Amazônia*. (1th ed.) Brasília: Embrapa-SP.
- Stadler K, Jenei, V, Von Bölcsházy G, Somogyi A, Jakus J (2004). Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats. *Orvosihetlap.* 145(21):1135-1140.
- Tanaka T, Shibasaki A, Ono R, Kaisho T (2014). HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling. *Sci. Signal.* 7(356):ra119-ra119.
- Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, Leverve XM (2011). Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J. Hepatol.* 54(2):348-356.
- Vallilo M (1999). *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food Chem.* 66(2):197-200.
- Yaglom J, O'Callaghan-Sunol C, Gabai V, Sherman, MY (2003). Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and hsp72. *Mol. Cell. Biol.* 23(11):3813-3824.